

CELULAS GAMMA-DELTA Y SU FUNCION EN LA RESPUESTA INMUNOLOGICA

Oriol, Olívia; Tapia, Félix, J.

Palabras Claves: Células gamma-delta, función inmunológica

Instituto de Biomedicina, Apartado 4043
Caracas - 1010-A

CELULAS GAMMA-DELTA Y SU FUNCION EN LA RESPUESTA INMUNOLOGICA

Recientemente se ha descrito un nuevo receptor antigénico en los linfocitos T denominado TCR-1 o receptor *gamma-delta*. Este receptor es totalmente distinto al receptor TCR-2 o *alfa-beta* presente en los linfocitos T CD4-positivos o CD8-positivos.

Una de las principales funciones de los linfocitos T *gamma-delta* es la capacidad de llevar a cabo la citotoxicidad de células blanco. Esta citolisis puede ser dividida en tres tipos, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la lisis tumoral y la restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En la primera los linfocitos T *gamma-delta* reconocen epitopos sobre el fragmento Fc de las IgG que están sobre las células blanco tumorales como K562, no está restringida por moléculas de histocompatibilidad clásicas. Se ha reportado que los linfocitos T *gamma-delta* reconocen células blanco alogénicas portadoras de moléculas de histocompatibilidad clase I, no clásicas y poco polimórficas, codificadas después de la región H2-D murina. También se ha sugerido que estas células pueden reconocer moléculas de histocompatibilidad autólogas clase I presentes en las células blanco epiteliales dañadas. Otras evidencias sugieren que las células *gamma-delta* están en capacidad de reconocer *proteínas de stress* micobacteriales en presencia de células presentadoras de antígeno autólogas, tales como los linfocitos B.

Las células dendríticas epidérmicas y los linfocitos intestinales intraepiteliales poseen el receptor *gamma-delta*, lo que sugiere que ambos tipos celulares están involucrados en la inmunovigilancia de las superficies celulares epiteliales. Estas cé-

lulas reconocen antígenos como *proteínas de stress* sobre la superficie de las células dañadas, junto con moléculas clase I autólogas y poco polimórficas.

Los linfocitos T *gamma-delta* son abundantes en diferentes condiciones patológicas tales como la lepra, la leishmaniasis y ciertas enfermedades autoinmunes, lo que sugiere que estas células ó sus productos de secreción, juegan un papel muy importante en la resistencia a ciertos agentes patógenos y alteraciones tisulares.

GAMMA-DELTA CELLS AND THEIR FUNCTION IN THE IMMUNOLOGIC RESPONSE

A new antigen receptor has recently been described in T lymphocytes. This receptor known as TCR-1 or *gamma-delta* receptor is quite different from the TCR-2 or *alpha-beta* present in CD4-positive or CD8-positive T cells.

One of main features of *gamma-delta* T cells is to cause cytotoxicity of target cells. This cytolysis can be divided into three types, namely, antibody-dependent cytotoxicity, tumor lysis and MHC-restricted cytotoxicity. In the first type the *gamma-delta* T cells recognize epitopes on the Fc region of immunoglobulins which are present on the target cells. The lysis of tumoral target cells such as K562 cell line, is not restricted by classic MHC molecules. It has been suggested that *gamma-delta* T cells recognize allogeneic target cells expressing MHC class I molecules, different from the classic ones being more polymorphic and coded by a region located after the H2-D region in mice. Some evidence shown that these cells recognize autologous MHC class I molecules present on altered epithelial target cells. In ad-

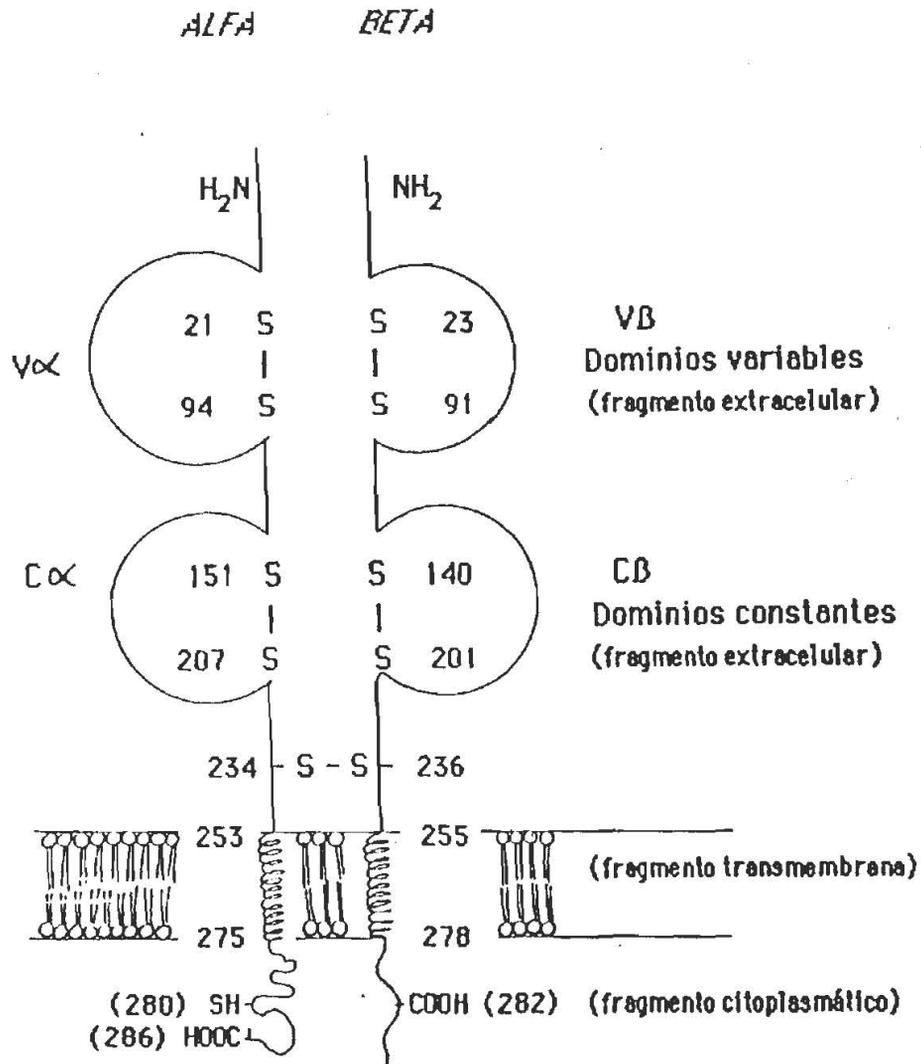


Figura 1. Estructura bioquímica del receptor de linfocitos T *alfa-beta* (TCR-Ti). Cada molécula receptora está compuesta por dos cadenas, *alfa* y *beta*, cada una con dominios extracelulares parecidos a las inmunoglobulinas, un dominio variable amino-terminal y un dominio constante carboxi-terminal. Los dominios se estabilizan a través de un puente disulfuro entre residuos de cisteína. Las cadenas se encuentran unidas por un puente disulfuro intercatenario cercano a la superficie celular. El receptor se encuentra adherido a la membrana por dos porciones peptídicas transmembrana. Un pequeño péptido carboxi-terminal de cada cadena, se extiende dentro del citoplasma. Las cadenas *beta* se encuentran glicosiladas.

dition, *gamma-delta* T cells can recognize *stress proteins* of mycobacteria in the presence of autologous antigen-presenting cells, such as B lymphocytes.

The dendritic epidermal cells and cells and the intestinal intraepithelial cells express the *gamma-delta* receptor, suggesting that these cell types are involved in the immunosurveillance of the epithelial cell surfaces. These cells can recognize *stress proteins* on the surface of damage cells in association with MHC class I molecules of low polymorphism.

Gamma-delta T cells are abundant in different pathologic conditions such as lepra, leishmaniasis and some autoimmune diseases. This suggests that these cells or their secretion products play an important role in the resistance to certain pathogenic agents and tissue alterations.

1. INTRODUCCION:

El receptor *alfa-beta* (TCR-TI):

La característica más importante del sistema inmune es su capacidad para responder a una cantidad enorme de antígenos. A nivel molecular esta capacidad está dirigida por diversas moléculas sintetizadas por los linfocitos B y T.

Las moléculas producidas por los linfocitos B, llamadas anticuerpos o inmunoglobulinas, reconocen y enlazan antígenos específicos libres, y son las responsables de la inmunidad humoral. Los linfocitos T a través de sus receptores de superficie, reconocen al antígeno asociado a productos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

La exquisita especificidad de los linfocitos T está determinada por un Receptor de Superficie Celular (TCR) heterodimérico de 90 kD, constituido por dos cadenas, una cadena *alfa* de 45-55 kD y otra cadena *beta* de 40-50 kD, unidas por un puente disulfuro cerca de la membrana celular externa del linfocito T. Ambas cadenas son proteínas integrales de membrana, compuestas por un segmento extracelular, un segmento transmembrana y un segmento citoplasmático. Cada cadena se divide en dominios variables y constantes, estabilizados por puentes disulfuros intercatenarios. Las regiones variables reaccionan con el antígeno y las moléculas de histocompatibilidad (Figura 1) (Saito *et al.*, 1984).

El TCR-Ti está asociado a la glicoproteína CD3, la cual es esencial para la función de los linfocitos T *alfa-beta* y está involucrada en la transducción de las señales de activación (Figura 2). Está compuesta por 2 subunidades de 20 kD (*delta* y *epsilon*), una subunidad de 25 kD (*gamma*), un homodímero zeta de 32 kD y una quinta cadena *ene*, que aparece unida a un 10% de las cadenas *zeta* (Mustelin y Altman, 1989).

Los linfocitos T *alfa-beta* maduros expresan otros marcadores de membrana de 62 kD (CD4) y de 76 kD (CD8). Estas moléculas permiten caracterizar a los linfocitos como cooperadores/inductores o supresores/citotóxicos, e intervienen en el reconocimiento de las secuencias constantes de los productos del MHC (Reinherz *et al.*, 1984).

En la búsqueda de los genes que codifican las cadenas *alfa* y *beta* del TCR-Ti, se descubrió una tercera clase de genes que codifican para una proteína distinta, la cadena *gamma* (Sai-

to *et al.*, 1984; Brenner *et al.*, 1986). Posteriormente, se identificó un cuarto gen que codifica la cadena *delta* de este nuevo receptor de linfocitos T, denominado TCR *gamma-delta* o TCR-1 (Hata *et al.*, 1988). Los linfocitos T *gamma-delta* poseen el complejo CD3, pero carecen de los marcadores CD4 y/o CD8, por lo que se los denomina como "dobles negativos" (DN) (Brenner *et al.*, 1986).

El papel biológico de este receptor no está bien definido. Aún cuando existe evidencia que este receptor forma parte de la superficie celular y es responsable de la transducción de señales de activación y de la citotoxicidad celular, la naturaleza de los antígenos y de los elementos de restricción reconocidos por este receptor, son todavía materia de especulación. Sin embargo, este nuevo grupo celular parece tener importancia en diversas condiciones patológicas y especialmente parecen estar involucrados en la inmunovigilancia de las superficies epiteliales (Janeway *et al.*, 1988; Raulet, 1989).

2. EL RECEPTOR GAMMA-DELTA:

2.1 Bloquímica:

En el hombre, el receptor *gamma-delta* aparece en varias formas moleculares que dependen del rearreglo que sufren los genes durante la ontogenia tímica. El receptor puede aparecer unido o no, por un puente disulfuro intercatenario (Figura 3) (Brenner *et al.*, 1986; Lanier *et al.*, 1987; Bottino *et al.*, 1988; Hochstenbach *et al.*, 1989). El receptor *gamma-delta* murino se encuentra siempre unido por un puente disulfuro intercatenario (Pardoll *et al.*, 1987).

La primera forma del receptor humano es un heterodímero de 90 kD compuesto por dos subunidades, la *gamma* (37-40 kD) y la *delta* (41-45 kD) asociadas por un puente disulfuro (Lanier y Weiss, 1986; Brenner *et al.*, 1987). La segunda forma presenta dos subunidades de 40-41 kD no enlazadas por un puente disulfuro (Bottino *et al.*, 1988; Hochstenbach *et al.*, 1988). La tercera forma comprende una subunidad *gamma* de 55 kD, no asociada covalentemente con el polipéptido *delta* de 40 kD (Brenner *et al.*, 1987). Los diferentes pesos moleculares representan distintas formas de glicosilación de cada proteína y notable heterogeneidad de carga.

Cada subunidad posee dos dominios extracelulares (uno variable amino-terminal y otro constante-carboxi terminal), un segmento transmembrana y otro citoplasmático, parecidos a las inmunoglobulinas y al receptor TCR-Ti. El puente disulfuro está codificado por genes constantes (Figura 3) (Hochstenbach *et al.*, 1988).

2.2 Genética:

Adicionalmente a los genes *alfa* y *beta*, se han descubierto otros grupos de genes que codifican para las cadenas *gamma* y *delta* del receptor TCR-1 de linfocitos T murinos (Saito *et al.*, 1984; Kranz *et al.*, 1985; Chien *et al.*, 1987) y humanos (LeFranc y Rabbits, 1985; Murre *et al.*, 1985; Hata *et al.*, 1987).

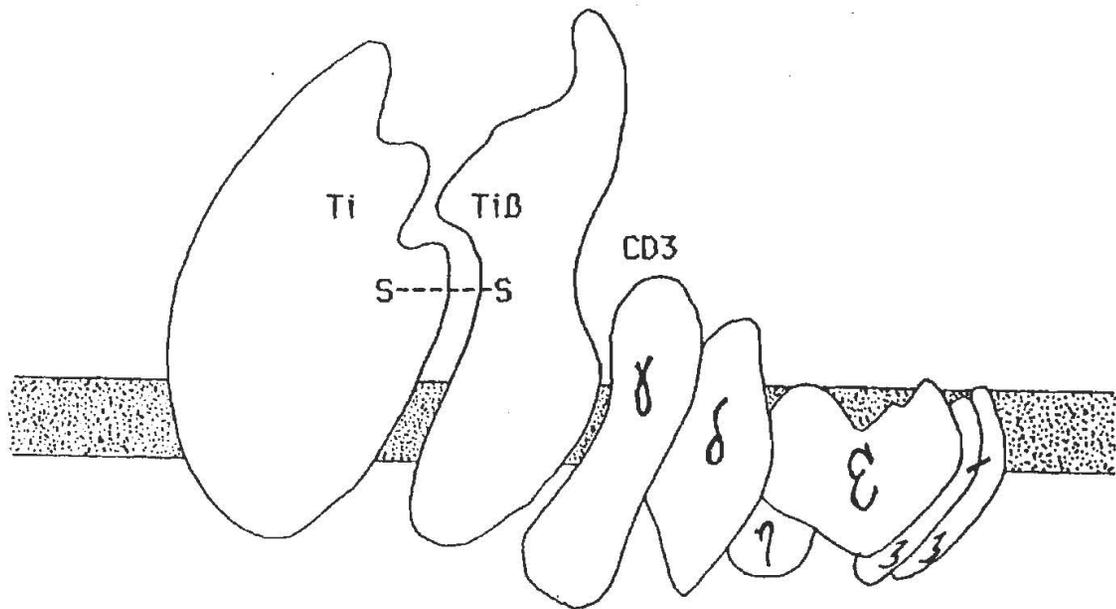


Figura 2. Subunidades del Receptor TCR-Ti de linfocitos T humano. Las subunidades Ti *alfa* y Ti *beta* se encuentran unidas por un puente disulfuro y además están asociadas con la cadena de 25 kD (*gamma*) de la glicoproteína CD3. El complejo CD3 consta de 2 cadenas (*delta* y *epsilon*) adicionales con pesos moleculares de 20 kD respectivamente. Adicionalmente, la glicoproteína CD3 consta de un homodimero *zeta* y de una quinta subunidad *ene*.

Los genes *gamma* y *delta* son segmentos génicos parecidos a los de las inmunoglobulinas, que sufren una serie de rearrreglos durante el desarrollo somático de los linfocitos T, para dar origen a la forma activa del gen.

Ambos sistemas génicos, tanto en humanos como en ratones, disponen de una limitada diversidad de regiones variables "V", de unión "J", constantes "C" y regiones de diversidad "D". La diversidad de las regiones génicas *gamma-delta* es muy baja si se compara con la alta variabilidad y diversidad encontrada en los *loci alfa-beta* (no se han encontrado segmentos de diversidad en los genes *gamma* humanos y murinos). La variabilidad puede ser incrementada mediante la adición al azar de nucleótidos adicionales "N" entre los segmentos génicos J y V, durante el proceso de recombinación, fenómeno conocido como "diversidad de unión" (Hayday *et al.*, 1985; Elliot *et al.*, 1988). Los genes humanos tienen un número considerablemente mayor de segmentos "N" que los genes murinos. Este fenómeno ocurre con mayor frecuencia en las cadenas *delta* por lo que las distintas secuencias producidas durante la recombinación de estos segmentos génicos, aumenta considerablemente la variabilidad dentro del receptor (Hayday *et al.*, 1985; Quertermous *et al.*, 1986; Elliot *et al.*, 1988).

3. CELULAS GAMMA-DELTA Y LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA:

3.1 Ontogenia:

El receptor *gamma-delta* se expresa en los timocitos $CD3^+$ durante la ontogenia fetal, en los timocitos $CD3^+CD4^-CD8^-$ antes de la aparición de los linfocitos T convencionales que portan el receptor antigénico *alfa-beta*, y en un grupo de células $CD3^+$ de los órganos linfoides y de sangre periférica, donde constituyen una subpoblación menor (1-10%). En la epidermis murina, las células *gamma-delta* son abundantes y se encuentran como células dendríticas epidérmicas y linfocitos intestinales intraepiteliales en las células columnares de las vellosidades intestinales (50%-100%) Bank *et al.*, 1986; Brenner *et al.*, 1987; Kuziel *et al.*, 1987; Matis *et al.*, 1987; Pardoll *et al.*, 1987; Goodman y Lefrancoise, 1988).

Los precursores de linfocitos T *gamma-delta* murinos provienen de células madre hematopoyéticas que se encuentran en el hígado fetal o en la médula ósea del individuo adulto. Estos precursores se comprometen a distintas líneas de linfocitos T antes de migrar hacia el timo, tal es el caso de los linfocitos T *alfa-beta* y de los *gamma-delta* (Winoto y Baltimore, 1989). Los precursores migran hacia el timo durante los días 11 y 12 de gestación, donde proliferan y se diferencian, dando lugar a linfocitos T funcionales, capaces de responder a antígenos extraños. Los linfocitos inmunocompetentes generados alrededor del día 18, migran hacia los órganos linfoides periféricos (ganglios linfáticos y bazo) (Snodgrass *et al.*, 1985; Haars *et al.*, 1986). Otros precursores sufren diferenciación extratímica y migran hacia los epitelios, donde se diferencian en células dendríticas epidérmicas y linfocitos intestinales intraepiteliales (Figura 4).

Havran y Allison (1988), produjeron un AcMo que reacciona contra un epítipo del producto del gen *Vgamma-3*. Este segmento génico sólo está presente en estadios tempranos del desarrollo. Para evaluar la expresión de *Vgamma-3* en el timo en desarrollo, se examinaron timocitos fetales, timocitos de ratones recién nacidos y timocitos adultos.

Los timocitos aparecen en una serie de 4 eventos durante la ontogenia fetal (Havran y Allison, 1988). Las primeras células $CD3^+$ aparecen el día 14 cuando es activado el gen *gamma*. Estas células expresan los segmentos variables *Vgamma-3* y *Vdelta-1*, que caracterizan a los timocitos fetales. Estos timocitos desaparecen el día 17 del desarrollo tímico, por lo que se sugiere que son capaces de emigrar y establecerse en la epidermis, donde se diferencian en células dendríticas epidérmicas $Thy-1^+$ DN, en el ratón adulto (Asarnow *et al.*, 1988; Havran y Allison, 1988). Seguidamente aparecen dos grupos de células que expresan el receptor *gamma-delta*, pero no contienen la región *Vgamma-3*, por lo que se sugiere que son capaces de migrar a otro tipo de superficie epitelial, como al epitelio intestinal y constituyen la mayoría de las células $CD3^+$ durante los días 17 y 18. Estos investigadores sugieren la posibilidad que las células *gamma-delta* ubicadas en los epitelios, provienen de células precursoras de la médula ósea que sufren diferenciación extratímica a partir de timocitos fetales *Vgamma-3* y *Vdelta-1*, en el caso de las CDE $Thy-1^+$. El análisis bioquímico de distintos clones de linfocitos intestinales intraepiteliales, sugiere que la mayoría de las cadenas *gamma* son productos del segmento génico *Vgamma-5* (Asarnow *et al.*, 1988). Estas observaciones sugieren la posibilidad que los genes *gamma* y *delta* influyen en la distribución tisular de las células que expresan el receptor *gamma-delta* (Havran y Allison, 1988; Asarnow *et al.*, 1988). El tercer evento que ocurre en el timo, es la localización de los linfocitos T DN *gamma-delta*⁺ en el bazo y en los ganglios linfáticos del ratón adulto. Estos timocitos adultos son codificados por los segmentos génicos *Vgamma-2*, *Vgamma-1* y *Vdelta-5* (Chien *et al.*, 1987; Elliot *et al.*, 1988). El último evento es la aparición de los linfocitos T *alfa-beta*, que forman la gran mayoría de los linfocitos R $CD3^+$ antígeno específicos en el timo, después del día 19 y en los órganos linfoides del adulto.

Pardoll y col. (1987) encontraron que durante el desarrollo y en el timo adulto, el receptor *gamma-delta* se encuentra en la forma DN, mientras que el receptor *alfa-beta*, se encuentra como "simple positivo" (SP) o "doble positivo" (DP).

Estos resultados indican que el receptor *gamma-delta* está asociado con las etapas tempranas del crecimiento y desarrollo de los linfocitos T, lo cual sucede antes que el receptor *alfa-beta* sea expresado (Raulet *et al.*, Snodgrass *et al.*, 1985).

Los linfocitos T de sangre periférica constituyen distintos grupos generados en diferentes estadios de desarrollo. Los linfocitos T *gamma-delta* de sangre periférica, parecen ser productos de células T precursoras circulantes con el fenotipo $CD3^-CD7^+$, que sufren diferenciación extratímica a $CD3^+CD7^+$, ya que el marcador *CD7* ha sido encontrado en la médula ósea, en timocitos fetales antes que éstos colonicen el timo, y en los linfocitos T circulantes (Pfeffer *et al.*, 1989). Los segmentos génicos predominantes son *Vgamma-3* y *Jdelta-1*, siendo éste último distinto de los encontrados en el timo, lo que

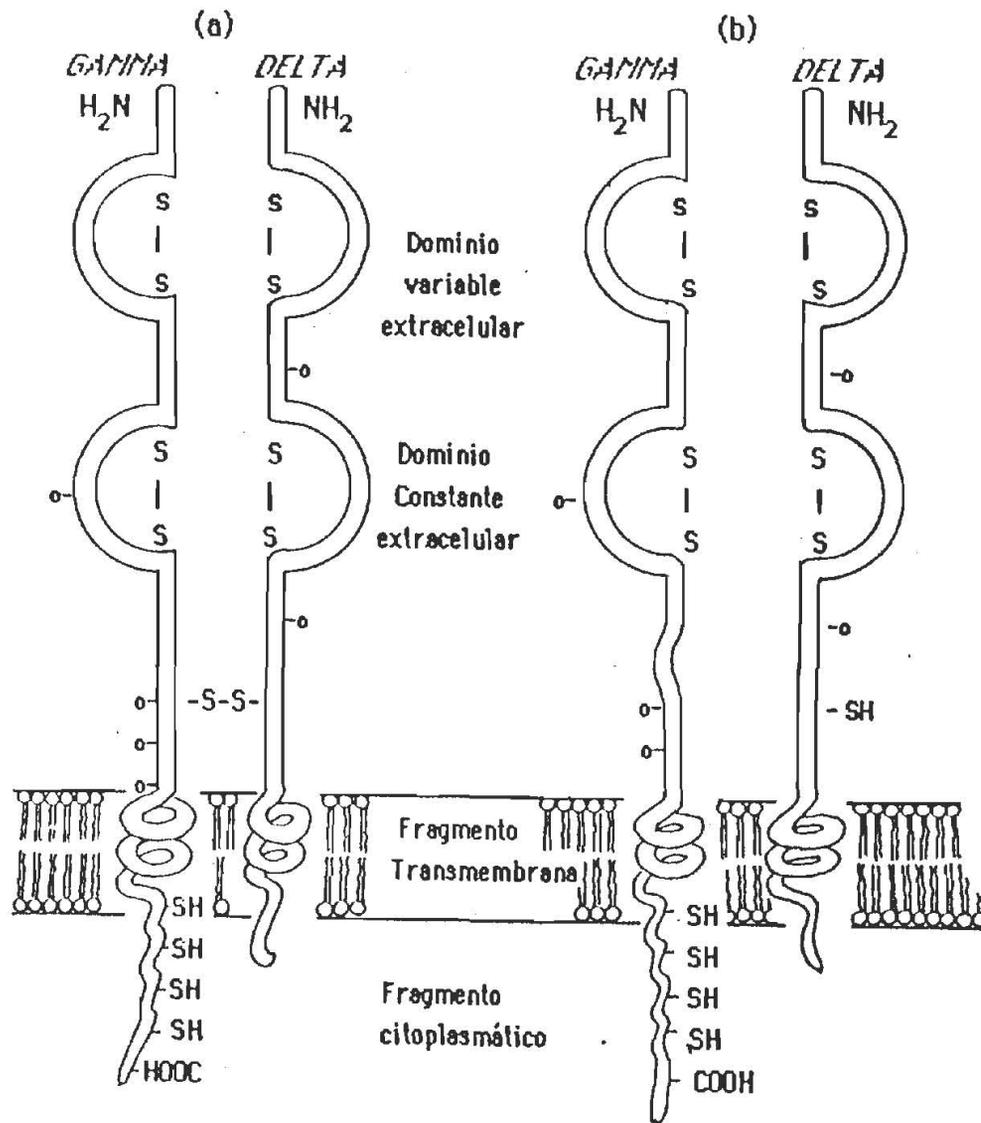


Figura 3. Estructura bioquímica del receptor de linfocitos T *gamma-delta*. Cada molécula receptora está compuesta por dos cadenas, *gamma* y *delta*, cada una con dos dominios extracelulares (uno variable amino-terminal y otro constante carboxi-terminal), un segmento transmembrana y otro citoplasmático, parecidos a las inmunoglobulinas y al receptor TCR-Ti. Dos tercios de los LSP poseen un heterodímero unido por un puente disulfuro entre residuos de cisteína (a) y una tercera parte de los LSP poseen un heterodímero no unido por puente disulfuro (b). El puente disulfuro está codificado por los genes constantes parecidos a inmunoglobulinas. Los pesos moleculares de cada cadena varían de acuerdo a los sitios de glicosilación (-o).

sugiere que la especificidad y diversidad de los linfocitos T *gamma-delta* de sangre periférica difieren de las del timo (Loh *et al.*, 1989).

3.2 Antígenos para las células *gamma-delta*: El complejo mayor de histocompatibilidad.

Los antígenos CD4 y CD8 son marcadores mutuamente excluyentes para las dos grandes subpoblaciones de linfocitos T *alfa-beta*. Los linfocitos T *alfa-beta* CD4⁺ reconocen el antígeno en asociación con moléculas clase II del MHC presentes en células presentadoras de antígeno como los macrófagos, y actúan como cooperadores/inductores. Los linfocitos T *alfa-beta* CD8⁺ lo reconocen junto con moléculas clase I presentes en las células dañadas y funcionan como citotóxicos/supresores. Dado que se han encontrado distintas subpoblaciones de linfocitos T *gamma-delta*, es de suma importancia determinar si éstas pertenecen a una de estas dos subpoblaciones, o si representan una subpoblación distinta de linfocitos T antígeno específicos (Lanier y Weiss, 1986).

Borst y col. (1987) sugirieron que los linfocitos T *gamma-delta* CD3⁺CD4⁻ de sangre periférica desarrollan actividad citotóxica no dependiente de moléculas de histocompatibilidad al igual que las células NK y que pueden mediar "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" (CCDA), una característica de las células NK que expresan receptores Fc para las IgG-FcR.

Brenner y col. (1987) encontraron que linfocitos T *gamma-delta* CD3⁺CD4⁻CD8⁻ aislados de sangre periférica y de pacientes inmunodeficientes, presentaron citotoxicidad espontánea frente a células blanco como K562, la cual es sensible al ataque de células asesinas naturales (NK), y células tumorales como MOLT-4, por lo que actúan como células NK. La lisis de estas células fue independiente del reconocimiento de antígenos de histocompatibilidad. Sin embargo, Matis y col. (1987) encontraron que la citotoxicidad espontánea de estas líneas celulares se debe a la adición continua de IL-2 como factor de crecimiento.

Matis y col. (1987) seleccionaron células *alfa-beta* CD3⁺DN de ganglios linfáticos periféricos de ratones BALB/c atímicos. Las líneas celulares mostraron un amplio patrón de reactividad cruzada con un gran número de células blanco alogénicas, que comparten determinantes antigénicos relativamente no polimórficos. Las líneas celulares reconocieron el antígeno junto con moléculas clase IB del MHC codificadas entre las regiones murinas H-2D y Qa ó TLa.

Bluestone y col. (1988), también sugirieron que los linfocitos T *gamma-delta* CD3⁺CD4⁻CD8⁻ aislados de ganglios linfáticos periféricos de ratones atímicos, reconocen moléculas clase I relativamente no polimórficas mapeadas entre la región TL o hacia su derecha, en el complejo génico murino. Según estos resultados se pudo sugerir que los linfocitos T *gamma-delta* evolucionaron para reconocer antígenos de histocompatibilidad codificados por las regiones H-2Q, y H-2TL, expresados en células presentadoras de antígeno periféricas, y éste podría ser el caso del tipo de reconocimiento ejercido por las células *gamma-delta* ubicadas en los epitelios.

Sin embargo, Janeway (1988) expone que el reconocimiento de moléculas clase I alogénicas por parte de ciertos clones de células *gamma-delta*, estimulados con células presentadoras de antígeno alorreactivas, parece no ser representativo del ligando real, ya que este estímulo parece crear reacciones cruzadas no específicas.

Los resultados de ambos grupos de investigación demuestran, sin embargo, que los receptores *gamma-delta* pueden reconocer antígenos en conjunción con moléculas clase I no polimórficas y no convencionales del MHC.

Haregewoin y col. (1989) aislaron una línea celular de sangre periférica humana con el fenotipo *gamma-delta*⁺CD3⁺DN (línea GD). Esta línea celular fue cultivada junto con células presentadoras de antígeno de varios individuos con diferentes antígenos de histocompatibilidad, en presencia de *proteínas de stress* y antígenos de *Candida albicans*. La línea GD mostró una respuesta proliferativa alta a las *proteínas de stress* en presencia de células presentadoras autólogas, pero una respuesta mucho menos a alogénicas, resultados contradictorios a los de Matis y col. (1987) y a los Bluestone y col. (1988) realizados en ratones. Estos resultados revelaron que los linfocitos T reactivos o *proteínas de stress* están restringidos por moléculas propias en el reconocimiento antigénico.

O'Brien y col. (1989) aislaron un hibridoma *gamma-delta*⁺delta, el cual se incubó con o sin PPD y con esplenocitos de distintas cepas murinas (Figura 4.6). La reactividad del anti-CD3 se usó como control. Estos investigadores sugirieron que los esplenocitos, i.e. los linfocitos B, pueden actuar como células presentadoras de antígeno para los linfocitos T *gamma-delta*, ya que la estimulación con PPD incrementó a unos valores iguales o por encima de los encontrados en la estimulación con PPD sin células presentadoras. Se probaron numerosos esplenocitos con todos los tipos de MHC y el efecto estimulador fue prácticamente el mismo, lo que sugirió que el receptor *gamma-delta* puede reconocer una región no polimórfica presente en todas las moléculas de histocompatibilidad o antígenos Qa ó TL.

Todos estos estudios sugirieron que los linfocitos T *gamma-delta* son específicos para moléculas no polimórficas de clase IB (TL y Qa) en el ratón, y autólogas en el hombre. De esta manera, las moléculas clase I son las que coactúan junto a las *proteínas de stress* en la presentación a los linfocitos T *gamma-delta*.

Janeway y col. (1988) y Goodman y Lefrancoise (1988), encontraron que las células dendríticas epidérmicas murinas y los linfocitos intestinales intraepiteliales murinos, ambos portadores del receptor *gamma-delta*, estaban asociados al reconocimiento del antígeno junto con moléculas clase I del MHC, autólogas y muy poco polimórficas en el caso de las células dendríticas epidérmicas, algo más polimórficas en el caso de los linfocitos intestinales intraepiteliales (Takagaki *et al.*, 1989), y distintas en ambos grupos a las reconocidas por los linfocitos T *alfa-beta*. Los genes que codifican para estas moléculas son activados cuando las células epiteliales son transformadas o infectadas por agentes externos y su reconoci-

TEJIDO HEMATOPOYETICO

TEJIDOS LINFoidES PERIFERICOS

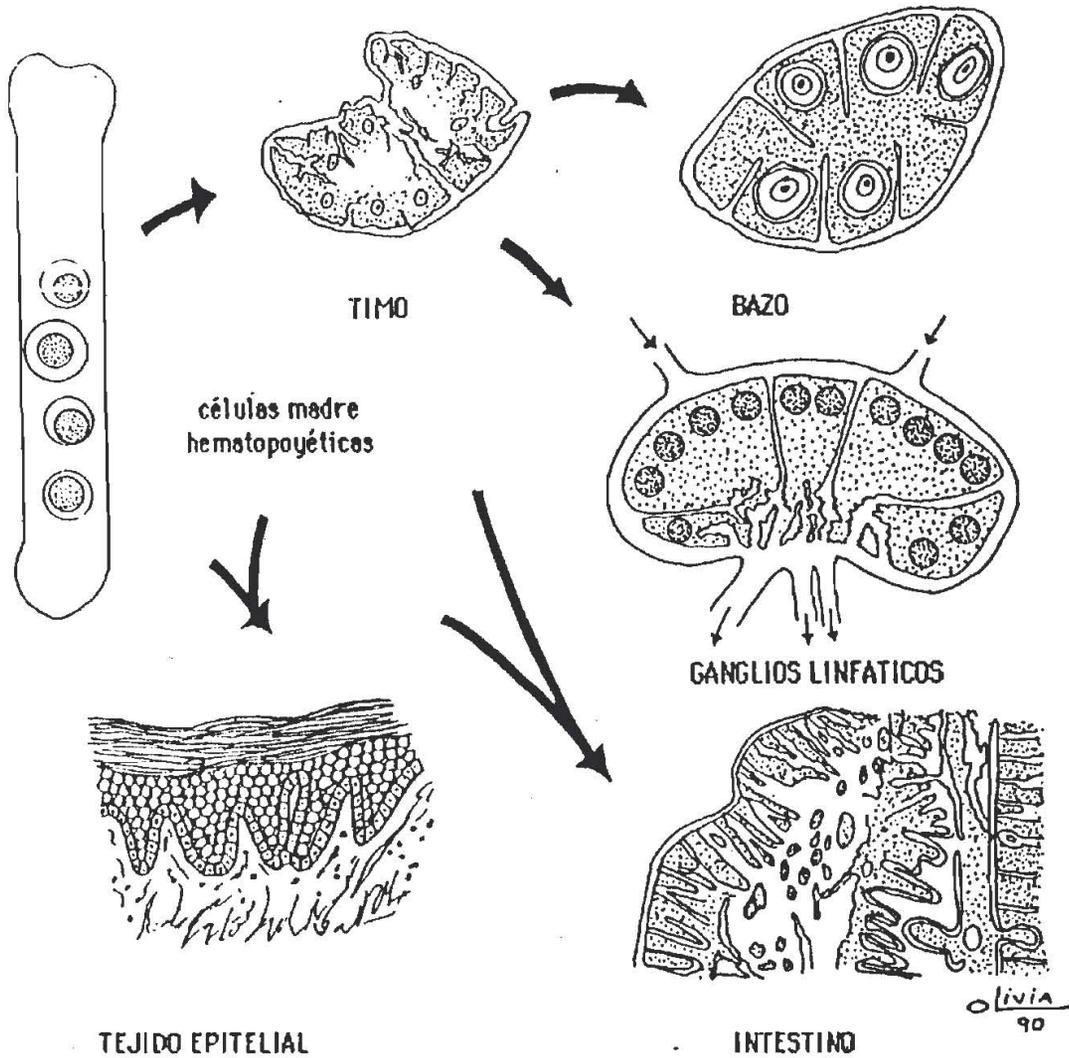


Figura 4. Desarrollo de los linfocitos T γ - δ . En los mamíferos, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea y del hígado, migran por la sangre hacia el timo, donde se diferencian a timocitos. Mientras que algunos de los timocitos mueren en el timo, otros migran hacia los tejidos linfoides periféricos y a la sangre periférica, convirtiéndose en linfocitos T γ - δ maduros, y otros migran hacia las superficies epiteliales. Se cree que estos últimos tienen un origen timo-independiente y pueden derivarse directamente de precursores de la médula ósea.

miento implica la destrucción de las células dañadas que las portan.

3.3. Antígenos para las células *gamma-delta*: Las proteínas de stress o proteínas "heat-shock".

Las primeras investigaciones indicaron que los linfocitos T *gamma-delta* reconocen antígenos convencionales, como los de micobacterias. Una fracción significativa de linfocitos T *gamma-delta* está especializada en reconocer epitopes de una clase de proteínas de stress filogenéticamente conservadas, que son los mayores constituyentes de las células bajo condiciones normales de crecimiento. Estas proteínas de stress pueden ser inducidas en muchos tipos celulares por gran cantidad de presiones ambientales tales como calor, solventes orgánicos, irradiación, infección con DNA viral y transformación maligna. (Young *et al.*, 1988; Haregewoin *et al.*, 1989).

Las proteínas de stress parecen ejercer un efecto estabilizante en ciertas proteínas celulares y virales durante la exposición a condiciones adversas (Young *et al.*, 1988). Las células fagocíticas producen una reacción hostil a organismos extraños. Dichos organismos tienen la capacidad de producir proteínas de stress como producto de la presión selectiva del sistema inmune del hospedador. Por lo tanto, estas proteínas son los antígenos perfectos para ser reconocidos por los linfocitos T *gamma-delta* y constituyen los blancos inmunes en enfermedades como la lepra y la tuberculosis.

Young y col. (1988), encontraron que tres de las proteínas antigénicas del *M. leprae* y dos del *M. tuberculosis* presentan secuencias similares a proteínas de stress. Las proteínas de 71 y 70 kD de ambas micobacterias son homólogas (40%) a una del mismo peso molecular en *E. coli*. Las proteínas de 65 kD también pertenecen al grupo de proteínas de stress y presentan un 95% de homología entre ellas y con respecto a la proteína GroEl de *E. coli*.

Haregewoin y col. (1989) continuando los experimentos reportados anteriormente, cultivaron a la línea celular GD con células presentadoras de antígeno autólogas, en presencia de PPD, antígenos de *Candida albicans* y medio de cultivo. Los resultados mostraron una respuesta proliferativa muy marcada frente al PPD y ausente frente a antígenos de *Candida albicans*, reflejando la especificidad de estos linfocitos al PPD, el cual es un extracto crudo que contiene numerosas tuberculoproteínas.

Estos investigadores, también utilizaron un antígeno micobacterial purificado para determinar más eficientemente la especificidad antigénica de los linfocitos T *gamma-delta*. La proteína purificada fue la HSP-65, la cual es el mayor componente del PPD. La línea GD mostró también una vigorosa respuesta a este antígeno, indicando que la HSP-65 micobacterial es una proteína inductora de los linfocitos T *gamma-delta*.

En base a lo visto anteriormente, Born y col. (1990) sugirieron varias posibles funciones para las células *gamma-delta*. Cada subpoblación de células *gamma-delta* podría reconocer específicamente proteínas de stress autólogas. Estas células *gamma-delta* parecen requerir moléculas presentadoras de antígeno clase I, diferentes y poco polimórficas. Este reconocimiento puede conllevar a la activación de las células *gamma-delta* y concomitante destrucción de células blanco o producción de señales primarias para la activación de otros compo-

nentes del sistema inmune, y puede ser la base para la vigilancia inmunológica de los epitelios.

Born y col. (1990) también sugirieron que las células *gamma-delta* pueden reconocer proteínas de stress heterólogas, ya que estos antígenos se encuentran altamente conservados evolutivamente. Las secuencias conservadas de estas proteínas no pueden ser alteradas sin consecuencias fatales para las células que las producen, por lo tanto, las bacterias estarán incapacitadas para escapar a una respuesta inmune contra sus proteínas de stress, por medio de mutación somática.

El hecho de conseguir células *gamma-delta* reactivas a la HSP-65 en el timo murino durante el nacimiento, donde la piel, los intestinos, los pulmones y otras superficies corporales están expuestas por primera vez a los antígenos micobacteriales, sugiere que estas células posiblemente proporcionan respuestas rápidas a estos antígenos críticos, sin la necesidad de expandirse previamente, por lo que actúan como una primera línea de defensa que complementa la respuesta de los linfocitos T *alfa-beta* linfocitos B, los cuales toman más tiempo en desarrollarse (Born *et al.*, 1990).

El reconocimiento antigénico por parte de las moléculas de histocompatibilidad requiere la localización citoplasmática del antígeno. Ambos tipos de proteínas de stress penetran en el compartimiento intracelular y son procesadas en cierta región especializada del aparato de Golgi y posteriormente presentadas en la superficie celular. Tal es el caso de la estimulación por PPD, el cual contiene la HSP-65, pero quizás en forma desnaturada y probablemente degradada. Las proteínas de stress exógenas que no han sido procesadas, serán reconocidas por los linfocitos T *alfa-beta* restringidos por moléculas clase II (Born *et al.*, 1990).

3.4. Células *gamma-delta* en los epitelios:

El sistema inmune de la mucosa es una de las primeras líneas de defensa contra antígenos bacteriales e invasión viral. La epidermis murina contiene una población minoritaria (1%) de células dendríticas derivadas de la médula ósea con el fenotipo $\text{Thy-1}^+ \text{CD4}^- \text{CD8}^-$, lo que ha permitido que no sean consideradas como linfocitos. El Thy-1^+ es un antígeno murino, presente en los timocitos maduros, en los linfocitos T y también en células cerebrales, epiteliales y fibroblastos (Koning *et al.*, 1987; Kuziel *et al.*, 1987).

Los linfocitos T *alfa-beta* y los linfocitos T *gamma-delta* de los tejidos linfoides, recirculan a través de los órganos linfoides y tienen la oportunidad de encontrarse con una diversa constelación de antígenos. Las células dendríticas epidérmicas, sin embargo, son inmóviles, por lo que están incapacitadas para migrar extensivamente a través de las capas epiteliales. Cada una de ellas se encuentra con los pocos queratinocitos que la rodean y la inmunovigilancia ejercida por estas células implica el reconocimiento de antígenos comunes que fueron inducidos por una gran variedad de condiciones ambientales y patológicas (Asarnow *et al.*, 1988). Como ya se ha mencionado, un blanco para estas células podrían ser las proteínas de stress y el reconocimiento de estas proteínas en los queratinocitos por parte de las células dendríticas epidérmicas, puede resultar en su activación y subsiguiente destrucción de los queratinocitos "dañados y/o liberación de IL-2 y otras linfocinas.

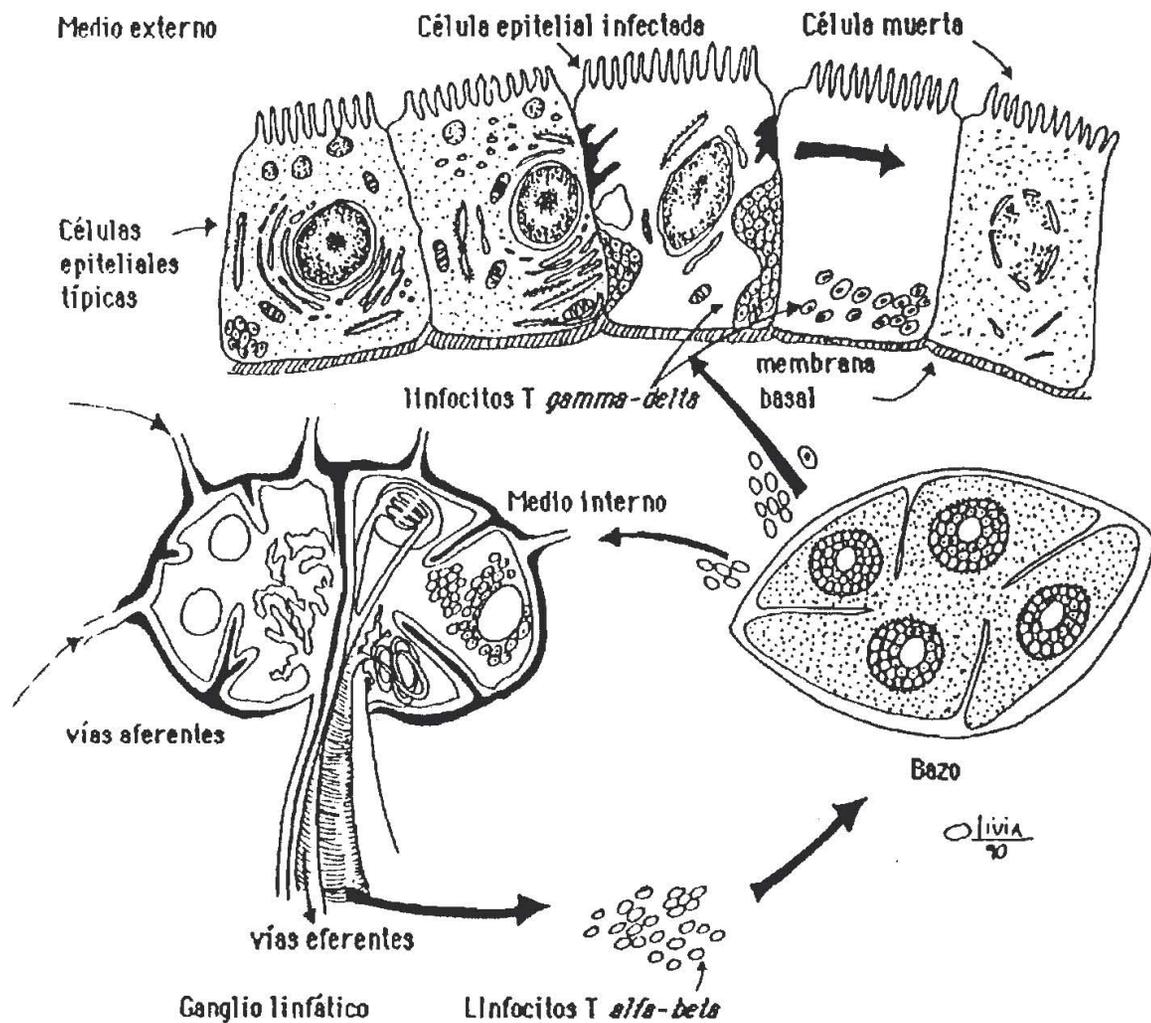


Figura 5. División de funciones entre los linfocitos T *gamma-delta* y los linfocitos T *alfa-beta* en la periferia. Los linfocitos T *alfa-beta* recirculan continuamente desde la sangre hacia las vénulas endoteliales de los ganglios linfáticos, hasta encontrarse con un antígeno en la superficie de una célula presentadora. El sistema de vigilancia involucra muchas interacciones celulares por día, dado el alto grado de especificidad de estos linfocitos. Los linfocitos T *gamma-delta* migran al epitelio donde se asientan en los espacios entre las células epiteliales. Se propone que la infección de una célula epitelial conlleva a la expresión de productos clase I del MHC, que interaccionan con el receptor *gamma-delta*, conllevando a la activación celular y citólisis de la célula epitelial anormal. El sistema de vigilancia involucra pocas interacciones celulares por día, dada la limitada especificidad de estos linfocitos.

En el intestino delgado existen tres áreas linfoides anatómicamente diferenciadas: Las placas de Peyer, la lámina propia de las vellosidades y los linfocitos intraepiteliales que residen en las células columnares de las vellosidades. Estos linfocitos también expresan el receptor *gamma-delta* y son de fenotipo $\text{Thy-1}^+ \text{CD8}^+$. Aparentemente la actividad lítica de estos linfocitos reside en la molécula Thy-1 (Kuziel *et al.*, 1987; Koning *et al.*, 1987, Googman y Lefrancoise y Goodman, 1989).

Aparentemente, los linfocitos intestinales intraepiteliales reaccionan principalmente frente a grandes cantidades de antígenos bacterianos en el intestino delgado, más que antígenos virales, los cuales serían reconocidos por los linfocitos T *alfa-beta*. El sistema inmune de ejercer cierta protección al tracto digestivo desarrolla un sistema de inmunovigilancia en el medio interno, siendo los linfocitos intestinales *gamma-delta* las células que efectúan dicha función (Lefrancoise y Goodman, 1989).

Por lo tanto, la función de las células *gamma-delta* en los epitelios es la de reconocer y destruir células epiteliales alteradas, detectando pequeños cambios en la expresión de un producto génico dada su baja variabilidad y proporcionando un mecanismo de inmunovigilancia que mantiene la integridad de las capas celulares que separan el medio interno del externo. La infección o la transformación de las células epiteliales incrementa la expresión de moléculas clase I del MHC, que serán reconocidas por las células *gamma-delta*, las cuales destruirán las células que las poseen, logrando reconstituir al epitelio original, ya que nuevas células epiteliales llenarán los espacios dejados por la pérdida celular. El reconocimiento y destrucción de estas células epiteliales dañadas debe ocurrir antes de cruzar la membrana basal, donde la vigilancia está a cargo de los linfocitos T *alfa-beta* (Figura 5) (Janeway *et al.*, 1988).

4. CELULAS GAMMA-DELTA y PATOLOGIA: Lepra, Leishmaniasis y enfermedades autoinmunes.

El *Micobacterium leprae* es un parásito intracelular obligado que se multiplica muy lentamente dentro de los fagocitos mononucleados, especialmente los macrófagos de la piel y las células de Schwann del tejido nervioso (Convit *et al.*, 1983). Esta micobacteria produce la lepra, una enfermedad inflamatoria crónica que aparece en el hombre y está caracterizada por notables variaciones clínicas, histopatológicas e inmunológicas, que se extienden desde la lepra tuberculoides hasta la lepra lepromatosa.

La lepra tuberculoides es la forma "benigna" de la enfermedad, es de tipo localizado con formaciones granulomatosas en la dermis, compuestas por células epitelioides e infiltrado más o menos extenso de linfocitos. Se observan muy pocos organismos en las lesiones, debido a la fuerte reacción inmune que genera el hospedador (Convit *et al.*, 1983).

La lepra lepromatosa es más generalizada, con mayor número de lesiones cutáneas y los linfocitos son escasos y de distribución difusa. El infiltrado inflamatorio consiste principalmente de macrófagos con gran número de bacilos en su interior y dentro de las células de Schwann, ya que se desarrolla poca o ningún tipo de inmunidad (Convit *et al.*, 1983).

Debido a la complejidad de la enfermedad, a los distintos tipos de manifestaciones clínicas y a la influencia de la inmuni-

dad celular, ha sido de suma importancia estudiar la participación de las células *gamma-delta* en los procesos inmunológicos que involucran la enfermedad.

Modlin y col. (1989) encontraron que los linfocitos T *gamma-delta* aumentan de 5 a 8 veces en las reacciones lepromatosas y comprenden entre 25-35% de los linfocitos CD3^+ en distintas lesiones, tales como la prueba de lepromina de piel, reacción de reversión (reacción aguda de hipersensibilidad tardía que se caracteriza por la formación de granulomas), mientras que en tejidos linfoides normales, en la lepra tuberculoides, lepra lepromatosa, eritema nodoso leproso y PPD, comprenden el 5% aproximadamente.

Estos investigadores también encontraron que los linfocitos T *gamma-delta* provenientes de pacientes con lepra tuberculoides en reacción reversible y de sangre periférica, proliferaban específicamente frente a antígenos de pared celular del *M. leprae* y al PPD (purificado protéico derivado de *M. Tuberculosis*). Si se suprimía el antígeno no había proliferación celular. Estos linfocitos T *gamma-delta* no reaccionaron frente a las HSP-65 y HSP-18 del *M. tuberculosis*, ni a la toxina del tétano.

La respuesta linfoproliferativa a antígenos de *M. tuberculosis* (PPD) obtuvo valores máximos sólo en presencia de células presentadoras de antígeno autólogas. La no reactividad frente a la HSP-65 pudo deberse a la ausencia de células presentadoras de antígeno. Dado que esta proteína de estrés del *M. tuberculosis* es homóloga a la de 65 kD del *M. leprae*, debería ser reconocida por los linfocitos T *gamma-delta* provenientes de pacientes leproso. La proteína de 18 kD de *M. leprae*, sin embargo no presenta homología con la de 19 kD de *M. tuberculosis*, por lo que no debe ser reconocida por los linfocitos T *gamma-delta*, ya que no es considerada una proteína de estrés (Young *et al.*, 1988; Modlin *et al.*, 1989).

La leishmaniasis americana es un tipo de enfermedad causada por especies relacionadas de parásitos intracelulares y también caracterizada por notables variaciones patológico-clínicas como respuestas del hospedador. La enfermedad se extiende desde la leishmaniasis cutánea localizada, la forma "benigna" de la enfermedad, hasta la leishmaniasis mucocutánea, la forma crónica y destructiva de la enfermedad. Las manifestaciones histopatológicas e inmunológicas, son parecidas a las de la lepra.

Modlin y col. (1989) también encontraron que los linfocitos T *gamma-delta* están presentes en grandes números en las lesiones granulomatosas de la leishmaniasis cutánea localizada, correspondiendo a un aumento de 7 veces (20%) sobre el número de los linfocitos T en sangre periférica de los mismos pacientes, en las reacciones de Montenegro (respuesta de hipersensibilidad tardía de 48 horas a los antígenos de *Leishmania sp.*) o en la leishmaniasis mucocutánea, donde sólo el 5% de los linfocitos T CD3^+ son *gamma-delta* $^+$

La formación de los granulomas, en enfermedades como tuberculosis, lepra y leishmaniasis, parece ser importante para restringir la difusión o expansión de los agentes patógenos. El hecho que los linfocitos T *gamma-delta* se acumulen en estas lesiones, sugiere la posibilidad que estas células o sus productos de secreción juegan un papel importante en su desarrollo (Modlin *et al.*, 1989). Los resultados de Modlin y col. (1989) tam-

bién indican que los linfocitos T *gamma-delta* pueden reconocer antígenos micobacteriales en presencia de células presentadoras de antígeno autólogas, lo que concuerda con los experimentos de Haregewoin y col. (1989).

Los linfocitos T *gamma-delta* se encuentran incrementados en otros tipos de enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoidea y el Síndrome de Sjögren, en comparación con los linfocitos de sangre periférica, por lo que deben estar involucrados en el reconocimiento antigénico y/o inflamación (Brennan *et al.*, 1989).

Van Eden y col. (1988) reportaron que la proteína HSP-65 puede ser el antígeno blanco reconocido por los linfocitos T *gamma-delta* en individuos con artritis reumatoidea, lo que indica que éstos pueden responder específicamente a ciertos antígenos micobacteriales.

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos los valiosos comentarios de las Dras. Moraima Winkler y Fracehuli Dagger. Esta revisión es parte del Seminario Especial de Grado presentado por Olivia Oriol B. en la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Las ideas expuestas son producto del estímulo de los proyectos CONICIT S1-1936 y CDCH-UCV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asanow, D. M., Kuziel, W.A., Bonyhadi, M., Tigelaar, R.E., Tucker, P.W., Allison, J.P. (1988). Limited diversity of *gamma-delta* antigen receptor genes of Thy-1_d dendritic epidermal cells. *Cell* 55: 837-847.
- Bank, L., DePinho, A., Brenner, M.B., Cassimeris, J., Alt, F.W., Chess, L. (1986). A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 322: 179-181.
- Bluestone, J.A., Cron, R.O., Cotterman, M., Houlden, B.A., Matis, L.A. (1988). Structure and specificity of T cell receptor *gamma-delta* on Major Histocompatibility complex antigen-specific CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻ T lymphocytes. *Jour. Exp. Med.* 166: 1899-1915.
- Born, W., Happ, M.P., Dallas, A., Rendon, C., Kubo, R., Shinnick, T., Brennan, P., O'Brien, R. (1990). Recognition of heat shock proteins and *gamma-delta* cell function. *Immunol. Today*, 11: 40-43.
- Borst, J., van de Griend, R.J., van Oostveen, J.W., Ang, S.-L., Melief, C.J., Seidman, J.G., Bolhuis, R. L. H. (1987). A T-cell receptor *gamma* /CS3 complex found on cloned functional lymphocytes. *Nature* 325: 583-588.
- Botino, C., Tambusi, G., Farni, S., Ciccone, E., Varese, P., Mingari, M.C., Moretta, A. (1986). Two subsets of human T lymphocytes expressing *gamma-delta* antigen receptor are identifiable by monoclonal antibodies directed to two distinct molecular forms of the receptor. *J. Exp. Med.* 168: 491-505.
- Brennan, F., Plater-Zyberk, C., Malni, R.N., Feldman, M. (1989). Coordinate expansion of 'fetal type' lymphocytes (TCR Y⁺ T and CD5⁺ B) in rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 77: 175-178.
- Brenner, M.B., McLean, J., Dyalmas, D.P., Strominger, J.L., Smith, J.A., Owen, F.L., Seidman, J.G., Ip, S., Rose, F. (1986). Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322: 145-149.
- Brenner, M.B., McLean, J., Schaff, H., Riberty, J., Ang, S.-L., Seidman, J.G., Davlin, P., Krangel, M. S. (1987). Two forms of the T-cell receptor *gamma* protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 325: 689-694.
- Chien, Y.-H., Iwashima, M., Kaplan, K.B., Eliot, J.F., Davis, M.M. (1987). A new T-cell receptor gene located within the alpha and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 327: 677-682.
- Chien, Y.-H., Iwashima, M., Wettstein, D.A., Kaplan, K.B., Eliot, J.F., Born, W., Davis, M.M. (1987). T-cell receptor *delta* gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* 330: 722-727.
- Conrad, J., Aranzazu, N., Zuhiga, M., Ulrich, M., Pinardi, M.E., Castellazzi, Z., Alvarado, J. (1983). Immunotherapy and immuno prophylaxis of leprosy. *Lepr. Rev. Special Issue*: 47-60.
- Eliot, J.F., Rock, E.P., Patten, P.A., Davis, M.M., Chien, Y.-H. (1988). The adult T-cell receptor *delta*-chain in diverse and distinct from that of fetal thymocytes. *Nature* 331: 627-631.
- Goodman, T., LeFrançois, L. (1988). Expression of the *gamma-delta* T-cell receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 333: 855-858.
- Groh, V., Porcelli, S., Fabbri, M., Lanier, L.L., Picker, L. J., Anderson, T., Warnke, R. A., Bhan, A.K., Strominger, J.L., Brenner, M.B. (1989). Human lymphocytes bearing T cell receptor *gamma-delta* are phenotypically diverse evenly distributed throughout the lymphoid system. *Jour. Exp. Med.* 169: 1277-1294.
- Harks, R., Kronenberg, M., Gallatin, W.M., Weissman, I.L., Owen, F.L., Hood, L. (1986). Rearrangement and expression of T cell antigen receptor and *gamma* genes during thymic development. *J. Exp. Med.* 164: 1-24.
- Haregewoin, A., Soman, G., Hon, R. C., Finberg, R. W. (1989). Human *gamma-delta* T cells respond to mycobacterial heat-shock proteins. *Nature* 340: 309-312.
- Hata, S., Brenner, M. B., Krangel, M.S. (1987). Identification of putative human T cell receptor *delta* complementary DNA clones. *Science* 238: 678-682.
- Havran, W. L., Allison, J. P. (1988). Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* 335: 443-445.
- Hayday, A.C., Saito, H., Gillies, S.D., Kranz, D. M., Tanigawa, G., Eisen, H. N., Tonegawa, S. (1985). Structure organization, and somatic rearrangement of T cell *Gamma*-genes. *Cell* 40: 259-269.
- Hochstenbach, F., Parker, C., McLea, J., Gieselmann, V., Band, H., Bank, I., Chess, L., Spits, H., Strominger, J. L., Seidman, J. G., Brenner, M.B. (1988). Characterization of a third form of the human T cell receptor *gamma-delta*. *J. Exp. Med.* 168: 761-776.
- Janeway, C.A. (1988). Frontiers of the Immune System. *Nature*, 333: 804-806.
- Janeway, C.A., Jones, B., Hayday, A. (1988). Specificity and function of T cells bearing *gamma-delta* receptors. *Immunol. Today* 9: 73-76.
- Koning, F., Singl, G., Yokoyama, W. M., Yamada, H., Maloy, W. L., Tschachler, E., Shevach, E. M., Coligan, J. E. (1987). Identification of a T3-associated *gamma-delta* T cell receptor on Thy-1 dendritic epidermal cell lines. *Science* 238: 834-836.
- Kranz, D. M., Saito, H., Heller, M., Takagaki, Y., Hass, W., Eisen, H. N., Tonegawa, S. (1985). Limited diversity of the rearranged T-cell *gamma* gene. *Nature* 313: 752-755.
- Kuziel, W.A., Takashima, A., Bonyhadi, M., Bergstresser, P. R., Allison, J. P., Tigelaar, R.E., Tucker, P.W. (1987). Regulation of T-cell receptor *gamma* chain RNA expression in murine Thy-1 dendritic epidermal cells. *Nature* 328: 263-266.
- Lanier, L. L., Federspiel, N.A., Ruitenberg, J. J., Phillips, J. H., Allison, J. P., Littman, D., Weiss, A. (1987). The T cell antigen receptor complex expressed on normal peripheral blood CD4⁺ CD8⁻ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165: 1076-1094.
- Lanier, L. L., Weiss, A. (1986). Presence of Ti (WT31) negative T lymphocytes in normal blood and thymus. *Nature* 324: 268-270.
- Lefranc, M. P., Rabbits, T. H. (1985). Two tandemly organized human genes encoding the T-cell *gamma* constant-region sequences show multiple rearrangement in different T-cell types. *Nature* 318: 464-466.
- Lefrançois, L., Goodman, T. (1989). In vivo modulation of cytolytic activity and thy-1 expression in TCR *gamma-delta* intraepithelial lymphocytes. *Science* 243: 1716-1718.
- Loh, E. Y., Cwirica, S., Serafini, A. T., Phillips, J. H., Lanier, L. L. (1988). Human T-cell receptor *delta* chain: Genomic organization, diversity, and expression in populations of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 9714-9718.
- Loh, E. Y., Eliot, J.F., Cwirica, S., Lanier, L. L., Davis, M. M. (1989). Polymerase chain reaction with single-stranded specificity: Analysis of T cell receptor *delta* chain. *Science* 243: 217-220.
- Matis, L. A., Cron, R., Bluestone, J. A. (1987). Major histocompatibility complex-linked specificity of *gamma-delta* receptor-bearing T lymphocytes. *Nature* 330: 262-264.
- Modin, R. L., Pirmez, C., Holman, F. M., Torigan, V., Uyemura, K., Rea, T. H., Bloom, B. R., Brenner, M. B. (1989). Lymphocytes bearing antigen-specific *gamma-delta* T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 339: 544-548.
- Murre, C., Waldmann, R. A., Morton, C. C., Bongiovanni, K. F., Waldmann, T. A., Shows, T. B., Seidman, J. G. (1985). Human *gamma* chain genes are rearranged in leukemic T cells and map to the short arm of chromosome 7. *Nature* 318: 549-552.
- Mustelin, T., Altman, A. (1989). Do CD4 and CD9 control T-cell activation via a specific tyrosine protein kinase? *Immunol. Today* 10: 189-192.
- O'Brien, R. L., Happ, M. P., Dallas, A., Palmer, E., Kubo, R., Born, W.K. (1980). Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor *gamma-delta* by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 57: 667-674.
- Pardoll, D. M., Fowlkes, B. J., Bluestone, J. A., Krusiek, A., Maloy, W. L., Coligan, J. E., Schwartz, R. H. (1987). Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 328: 79-84.
- Pfeffer, F.I., Kim, C.W., Fisher, K.H., Sabga, E. M., Kradin, R.L., Colvin, R. B. (1989). Identification of pre-T cells in human peripheral blood. Extrathymic differentiation of CD7⁺ CD3⁻ cells into CD3⁺ *gamma-delta*⁺ or *alpha-beta*⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 170: 177-190.
- Quertemous, T., Strauss, W., Murre, C., Dyalmas, D. P., Strominger, J.L., Seidman, J. G. (1986). Human T-cell *gamma* genes contain N segments and have marked junctional variability. *Nature* 322: 184-187.
- Rautel, D. H. (1989). Antigen for *gamma-delta* T cells. *Nature* 339: 342-343.
- Rautel, D.H., Garman, R. D., Saito, H., Tonegawa, S. (1985). Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314: 103-107.
- Reinherz, E. L., Acuto, O., Fabbri, M., Bensussan, A., Milanesi, C., Royer, H. D., Meuer, S.C., Scholesman, S. F. (1984). Clonotypic surface structure on human T lymphocytes: Functional and biochemical analysis of the antigen receptor complex. *Immunol. Rev.* 81: 95-129.
- Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A.C., Eisen, H. B., Tonegawa, S. (1984). Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309: 757-762.
- Snodgrass, H. R., Dembic, Z., Steinmetz, M., Von Boehmer, H. (1985). Expression of T-cell antigen receptor genes during fetal development in the thymus. *Nature* 315: 232-233.
- Takagaki, Y., DeCloux, A., Bonville, M., Tonegawa, S. (1989). Diversity of *gamma-delta* T cell receptors on murine intraepithelial lymphocytes. *Nature* 339: 712-714.
- Triebl, F., Hercend, T. (1989). Subpopulations of human peripheral T *gamma-delta* lymphocytes. *Immunol. Today* 10: 186-188.
- Van Eden, W., Thole, J.E.R., Van Der Zee, R., Noordzij, A., Van Embden, J. D. A., Hensen, E. J., Cohen, I. R. (1988). Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331: 171-173.
- Winolo, A., Baltimore, D. (1989). Separate lineages of T cells expressing the *alpha-beta* and *gamma-delta* receptors. *Nature* 338: 430-432.
- Young, D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweeter, D., Young, R. A. (1988). Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 4267-4270.