

R. 26.229



Te 612.112
Riv

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

BIBLIOTECA UCM



5301456749

**PROPIEDADES INMUNO REGULADORAS
DE LOS LINFOCITOS CD3+CD4-CD8-
(DOBLE NEGATIVOS)**

Javier Rivera Redondo

Madrid, 1993

Colección Tesis Doctorales. N.º 82/93

X-53-069367-3

© Javier Rivera Redondo

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1993.

Ricoh 3700

Depósito Legal: M-6016-1993



La Tesis doctoral de D. Javier Rivera

Redondo

titulada Propiedades inmunorreguladoras
de los linfocitos CD3+CD4-CD8- (doble negativos)

Director Dr. D. Luis Carreras Pérez

fue leída en la Facultad de MEDICINA de la
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

el día 2 de Julio de 1992 ante el tribunal constituido
por los siguientes Profesores:

Presidente Carlos Pérez Aguirre

Vocal Vicente Rodríguez Valverde

Vocal Joaquín Soto Melo

Vocal Enrique Noguera Hernández

Secretario Indalecio Montealegre Sáez

habiendo recibido la calificación de Apta con

honores por unanimidad

Madrid, a 2 de Julio de 1992

El Secretario del Tribunal,

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

PROPIEDADES INMUNO REGULADORAS
DE LOS LINFOCITOS CD3+CD4-CD8-
(DOBLE NEGATIVOS)

JAVIER RIVERA REDONDO

1992

(Dirigida por el Dr.L. Carreño Pérez)

A mi hijo Javier

A mi madre

A la memoria de mi padre

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
- FACULTAD DE MEDICINA

"Propiedades inmuno reguladoras de los linfocitos CD3+CD4-
CD8- (Doble Negativos)."

Trabajo presentado para optar al grado
de Doctor en Medicina y Cirugía por D.Javier Rivera Redondo,
bajo la dirección del Profesor D.Luis Carreño Pérez.

1992



Departamento de Medicina

*Facultad de Medicina
Universidad Complutense*

28040 Madrid

DR. D. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA. U.C.M.

INFORMA: Que este Departamento no tiene ningún inconveniente en que D. Javier Rivera Redondo, presente su Tesis Doctoral titulada: "PROPIEDADES INMUNORREGULADORAS DE LOS LINFOCITOS CD3+CD4-CD8- (DOBLE NEGATIVOS)", bajo la dirección del Profesor D. Luis Carreño Pérez, para proceder a su lectura y defensa ante Tribunal y, de esta manera, poder optar al Grado de Doctor.

Lo que firmo en Madrid a catorce de Mayo de mil novecientos noventa y dos.

EL DIRECTOR,

Fdo.: Prof. Dr. Carlos Perezagua Clamagirand



Dr. D.Luis Carreño Pérez, Jefe de Servicio de Reumatología del Hospital General Gregorio Marañón y Profesor Asociado de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Certifica: que D. Javier Rivera Redondo ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado " Propiedades inmuno reguladoras de los linfocitos CD3+CD4-CD8- (doble negativos) ", y expresa formalmente que reúne las condiciones exigibles para su presentación con el fin de acceder al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste donde proceda, firmo la presente en Madrid, a 5 de Mayo de 1992.

Luis Carreño

Fdo. Dr. D Luis Carreño Pérez

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. D.Luis Carreño por la dirección de esta tesis y por su apoyo.

- Al Hospital Gregorio Marañón y a la Consejería de Salud de la Comunidad de Madrid por las facilidades prestadas para la realización del trabajo.

- Especial agradecimiento a mis compañeros Jesús Alonso, Alfonso Ariza, Aurelio García Monforte, Javier López Longo y Indalecio Monteagudo, del Servicio de Reumatología, sin cuya colaboración hubiera sido imposible realizar el trabajo de esta tesis.

- Toda mi gratitud para el Dr. David Horwitz por sus enseñanzas, orientación y por la oportunidad que me brindó de trabajar en su laboratorio.

- A todos los miembros del laboratorio de The Division of Immunology and Rheumatology, Department of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, por su ayuda.

INDICE

Introducción	1
Justificación	9
Objetivos	10
Material y Métodos	12
Resultados	23
Discusión	36
Conclusiones	61
Resumen	65
Tablas y Figuras	67
Abreviaturas	104
Bibliografía	105

INTRODUCCIÓN

La capacidad del linfocito para reconocer proteínas propias y extrañas y relacionarse con otras células es fundamental en la función del sistema inmune. La estructura mediante la cual el linfocito T reconoce al antígeno es el llamado receptor de la célula T (TCR) (1). Al igual que otras muchas moléculas de la superficie de los linfocitos que sirven para relacionarlos con el medio exterior o con otras células, el TCR pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs) (2). La configuración de estas moléculas es similar en todas ellas y está formada por una serie de cadenas que se pliegan sobre sí mismas para formar la estructura que se relaciona con el exterior (3).

Una de las primeras moléculas en conocerse bien, y que da el nombre a este grupo de proteínas, fueron las inmunoglobulinas (Igs) que son los receptores del linfocito B (4). Las Igs están formadas por dos cadenas

pesadas y otras dos ligeras cada una con sus porciones variables y constantes (5). La unión de la zona variable de una cadena pesada con la zona variable de otra ligera forma el sitio de reconocimiento del antígeno (6). Las Igs son producidas por el linfocito B y se vierten al medio donde reconocen al antígeno en forma soluble.

Se supuso que también el linfocito T tendría su receptor para el antígeno, pero no fue hasta 1982 cuando se aisló y se clonaron los genes que codifican sus cadenas (1,7,8). Pronto se vio que era un heterodímero compuesto por dos cadenas llamadas α y β , unidas por puentes disulfuro. En ambas cadenas existen una serie de zonas codificadas por distintos genes y que constituyen la región constante y la región variable de las cadenas. Nuevamente la unión de ambas zonas variables crea una estructura que es precisamente la zona mediante la cual el linfocito T reconoce al antígeno (9). Cada una de estas cadenas está codificada por una serie de genes denominados V (variable), J (de unión), D (diversidad) (este último sólo para las cadenas β) y C (constante), dependiendo de las regiones de la cadena que codifican (10,11, rev. en 9). Existe un número variable de genes V, J y D, normalmente entre 50 y 100, que una vez reordenados se combinan de distintas maneras y se unen a la parte constante de la cadena, dando lugar a una gran diversidad de moléculas distintas (12).

A diferencia de las Igs, el TCR es una

estructura fija en la célula que no se vierte al medio. Es capaz de reconocer al antígeno siempre que sea presentado por otras células llamadas células presentadoras de antígeno (13). Estas células presentadoras tienen entre sus funciones la misión de metabolizar en parte al antígeno para que pueda ser reconocido por el linfocito a través del TCR ya que no es capaz de reconocer al antígeno soluble como le ocurre al linfocito B (14).

Existe una gran diversidad de TCRs, uno por cada antígeno conocido. Esta gran variación traería consigo la necesidad de una enorme información genética y sin embargo los genes que codifican estas estructuras no ocupan demasiado espacio en los cromosomas. Como en el caso de la Igs, el TCR tanto para las cadena α y β como γ y δ , consiguen esta variación gracias a la reordenación de los genes que codifican los segmentos V, D, J y C para dar lugar a genes funcionales que constituyen el llamado repertorio de la célula T (12,15).

Pero el TCR es sólo un receptor que reconoce al antígeno. La molécula que se encarga de transmitir la señal al interior de la célula para poner en marcha los mecanismos de activación se vio que era el complejo conocido como CD3 (7,16). Esta molécula se encuentra invariablemente unida al TCR y por lo tanto la expresan todos los linfocitos T pero no los B. También pertenece a la superfamilia de las Igs y está formada por al menos cinco cadenas que son las

encargadas de generar las reacciones químicas que ponen en marcha la activación de la célula (16).

Más tarde se describieron otra serie de moléculas pertenecientes también a la superfamilia de las Igs y que eran de gran importancia en la función del reconocimiento del antígeno. Entre estas, las moléculas CD4 y CD8 dividieron a los linfocitos T extratímicos en dos subpoblaciones mutuamente excluyentes y con distintas características funcionales (17). A los linfocitos CD4+ se les atribuyó una acción cooperadora en la producción de Igs por las células B y se les llamó linfocitos T cooperadores. Por el contrario, los CD8+ se ha visto que tienen una función supresora unida a la capacidad de lisar a otras células cuando están activados y son los linfocitos T citotóxicos/supresores (18).

Aunque hoy día se sabe que la especialización en la función de estos linfocitos no es tan clara se los sigue dividiendo en respecto a estas dos moléculas. Se ha podido comprobar que las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) también juegan un papel esencial en el reconocimiento del antígeno (19,20). Los linfocitos T reconocen al antígeno presentado por el MHC de las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos CD4+ reconocen al antígeno en relación con las molécula MHC tipo II (19) mientras que los linfocitos CD8+ lo hacen con las moléculas MHC tipo I (20). Probablemente en la forma de reconocer al

antígeno radique la diferente función de los linfocitos T.

Los linfocitos T de sangre periférica son portadores en su mayoría de las moléculas accesorias CD4 o CD8. Sin embargo, un pequeño porcentaje de alrededor del 3% del total de las células periféricas mononucleares (PBMc) no expresa ninguno de estos marcadores y a estos linfocitos T CD3+CD4-CD8- se les ha llamado linfocitos doble negativos (DN) (21-23). Por una serie de razones, entre las que se encuentran el pequeño porcentaje de estas células en sangre periférica y otros tejidos, y el hecho de su reciente descripción, los linfocitos DN no han sido estudiados con tanta profundidad.

En el desarrollo ontogénico de los linfocitos T hay un momento en el cual las células que pueblan el timo son portadoras del fenotipo DN CD3+CD4-CD8- pero evolucionan hacia la madurez expresando las moléculas CD4 o CD8 y abandonando el timo como células maduras (24). El origen de los linfocitos DN lo discutiremos más adelante, pero parece fuera de toda duda que también son células maduras y por lo tanto deben desempeñar un papel específico en la respuesta inmune (25).

Recientemente se ha visto que existe además otro TCR formado por unas cadenas distintas a las $\alpha\beta$ (26,27). Se sabía que había un gen denominado δ que se expresaba en las primeras fases del desarrollo ontogénico de

los linfocitos pero no se había encontrado su expresión en las células maduras (28). Lanier 1986 y Brennen 1986 (26,27) de forma separada y casi al mismo tiempo describieron que existía una subpoblación de linfocitos maduros portadores de un TCR con cadenas diferentes a las $\alpha\beta$ y que llamaron $\gamma\delta$. Más tarde se vio que estas células no sólo se encuentran presentes en sangre periférica sino también en todos los órganos linfoides en cantidades variables entre el 1-10% (22,23,29-33, rev. en 33).

La distribución del TCR $\gamma\delta$ entre la población de linfocitos es diferente a la que tiene el TCR $\alpha\beta$. Mientras que casi todos los linfocitos CD4+ y la mayoría de los CD8+ expresan el TCR $\alpha\beta$, el TCR $\gamma\delta$ es expresado por alrededor del 25% de los linfocitos CD8+, un mínimo porcentaje de linfocitos CD4+ y por el 78% de los linfocitos DN (30). Por lo tanto, la población de linfocitos DN está formada por dos grupos, uno de linfocitos DN $\gamma\delta$ que constituye aproximadamente el 75% de la población, y el otro, formado por un 25%, y que son linfocitos DN $\alpha\beta$ (22,23). La molécula accesoria CD3 es común para ambos tipos de receptor (7,16).

El papel que los linfocitos DN, $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, desempeñan en el entramado de la respuesta inmune no está completamente dilucidado. La capacidad supresora o estimuladora, su relación con otros linfocitos, el reconocimiento del antígeno en asociación al MHC clase I o clase II, la capacidad citotóxica y todas las

características funcionales tan bien descritas en los linfocitos CD4+ o CD8+, no están del todo estudiadas en estas células y constituye el campo actual de trabajo de numerosos investigadores.

Se sabe que el linfocito $\gamma\delta$ tiene un escaso repertorio, a diferencia de lo que ocurre con el $\alpha\beta$ TCR (34). En sangre periférica, por ejemplo, la mayoría de los linfocitos $\gamma\delta$ muestra un TCR con el segmento V γ 9 en asociación con el segmento V δ 2 (35). Es como si existiera una expansión clonal. Por otro lado, algunos investigadores han encontrado que los linfocitos $\gamma\delta$ reconocen y reaccionan ante las proteínas del estrés (hsp), expresadas en aquellas células alteradas por diferentes estímulos nocivos (36). Por último, se ha encontrado una peculiar distribución de las células $\gamma\delta$ en los epitelios mucosos de algunas especies como el ratón (33). Todos estos datos han llevado a pensar que los linfocitos DN $\gamma\delta$ juegan un papel importante en la vigilancia inmune actuando como una primera línea de defensa frente a la agresión (37).

Algunos de los linfocitos DN tienen un desarrollo ontogénico fuera del timo y por tanto existe la sospecha de que no han sido sometidos a los mecanismos de selección natural que garantizan el reconocimiento de las propias estructuras y la no reactividad frente a antígenos del propio individuo (38). Este aspecto tiene implicaciones muy importantes pues en situaciones patológicas en las que

exista una alteración en la regulación inmune, estas células pueden tener capacidad autoreactiva y estar envueltas en procesos de autoinmunidad.

En este sentido, en el lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad caracterizada por una rotura de la tolerancia del sistema inmunitario hacia los antígenos del propio individuo (39), se ha visto que la población de linfocitos DN $\alpha\beta$ está aumentada (40). Asimismo, se han encontrado clones celulares derivados de linfocitos DN $\alpha\delta$ o DN $\alpha\beta$ de estos pacientes con un claro comportamiento autoreactivo pues son capaces de aumentar la producción de anticuerpos anti-DNA (41). Por otro lado, en los ratones autoinmunes MRL lpr/lpr, que desarrollan de forma espontánea una enfermedad bastante parecida al LES humano y que se estudia como una forma experimental de esta enfermedad, también existe una enorme expansión de las células DN $\alpha\beta$ (42). En otro tipo de enfermedad autoinmune humana como es la artritis reumatoide (AR), las células $\alpha\delta$ se encuentran anormalmente elevadas (43).

JUSTIFICACIÓN

Todos estos datos sugieren que la población de linfocitos DN desempeña un papel todavía no conocido en la regulación inmune.

Como sea que en las enfermedades autoinmunes existe una profunda alteración de esta regulación que se pone de manifiesto por el hallazgo constante de células autoreactivas y de una excesiva producción de anticuerpos contra las estructuras del propio organismo, y que por otro lado, se han encontrado alteraciones cuantitativas y cualitativas de la población de células DN en estas enfermedades, es por lo que hemos pensado que los linfocitos DN pueden tener un protagonismo importante en la regulación de la formación de anticuerpos. El estudio de la función reguladora de los linfocitos DN sobre la producción de anticuerpos por las células B a través de la interacción de los linfocitos CD4, ha sido el motivo principal de este trabajo.

OBJETIVOS

- Estudiar la capacidad reguladora de los linfocitos CD3+CD4-CD8- (Doble negativos) en personas sanas en relación con la producción de inmunoglobulinas dependientes de la célula T.
- Determinar la diferencia que existe entre los linfocitos DN en reposo y activados en lo referente a esta capacidad reguladora.
- Determinar las diferencias que existen en la regulación de la producción de Igs entre las dos subpoblaciones ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) que componen los linfocitos DN.
- Estudiar las características funcionales de las células DN en cultivo, en lo referente a la capacidad de proliferación, comparándolas con otras poblaciones conocidas de linfocitos.
- Determinar si el fenotipo de los linfocitos DN se

modifica tras la estimulación en lo referente a la expresión del TCR y de las moléculas CD4 y CD8.

- Determinar si la capacidad reguladora de los linfocitos DN necesita del reconocimiento del MHC, al igual que otras funciones de los linfocitos.

- Verificar la función de las células nulas CD3-CD4-CD8- en lo referente a la producción de inmunoglobulinas y determinar si esta población celular tiene capacidad supresora.

- Determinar si el efecto supresor anteriormente descrito para los linfocitos CD8+ depende en alguna medida de su interacción con las células DN.

MATERIAL

Y

MÉTODOS

Anticuerpos monoclonales

En estos experimentos se han utilizado los siguientes anticuerpos monoclonales (AcM).

Para los cultivos, separación de células por citofluorografía y separación por medio de cuentas inmunomagnéticas, se han utilizado los sobrenadantes de cultivos de hibridomas de ratón productores de anti-CD2, subtipos GT2 (cedido por A. Bernard) (44) y OKT-11 (ATCC, Bethesda, Maryland), anti-CD4 408.1 (W. Stohl), anti-CD8 284.1 (W. Stohl), anti-CD3 454 (W. Stohl) (16), anti-CD16 3G8 (J. Unkeless), anti-CD56 NKH-1 (Coulter immunology), anti-

CD11b OKM-1 (ATCC) and anti-HLA DR (CD74) L-243 (ATCC) y anti-FFB (anti-IgG2 isotipo) (D.Posnett) (45).

También se han usado los siguientes ACM purificados: anti-CD4 (Leu 3), anti-CD3 (Leu 4), anti-CD8 (Leu-2), anti-CD56 (Leu 19), anti-CD20 (Leu 16) y anti-receptor $\alpha\beta$ (WT-31) conjugados, o no, con fluoresceína o ficoeritrina y adquiridos a Becton Dickinson (Mountain View, California). El anticuerpo contra el receptor $\alpha\beta$ de la célula T, anti-TCR δ 1, fue amablemente proporcionado por el Dr. R. Modlin (UCLA, Los Angeles, USA) (46). El anticuerpo anti-receptor $\alpha\beta$ fue amablemente proporcionado por el Dr. Kurrle (Behringwerke Research Laboratories, Marburg/Lahn, West Germany) (47). Estos últimos ACM se han usado para la separación celular y para analizar el fenotipo de las diferentes subpoblaciones celulares. Por último, se ha usado un ACM de cabra anti-ratón marcado con fluoresceína (Cal Tag, South San Francisco, California) como segundo anticuerpo.

Subpoblaciones celulares

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMc) se han obtenido a partir de muestras de sangre total heparinizada, obtenida por venopunción, o de la banda de centrifugación de las células blancas (buffy coat) de unidades de sangre procedentes de donantes sanos (preparación de leucocitos). Después de centrifugar la

sangre contra un gradiente de Ficoll-Hypaque (Nycomed, Oslo, Noruega), las PBMc se lavaron dos veces en PBS y a continuación se resuspendieron en medio completo (MC) compuesto por RPMI 1640 con 10% de suero fetal de ternera (Irvine Scientific, Santa Ana, California), 2 mM de L-glutamina (Irvine Scientific), 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomina (Irvine Scientific) a la concentración de 10^6 /ml. De esta población de PBMc se obtuvieron las diferentes subpoblaciones celulares de la siguiente forma:

a.- Linfocitos CD3+CD4-CD8- (DN)

Las PBMc obtenidas anteriormente se añadieron a una columna de nylon-lana. Después de incubarlas durante 1 hora a 37°C, 5% CO₂, 95% humedad relativa, la fracción de células no adherentes se centrifugó contra un gradiente de Percoll al 62.5% (Pharmacia, Uppsala, Suecia) para eliminar los eritrocitos contaminantes. A continuación se tiñó la superficie (ver más abajo tinción del fenotipo) con AcM anti-CD4, CD8, CD16, NKH-1 y anti-DR y se hizo una separación negativa por citometría de flujo, según se describe en otro apartado. Para eliminar las células DN α se añadió anti- δ 1 al cóctel de AcM anteriormente descrito.

En los experimentos en los que se usaron células DN previamente activadas con interleuquina-2 (IL2), éstas se trataron con IL2 recombinante (Biogen, Westwood, Massachussets) (2×10^4 u/mg) 100u/ml, a 37°C durante un período de tiempo entre 2 y 18 horas. Después se lavaron 3 veces con PBS para eliminar toda la IL2 antes de incorporarlas a los cultivos. Así se obtuvieron las células preactivadas DN-IL2.

b.- Linfocitos CD4+

Una parte de las células no adheridas a la columna de nylon-lana se tiñó con anti-CD8, CD16, CD56 y anti-DR y se incubaron con cuentas inmunomagnéticas (Dynal, Oslo, Noruega) (ver más abajo separación con cuentas inmunomagnéticas) durante 30 minutos a 4°C, agitando frecuentemente, y a continuación se separaron las células positivas con un imán. Esta separación se repitió al menos 2 veces en cada experimento. La fracción negativa constituyó la subpoblación de linfocitos CD4+.

c.- Linfocitos CD8+

El método de obtención es exactamente igual que el utilizado para obtener los CD4+

cambiando el AcM anti-CD8 por anti-CD4.

d.- Linfocitos B

Para obtener los linfocitos B, se extrajo el nylon-lana de la columna, se deshizo con unas pinzas y se lavó varias veces con PBS recogiendo las células adheridas. Se lavó dos veces con PBS y a continuación se resuspendieron en MC. Posteriormente se centrifugó contra un gradiente de Percoll al 42.5% (Pharmacia) para eliminar los monocitos que permanecen en la interfase.

El precipitado de células se incubó con eritrocitos de carnero previamente tratados con AET (2-aminoethyl-isothio-uronium bromide hydrobromide) (Sigma) para que formen rosetas, y mediante centrifugación contra un gradiente de Ficoll se obtuvo la fracción negativa (E-) que queda en la interfase (48,49). Esta fracción E- se trató entonces con una solución 40 Mm de LME (L-leucin-metil-ester) (Sigma) (50) durante 30 minutos a 37 °C para lisar monocitos y células NK, y a continuación se lavó con PBS frío 3 veces para eliminar completamente los restos de LME. Los linfocitos B así obtenidos se resuspendieron en MC a una concentración de 10^4 células/ml.

En los experimentos en los que se usaron células B activadas, los linfocitos B se trataron con paredes celulares de S.aureus fijadas con formalina (SAC) (Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland) a concentraciones de 1/20.000 o 1/40.000 y se cultivaron en una placa de cultivo con fondo plano de 24 pozos (Flow Labs, McLean, Virginia) con 2 ml de MC durante 18 horas, a 37°C y 5% de CO₂. Después de ese tiempo se pueda ver como las células B han formado pequeños acúmulos si la estimulación ha tenido éxito. A continuación se lavaron 3 veces con PBS antes de ponerlas en cultivo con otras células y se resuspendieron en MC a una concentración de 10⁶ células/ml, obteniéndose así los linfocitos preactivados o Sac-B.

e.- Células CD3-CD4-CD8- (Células Nulag)

Estas células se obtuvieron de dos formas diferentes. La primera, teniendo las células de la fracción no adherente a la columna de nylon-lana con un cóctel de ACM a base de anti-CD3, CD4, CD8, CD16, NKH-1 y anti-DR. A continuación se hizo una selección negativa con cuentas inmunomagnéticas.

En la segunda forma, el total de PBMC se

incubó con eritrocitos de carnero para la formación de rosetas, como hemos explicado anteriormente, se recuperó la fracción negativa y se tiñó con el mismo cóctel de ACM y por último se hizo una separación con cuentas inmunomagnéticas.

Condiciones de cultivo para la producción de inmunoglobulinas

Las células CD4 en número de 2.5×10^4 se cultivaron con 5×10^4 linfocitos B o Sac-B en placas de cultivo de 96 pozos con fondo plano (Flow Labs). Se añadieron diferentes concentraciones de células DN o DN-IL2, habitualmente 10^3 , 10^4 , 2.5×10^4 y 5×10^4 células/pozo hasta un volumen final de 200 ul/pozo. Estos cultivos se estimularon con una combinación óptima de anti-CD2 (OKT-11 al 1/100 y GT2 al 1/50) (51) y se incubaron a 37°C, 95% de humedad relativa y en ambiente de CO2 al 5%. Después de 7 días se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y se almacenaron a -40°C, hasta su utilización. En algunos experimentos se añadió 10ul de anti-TCR61 o anti-FFB a los cultivos.

Tinción del fenotipo

Las células a teñir se resuspendieron en RPMI 1640 a una concentración entre $1-10 \times 10^6$ células/ml. En una placa de cultivo flexible de PVC con 96 pozos de fondo

redondeado (Dynatech) se pusieron 0.2 ml de la suspensión de células (2×10^5) en pozos alternativos, se centrifugó para precipitar las células en el fondo del pozo y se eliminó el sobrenadante. A continuación se añadieron los AcM en cantidades suficientes de saturación y se incubó a 42C en agitación continua. Después de 30 minutos se lavaron las células 2 veces con PBS y se añadió, en el caso de que el primer AcM no estuviera conjugado, el segundo AcM de cabra anti-ratón marcado con fluoresceína (Cal Tag) y se incubó nuevamente en las mismas condiciones. Después de la incubación se lavó con PBS para eliminar el sobrante de AcM conjugado y se resuspendió en MC a una concentración de 10^6 células/ml.

Las células se mantuvieron en la oscuridad a 42C hasta ser analizadas. Si no podían ser analizadas el mismo día, las células se fijaban en paraformaldeído al 1% a pH 7.2 hasta durante una semana.

Análisis y separación de células por citometría de flujo

Se utilizó un citofluorógrafo del tipo FACstar plus (Becton Dickinson, Mountain View, California) para analizar y separar las diferentes subpoblaciones celulares. Este citómetro de flujo usa un láser de argón que se utilizó en una longitud de onda de 488 nm para la excitación de fluoresceína y de ficoeritrina.

Una vez teñida la superficie celular con los distintos ACM como se ha descrito anteriormente, las células fueron resuspendidas en RPMI 1640 con 2% de suero fetal de ternera y divididas en alícuotas a una concentración entre de $2-5 \times 10^6$ células/ml. Se abrió una ventana sobre los linfocitos, eliminando electrónicamente con el "forward light" y el "90° light scatter" los monocitos, blastos, eritrocitos, células muertas y otros restos celulares. Se separaron los diferentes tipos de linfocitos mediante los "scatters" de fluorescencia FL1 y FL2, haciendo siempre una separación negativa, es decir, excogiendo sólo los linfocitos no teñidos con ACM (52).

Para el análisis del fenotipo, las células fueron resuspendidas en MC a una concentración de 0.1×10^6 /ml y analizadas con el mismo citómetro, de la misma forma.

Separación de células por cuentas inmunomagnéticas

Las células no adherentes eluidas de la columna de nylon-lana fueron teñidas según se ha explicado previamente con los ACM específicos según la población a separar. Se lavaron dos veces con RPMI 1640 con 2% de FCS y se añadieron cuentas recubiertas con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Dyna1) en número de 10^7 células. Se incubó a 4°C durante 30 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos. A continuación se añadieron 5 ml de RPMI 1640 2% FCS frío y se puso el tubo conteniendo las

células en un imán durante otros 2 minutos. Las células en suspensión se recolectaron cuidadosamente con una pipeta Pasteur. Este ciclo se repitió al menos 2 veces en cada una de los experimentos. Con este procedimiento los linfocitos fueron separados también de forma negativa.

Quantificación de inmunoglobulinas

La cuantificación de IgG e IgM se hizo mediante un ELISA directo de la siguiente forma, según se ha descrito anteriormente (53). De una forma resumida, una placa de cultivo de 96 pozos con fondo plano (Flow Labs) se incubó con anticuerpo de cabra anti-IgG, IgM e IgA humanas (Zymed, California) a 4°C en bufer carbonato 0.05 M a Ph 9.6. Después de 18 horas, se añadió PBS con 10% de suero fetal de ternera y se mantuvo 2 horas a 37°C, lavándose a continuación tres veces con ClNa 0.9% y Tween 20 0.05%. Se añadieron los sueros problema a diferentes diluciones y se cultivó 1.5 horas a 37°C. De la misma forma se prepararon diluciones standard de IgG e IgM procedentes de mieloma humano (Jackson, California). Después de la incubación, las placas se lavaron 3 veces y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG o IgM humanas conjugado con HRP (horse radish peroxidasa conjugated) (Zymed) durante 1.5 horas a 37°C. Por último se reveló con OPD (O-phenylenediamina) (Sigma) en bufer citrato y se paró la reacción con una solución 6N de SO_3H_2 , y por último se midió la densidad óptica de los diferentes pozos con un lector óptico (Bio-Rad).

La equivalencia entre la densidad óptica y los mg correspondientes de Igs se hizo mediante un análisis de regresión con el programa Mystal en un computador McIntosh.

Proliferación

Las células DN o PBMc se cultivaron por triplicado a una concentración de 10^5 células/0.2 ml en MC en placas de cultivo de fondo plano con 96 pozos (Flow Labs) a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO_2 . Los cultivos fueron estimulados con PHA 0.5 ug/ml o IL2 recombinante 100 U/ml (Biogen). Después de 3 días de cultivo, se midió la incorporación de timidina a las células añadiendo 1 uCi/pozo de timidina tritiada [3H] (6.7 Ci/Mm) (ICN radiochemicals, Irvine, California) y se cultivó durante 18 horas más. A continuación se recolectaron las células en un filtro de fibra de vidrio y se midió la radiactividad en un contador β . El resultado se expresa en cpm.

RESULTADOS

Grado de pureza de las diferentes poblaciones celulares

El porcentaje de linfocitos DN, definidos por el fenotipo CD3+CD4-CD8-, entre las PBMc fue de $3.6\% \pm 1.9$ con un rango entre 0.8-7% entre una población total de 24 donantes sanos que se usaron en estos estudios (figura 1). Después del proceso de separación, la pureza final de las células DN utilizadas en los experimentos de supresión fue de $87\% \pm 9$ con un rango de 83-92% (figura 2). Cuando se determinó el fenotipo de esta población con una combinación de anti-CD3, CD4, CD8 y anti- δ 1, el 74% de los linfocitos CD3+CD4-CD8- eran δ positivos mientras que el 26% eran CD3+ DN δ 8 (tabla 1).

Invariablemente en esta población purificada de células DN hubo una pequeña cantidad de células nulas (CD3-CD4-CD8-) contaminantes que osciló entre el 6-9% con una media de $8\% \pm 1.8$. Esta pequeña contaminación fue debida a que la población de células DN se obtuvo siempre mediante una separación negativa para no imprimir ninguna posible

señal de activación a las células con los diferentes ACM utilizados para la separación.

En los primeros experimentos, cuando las células DN fueron obtenidas directamente de los donantes y no a través de las preparaciones de leucocitos del banco de sangre, el porcentaje de células nulas fue siempre muy superior, tanto entre las diferentes PBMc como al final del proceso de separación. Las PBMc obtenidas a partir de las preparaciones de leucocitos de los "buffy coats" siempre tuvieron un número menor de células nulas (Rivera J y Horwitz D, datos no publicados).

La población de linfocitos CD4+, definidos por el fenotipo CD4+CD8- fue de $86\% \pm 3$ (rango 72-96%) y la población de linfocitos CD8+ (CD4-CD8+) fue 85 ± 4 (rango 82-87%).

La pureza de los linfocitos B (CD20+CD3-) fue del $84\% \pm 12$ con un rango entre el 51-86%. El análisis del fenotipo de estas células se hizo 18 horas más tarde de su obtención debido a que inmediatamente después del tratamiento con LME todavía quedan células que aunque no son viables, siguen manteniendo la forma y por tanto son analizadas como tales por el citofluorógrafo. Después de ese tiempo, todas esas células se han destruido por la acción del LME y el conteo se hace sólo sobre células viables (Gray D, comunicación personal). Los linfocitos B tratados

con Sac durante las 18 horas no mostraron diferencias significativas en el análisis del fenotipo cuando se compararon con aquellos que no habían recibido dicho tratamiento.

En la tabla 1 se puede ver un resumen del fenotipo de las diferentes subpoblaciones linfocitarias utilizadas en estos experimentos.

Las células nulas fueron $60\% \pm 11$ CD3-CD4-CD8- (rango 52-68%). La pureza de las células nulas obtenidas mediante separación con formación de rosetas y cuentas inmunomagnéticas fue superior a la obtenida solamente con separación por cuentas (68% vs. 52%) (ver material y métodos).

Producción de IgG e IgM por las células B dependiente de los linfocitos T

En estos experimentos nos hemos basado en la reciente observación hecha en el laboratorio del Dr. Horwitz de que los linfocitos B pueden servir como células accesorias a la vez que como células efectoras cuando las células T son estimuladas con una combinación de anti-CD2 a base de GT2 y OKT11 (51). La ventaja que tiene esta forma de estimulación es que no necesita la presencia de monocitos o de otras células accesorias, a diferencia de la inducida a través del complejo CD3, y por tanto los resultados y las

diferentes interacciones celulares son más sencillas y fáciles de interpretar.

Los linfocitos B o los Sac-B estimulados con anti-CD2 y dejados en cultivo durante una semana no produjeron cantidades apreciables de Igs (tabla 2). La presencia de las células CD4+ fue indispensable en ambos casos para inducir la producción. En estos trabajos el cultivo de células B junto a las CD4+ y estimuladas con anti-CD2 en las condiciones de cultivo antes mencionadas produjeron 2376 ± 2508 ng/ml (rango 350-6500 ng/ml) de IgG y 1861 ± 1938 ng/ml (rango 250-4500 ng/ml) de IgM. Los cultivos con células Sac-B produjeron 10431 ± 6258 ng/ml (rango 1500-19700 ng/ml) de IgG y 6608 ± 5240 ng/ml (rango 480-18000 ng/ml) de IgM, una cantidad sensiblemente mayor (figura 3, barras limpias).

La producción de Igs en los cultivos estimulados con anti-CD2 de células B o Sac-B solas se usó como control negativo. Los cultivos en las mismas condiciones pero añadiendo linfocitos CD4+ se usaron para obtener los valores basales de IgG e IgM en cada uno de los experimentos. Así mismo se usó MC en lugar de anti-CD2 también como otro control negativo.

Efecto de los linfocitos DN sobre la producción de anticuerpos

En primer lugar se trató de averiguar si las células DN podían substituir a los linfocitos CD4+ en su función cooperadora en la producción de Igs. Para ello se cultivaron cantidades crecientes de células DN con células B, o Sac-B. Las células DN fueron incapaces de inducir la maduración y producción de Igs por las células B o Sac-B (figura 4).

Los linfocitos DN se ha comprobado que son activados y proliferan cuando se les expone a la acción de la IL2 (23). Incluso en estas condiciones, las células preactivadas DN-IL2 tampoco fueron capaces de inducir la producción de Igs por los linfocitos B (tabla 2 y figura 4).

A continuación se estudiaron los efectos de las células DN sobre la maduración y diferenciación de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos. Al comienzo de los experimentos se observó que se producía una supresión de la producción de anticuerpos que era más evidente cuanto mayor era la producción de Igs por la célula B. Los linfocitos B previamente estimulados, o Sac-B, producen mayores cantidades de Igs y también se vio que los efectos supresores eran más evidentes (figura 3). En los siguientes experimentos se usaron siempre linfocitos Sac-B.

Los linfocitos DN en cantidades crecientes produjeron una progresiva inhibición de la producción de anticuerpos por las células Sac-B en 7 diferentes experimentos (figura 5). Cantidades entre 10^3 y 10^4 células/pozo, equivalentes al 1-10% de las células del cultivo, no produjeron una supresión apreciable. Estas cantidades se pueden considerar como fisiológicas ya que el número que se encuentra en sujetos sanos en sangre periférica es de alrededor del 3% de las PBMc (21). Sin embargo, cantidades entre 2.5×10^4 y 5×10^4 , equivalentes al 25-50% aproximadamente, sí produjeron una importante supresión. En la figura 5 se puede observar la supresión en la producción de IgG así como la variación que hubo entre los diferentes experimentos. El fenómeno supresivo fue el mismo en lo referente a la producción de IgM (datos no mostrados).

Efecto de los linfocitos preactivados DN-IL2 sobre la producción de anticuerpos

Cuando las células DN fueron tratadas previamente con IL2 se comprobó que la supresión era mayor. Con cantidades de células DN entre el 1-10%, la supresión en la producción de IgG fue prácticamente total en 3 diferentes experimentos (figura 6). La producción de IgM se vio afectada en la misma medida (datos no mostrados). Este efecto no fue debido a un consumo aumentado de IL2 ya que la adición de IL2 a los cultivos celulares a los que además se

había añadido células DN-IL2 produjo un incremento de la producción de Igs más que una disminución (figura 4).

Cantidades tan pequeñas de células DN-IL2 como 10^2 (0.1% del total de células del cultivo) fueron capaces todavía de producir cierto grado de supresión en la producción de Igs como puede verse en el experimento de la figura 7 donde se añadieron diferentes cantidades de células DN-IL2 a los cultivos de linfocitos CD4+ y células Sac-B.

Cantidades mayores de células DN-IL2 superiores al 10% produjeron una reversión en la inhibición de la producción de anticuerpos en 2 de los experimentos, como puede verse en la figura 6. Este fenómeno aparentemente es debido a que entre las células DN-IL2 existen una o varias subpoblaciones que al activarse son capaces de superar la supresión producida por las células DN. Esta reversión fue una constante en los primeros experimentos (datos no mostrados) donde la separación de las células DN se hizo directamente de la sangre de los donantes con cuentas inmunomagnéticas y no mediante citofluorografía, y donde la pureza de la población de células DN sólo alcanzaba el 40-50%, con un porcentaje además de células nulas de alrededor del 30%. Aunque las células nulas sólo contaminaban las preparaciones altamente purificadas de células DN en cantidades inferiores al 9%, como hemos visto antes, entra dentro de lo posible que esta pequeña contaminación fuera la responsable del fenómeno de reversión

(ver más abajo).

Tampoco queda descartado que este fenómeno sea debido a la presencia de diferentes subpoblaciones de linfocitos DN (α BDN) como veremos más adelante.

Efecto de la depleción de linfocitos DN α o DN α β sobre la producción de anticuerpos

Se consideró, en base a que los linfocitos α constituyen más del 75% de la población de células DN (22,23), que aquellos eran los responsables del fenómeno de supresión observado. La eliminación mediante citometría de flujo de la población de células DN marcadas con AcM anti- α 1 tuvo un claro efecto inhibitorio sobre la capacidad supresora de estas células (figura 8). Para ello, se prepararon dos poblaciones de células DN a una de las cuales se le habían eliminado los linfocitos α . Como puede verse en la figura 8 la población de células DN produjo el efecto supresor antes mencionado mientras que la población de células DN α β no fue capaz de producir el mismo efecto, todo lo contrario, se produjo un claro aumento de la producción de anticuerpos.

En esta ocasión también puede verse la reversión del efecto supresor de las células DN con altas concentraciones.

Este fenómeno se confirmó en un experimento posterior en el que se prepararon 3 poblaciones de células diferentes. Una de células DN, otra de DN $\alpha\beta$ eliminando las células $\tau\delta$ con el anticuerpo anti- δ 1 y una última población de células DN $\tau\delta$ eliminando las células $\alpha\beta$ con el anticuerpo anti- $\alpha\beta$ (47). Como puede verse en la figura 9, en este experimento las células DN no produjeron una buena supresión de la producción de IgG. Sin embargo, la población de células DN $\tau\delta$ sí la produjo. También puede verse como las células DN $\alpha\beta$ en esta ocasión produjeron una supresión de la producción de anticuerpos aunque claramente menor que la producida por las células DN $\tau\delta$. En este experimento no se pudo determinar el fenotipo de las diferentes poblaciones por el escaso número de células obtenidas tras la división en las tres subpoblaciones mencionadas. En cualquier caso es evidente que ambas poblaciones tenían un enriquecimiento en sus células respectivas.

En cuanto a la producción de IgM se obtuvo un resultado parecido. La población de células DN sólo suprimió a altas concentraciones mientras que la de células DN $\alpha\beta$ y DN $\tau\delta$ lo hicieron a bajas concentraciones. Sin embargo, a altas concentraciones la población de células DN $\alpha\beta$ volvió nuevamente a estimular la producción mientras que se mantuvo la supresión producida por las otras dos poblaciones (figura 10).

Eliminación del efector supresor por el AcM anti- $\tau\delta$ (anti-TCR δ 1)

Una evidencia posterior de que las células DN $\tau\delta$ son las responsables de la supresión observada se obtuvo añadiendo AcM anti- $\tau\delta$ (anti- δ 1) (46) a los cultivos. En este experimento se produjo una supresión de la producción de anticuerpos con bajas concentraciones de células DN-IL2 y se mantuvo a altas concentraciones. Como puede verse en la figura 11, la adición a los cultivos del AcM anti- $\tau\delta$ bloqueó completamente esa supresión produciéndose incluso un aumento en la producción de anticuerpos.

En otro experimento se pudo confirmar el efecto inhibitor de la supresión por el AcM anti- $\tau\delta$ en los cultivos celulares esta vez con linfocitos DN, como puede verse en el gráfico de la figura 12.

La adición como control a los cultivos del AcM isotópico anti-FFB no tuvo ningún efecto en la producción de Igs.

Efecto de las células nulas CD3-CD4-CD8- sobre la producción de anticuerpos

Como podemos ver en la figura 2, siempre hubo un pequeño número de células nulas en las poblaciones

purificadas de células DN. Se estudió la capacidad de las células nulas en la producción de anticuerpos con el objeto de ver si estas células podían explicar el fenómeno de reversión de la supresión que se observa con altas concentraciones de células DN-IL2. En dos experimentos se obtuvieron células nulas de las dos formas descrita anteriormente (ver material y métodos) y se añadieron a los cultivos de células B solas o con linfocitos CD4+, a diferentes concentraciones. Previamente se habían tratado con IL2 de la misma forma que las células DN. En ambos experimentos las células nulas produjeron un notable incremento en la producción de Igs (figura 13).

Proliferación y diferenciación de los linfocitos DN

Se estudió la capacidad de proliferación de los linfocitos DN estimulados con PHA, anti-CD3 (anti-CD3 454) y IL2, y se comparó con la proliferación de las PBMc y linfocitos totales (después de eliminar las células adherentes de las PBMc por su peso a través de la columna de nylon-lana) en las mismas condiciones. En este experimento el fenotipo de las células DN mostró un 81% de células CD3+CD4-CD8- y un 19% de células nulas. Como puede verse en la tabla 3 los linfocitos DN fueron los que mostraron la mejor respuesta al estímulo con IL2 y sin embargo la respuesta con PHA fue bastante pobre en comparación con los otros grupos. En este experimento se puede ver como la respuesta al AcM anti-CD3 454 fue nula entre las células DN

con o sin la presencia de monocitos, mientras que las otras poblaciones celulares respondieron correctamente.

En estos mismos experimentos se analizó también la expresión fenotípica del receptor $\tau 6$ y de las moléculas CD3, CD4 y CD8 a lo largo del tiempo en los cultivos de células DN estimuladas con IL2. Mientras que el porcentaje de células DN no varió sensiblemente a lo largo de los 8 días de cultivo (81% vs 84%), si hubo variaciones en cuanto a la expresión del TCR. Al comienzo del cultivo la preparación de células DN tenía un 56% de células $\tau 6$ positivas. Al quinto día de cultivo el porcentaje se había elevado al 70% apareciendo también un 13% de células con una sobre-expresión de dicho receptor. Al octavo día el 94% de las células eran $\tau 6$ positivas con un 47% de células con sobre-expresión del receptor $\tau 6$. Las células negativas, principalmente DN $\alpha\beta$ y células nulas, fueron disminuyendo desde el 44% el primer día de cultivo, al 5% el octavo día (figura 14). El marcador para células NK Leu-19 no experimentó ningún aumento a lo largo de los 8 días de cultivo.

Los linfocitos DN alogénicos carecen de efecto supresor sobre la producción de Igs.

En este experimento se trató de averiguar si en este fenómeno supresivo existía o no restricción por el MHC y por tanto si los linfocitos DN alogénicos eran

capaces de suprimir la producción de Igs en los cultivos de células Sac-B y CD4+ autólogas.

Se añadieron linfocitos DN de un donante a los cultivos de células Sac-B y linfocitos CD4+ de otro donante distinto. El haplotipo del MHC tipo I era completamente diferente para ambos donantes como puede verse en la figura 15. El haplotipo del MHC tipo II mostraba un alelo común, siendo diferentes para todos los demás. Mientras que los linfocitos DN autólogos fueron capaces de suprimir la producción de IgG e IgM a concentraciones de 5×10^4 , los linfocitos DN alogénicos no lo hicieron (figura 15).

Efecto de la depleción de linfocitos DN γ 6 en la supresión producida por linfocitos CD8+

Se obtuvieron dos poblaciones de linfocitos CD8+ a una de las cuales posteriormente se la privó de linfocitos DN γ 6 mediante el AcM anti- δ 1 y posterior separación negativa con el citofluorografo (CD8ab). Ambas poblaciones fueron añadidas a diferentes concentraciones al cultivo de linfocitos CD4+, células Sac-B y estimuladas con anti-CD2. Como se observa en la figura 16, la producción de Igs en los cultivos celulares fue la misma así como la supresión producida por las dos poblaciones de linfocitos CD8+.

DISCUSIÓN

Las células hematopoyéticas precursoras de los linfocitos, una vez producidas en médula osea, colonizan el timo donde se desarrollan hasta alcanzar la fase de linfocitos T maduros del individuo adulto. En el timo, los linfocitos embrionarios sufren una serie de transformaciones que se pueden detectar por las diferentes moléculas que se expresan tanto en el citoplasma como en su superficie (54). Las primeras células con capacidad para poblar el timo son los timocitos CD3-CD4-CD8-. Estas células comienzan a expresar diversas moléculas en su superficie según van madurando y con ello van adquiriendo la capacidad para realizar diversas funciones.

Uno de los primeros genes en expresarse son los de las cadenas γ y δ del TCR junto a los de el complejo CD3, produciéndose el linfocito $\gamma\delta$ que pasa directamente a la periferia como célula madura. Si el ordenamiento de estos genes no tiene éxito, entonces comienzan a expresarse los genes que codifican las moléculas CD4 y CD8 y más tarde las cadenas α y β del TCR produciendo los timocitos CD3+CD4+CD8+

$\alpha\beta$ TCR+, que forman la población mayoritaria del timo. Más tarde pierden una de las dos moléculas CD4 o CD8 y quedan convertidos en linfocitos CD3+CD4+CD8- $\alpha\beta$ TCR+ o CD3+CD4-CD8+ $\alpha\beta$ TCR+ emigrando a sangre y a los órganos linfáticos periféricos como células maduras (rev. en 24,55). La mayoría de los investigadores en este campo están de acuerdo hoy día en que las células $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ son dos líneas independientes de linfocitos maduros (26,56,57).

Sin embargo no todos los linfocitos tienen su origen en el timo. En ratones atímicos que presentan un defecto congénito en el desarrollo de las células epiteliales y por lo tanto ausencia de timo (58), se ha podido comprobar que con el paso del tiempo aparecen pequeñas cantidades de linfocitos $\alpha\beta$ en órganos linfáticos periféricos (59) y linfocitos $\gamma\delta$ en mayor cantidad (60). Existen evidencias de que parte de estas células tienen un desarrollo independiente del timo (38,61). Los linfocitos que se desarrollan fuera del timo no han estado sujetos a los mecanismos de selección positiva y negativa por el que se controla el reconocimiento de lo propio, como ocurre con el resto de los linfocitos (62). Esto significa que las células DN podrían ser más fácilmente autoreactivas y estar envueltas en el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad (63).

En sangre periférica la mayoría de los linfocitos T son CD4+ o CD8+. Aunque la función de los

linfocitos hoy día se sabe que no está invariablemente unida a estas moléculas, los linfocitos maduros CD4+ desarrollan en general una función cooperadora con las células B en la producción de Igs y se les llama células "helper" o linfocitos T cooperadores. Por el contrario, los linfocitos CD8+ son mediadores de fenómenos de supresión y de citotoxicidad (18). Una visión más reciente muestra que el reconocimiento del antígeno por estos linfocitos también es diferente siendo probablemente aquí donde radique la diferente función de los linfocitos. Los linfocitos CD4+ reconocen al antígeno en relación con las molécula MHC tipo II (19) mientras que los linfocitos CD8+ lo hacen con las moléculas MHC tipo I (20).

Con el uso reciente de la citometría de flujo, más precisa a la hora de valorar pequeñas subpoblaciones de células, se han descrito la presencia en sangre periférica de pequeñas cantidades de linfocitos maduros que no expresan ninguna de estas dos moléculas de superficie (21). Estos linfocitos CD3+CD4-CD8- o DN constituyen alrededor del 3% del total de los linfocitos de sangre periférica (21-23). Esta población de linfocitos DN está compuesta en su mayoría de células portadores del TCR tipo $\gamma\delta$ mientras que sólo el 25% portan el TCR $\alpha\beta$ (26-33).

El porcentaje de células DN es variable. En nuestro trabajo la media de linfocitos CD3+CD4-CD8- en sangre periférica de sujetos sanos fue de 3.8% con un rango

comprendido entre 0.8-7%. El 75% de los linfocitos DN mostraron un TCR $\gamma\delta$ mientras que el restante 25% tenía un TCR $\alpha\beta$. Estos datos coinciden con los de otros autores, como hemos visto anteriormente. No obstante, existen cifras aun mayores, que en algún caso han llegado a alcanzar hasta el 23%, sin que hubiera ninguna patología asociada (71).

Los linfocitos DN parece que van incrementándose en número desde el nacimiento, donde se observan cifras muy bajas, hasta el primer año de vida donde se alcanza la cifra que va a mantenerse durante la edad adulta (64). La población de linfocitos DN $\gamma\delta$ también cambia con la edad. En sangre del cordón umbilical se ha comprobado como la población de linfocitos DN $\gamma\delta$ es menor que en el adulto (31,64).

En sangre periférica de adultos sanos existen dos tipos de subpoblaciones de células $\gamma\delta$ mutuamente excluyentes Vr9/V δ (diferente de 1) y Vr (diferente de 9)/V δ 1, con un claro predominio de las primeras que alcanzan el 90% del total (35,65-68). Por el contrario, en el cordón umbilical hay células que expresan principalmente el subtipo Vr2 δ 1 y con el tiempo se produce un incremento de estas células a expensas del subtipo Vr9 δ 2 (66,64). Se ha comprobado que prácticamente todas las células Vr9/V δ 2 de sangre periférica son portadoras del fenotipo CD45RA-RO+, mientras que las que expresan el gen V δ 1 son CD45RA+RO- (69,65). El fenotipo CD45RA+ se ha relacionado con células

vírgenes, mientras que el CD45RO+ lo expresan aquellas células memoria que ya han estado en contacto con el antígeno (70). Esto indica que existe una expansión preferente de las células con memoria inmunológica que usan el gen V τ 962, probablemente en relación con una estimulación antigénica específica.

A diferencia de los linfocitos CD4+ o CD8+, las características funcionales de las células DN no son completamente conocidas. Está descrito que la estimulación con anti-CD3, anti-CD2, PHA, IL2, IL4 y la estimulación alogénica las hacen proliferar de una forma parecida a como lo hacen el resto de los linfocitos (23), aunque con algunas diferencias apreciables entre las subpoblaciones de linfocitos $\alpha\beta$ y $\nu\delta$ que constituyen la población de células DN. El estímulo con PHA o con anti-CD3 produce una proliferación casi exclusiva de los linfocitos $\alpha\beta$ mientras que cuando la estimulación se hace con IL2 se produce una notable expansión de células $\nu\delta$ (71,72). Por otro lado, las células $\nu\delta$ se ha visto que responden a la estimulación con un sólo AcM anti-CD2 (73) mientras que los linfocitos $\alpha\beta$ necesitan dos diferentes anti-CD2 para su correcta estimulación (74,51).

Las células DN en nuestro trabajo mostraron una mayor proliferación al estímulo con IL2 cuando fueron comparadas con el resto de los linfocitos y con las PBMC, como cabría esperar por el alto número de células $\nu\delta$ que

componen esta población. Estos datos indican que las células DN tienen una mayor sensibilidad al estímulo con IL2 lo cual las haría especialmente sensibles a pequeñas cantidades de IL2, situación que ocurre en los comienzos de una respuesta inmunológica cuando todavía el número de células activadas no es demasiado elevado. Sin embargo, la estimulación a través del CD3 en nuestro caso no indujo ninguna proliferación en estas células pero sí en los otros linfocitos y en las PBMc. Probablemente la diferencia radique en los epítomos reconocidos por el AcM anti-CD3 utilizado en estos experimentos y que es distinto a otros utilizados. No se ha profundizado en este punto debido a que en ningún momento la estimulación de estas células por la vía del CD3 ha sido el método empleado en nuestro trabajo y tampoco ha sido objeto de este estudio.

En lo referente a la producción de citoquinas, los linfocitos τ parece que tiene la misma capacidad que los linfocitos $\alpha\beta$ para producir diversos tipos de citoquinas con algunas diferencias cuantitativas (75). Producen menos cantidades de IL2 (76) y diferentes patrones de producción de otras citoquinas dependiendo de los clones de linfocitos τ estudiados.

Los linfocitos DN estimulados con PHA o IL2 mantienen estable su fenotipo CD3+CD4-CD8- durante el tiempo de cultivo (71). Este dato lo hemos podido constatar en nuestros experimentos. En cultivos de células DN estimuladas

con IL2 hemos podido comprobar que son precisamente los linfocitos DN τ los que proliferan de manera que al octavo día de cultivo todas las células DN muestran este fenotipo. Esto indica que es precisamente la subpoblación de linfocitos DN τ la que muestra una mayor sensibilidad al estímulo con IL2 de la que tienen el resto de las subpoblaciones linfocitarias.

La sobre expresión del receptor τ en estos cultivos se pudo comprobar en al menos dos experimentos. Este es un fenómeno que ocurre con algunas moléculas de la superficie de los linfocitos que cuando son estimulados incrementan el número de moléculas por unidad de superficie para mostrar una mayor capacidad de reacción frente al estímulo. Un ejemplo sencillo y bien conocido de lo que estamos diciendo ocurre con los receptores de la IL2 que pasan de ser casi indetectables en los linfocitos en reposo a expresar grandes cantidades de ellos tras la estimulación (77). En el caso de las células τ , no hemos encontrado en la literatura ningún antecedente de este tipo y la mejor explicación para este fenómeno observado sería la misma que la que ocurre en el caso de la IL2, el linfocito τ aumenta el número de moléculas del TCR para un mejor reconocimiento del ligando específico.

Los linfocitos DN en reposo carecen de actividad citotóxica (26,78,76). Sin embargo, después de la estimulación con IL2 estos adquieren la capacidad de lisar

células dianas tanto NK-sensibles como NK-resistentes (22,79,76). La capacidad citotóxica de esta población se ha comprobado que radica en la subpoblación de linfocitos DN τ 6 y que además no existe restricción por el MHC y por lo tanto no es capaz de discriminar entre células autólogas o alogénicas (22,76,75). Los linfocitos DN α 6 sólo muestran esa capacidad con alguna célula diana NK-sensible y siempre en menor grado que las células τ 6. No obstante, la capacidad citotóxica de estas células parece estar ligada más a las moléculas CD8 o al fenotipo DN, que a los diferentes TCR. En este sentido, se ha comprobado que los clones de células CD4+ τ 6 TCR muestran una escasa actividad citotóxica en comparación con las células DN o CD8+ con el mismo TCR τ 6 (75).

Al faltarles ambas moléculas, CD4 y CD8, los linfocitos DN parece que no necesitan reconocer a su ligando presentado por las moléculas del MHC tipo I o II como lo hacen el resto de los linfocitos T. Como vimos anteriormente, la capacidad citotóxica de estas células no tiene restricción por el MHC. Sin embargo, parece que los linfocitos DN pueden reconocer estructuras diferentes como son las moléculas CD1, que aunque son diferentes a las moléculas del MHC, pueden ser reconocidas por las células DN haciendo una función parecida a la restricción que imponen los antígenos del MHC (80). Este reconocimiento puede tener importantes implicaciones en la función de las células τ 6 pues las moléculas CD1 son expresadas principalmente en

células presentadoras de antígenos.

Recientemente se ha podido comprobar que los linfocitos τ reaccionan preferentemente a antígenos de mycobacterias, proliferando y produciendo una expansión clonal (81,36). Posteriormente se demostró que los antígenos responsables de esta estimulación eran las proteínas del estrés (hsp) (36), particularmente la hsp-65 que se comportaría como un superantígeno activando clonalmente a las células τ (82). Este tipo de proteínas está ampliamente presente en bacterias y se mantienen de una forma casi invariable a través de la escala filogenética, desde organismos procariotes hasta células eucariotes (83). Las hsp se expresan en la superficie de las células sometidas no solamente a estímulos térmicos sino también ante cualquier tipo de estrés, como por ejemplo el producido por la infección y los mediadores de la inflamación (84). De esta forma, los linfocitos τ reconocerían y reaccionarían ante células alteradas que expresan en su superficie las hsp, por ejemplo, en el caso de células infectadas, ejerciendo una acción de vigilancia. Esta acción de vigilancia inmune ha sido la primera función que se le ha atribuido a los linfocitos τ (37).

Además de en sangre periférica, los linfocitos τ se encuentran distribuidos en todos los órganos linfoides donde constituyen de una manera casi constante entre el 1-5 % de los linfocitos (22,23,29-

33,85,86, rev. en 33). En los ratones se ha encontrado que además existe un aumento de células τ a nivel de mucosas, principalmente epidermis, mucosa intestinal, vagina, útero y lengua (34,59,33). Esta especial localización junto a la capacidad para reconocer células autólogas alteradas es lo que ha llevado a pensar que estos linfocitos pudieran constituir una primera línea de defensa frente a la infección (37).

Por otro lado, el hecho de que los linfocitos $\alpha\beta$ y τ constituyen dos líneas bien diferenciadas de linfocitos y que los genes que codifican las cadenas τ aparezcan antes que los otros, ha hecho pensar a algunos autores que las células τ son una forma de inmunidad primitiva. Más tarde y como consecuencia de la necesidad de una reacción más precisa frente a los antígenos externos, se desarrolló el TCR $\alpha\beta$, con una notable especificidad frente al antígeno (37).

Esta teoría sobre las características funcionales de los linfocitos τ también explicaría el pequeño repertorio del TCR que se ha encontrado en estas células, en comparación con los linfocitos T $\alpha\beta$ (34,87). Mientras que los linfocitos $\alpha\beta$ necesitan un amplio repertorio para la región variable de las cadenas del TCR con el objeto de reconocer cualquier antígeno extraño, las células τ , debido a que sólo van a reconocer determinados antígenos con una conformación muy constante, como son las

hsp, sólo necesitan un pequeño número de genes para codificar el segmento variable de las cadenas τ y δ presentando por tanto un repertorio limitado. La presencia de un limitado repertorio en estas localizaciones indica que estos linfocitos $\tau\delta$ son específicos frente a determinados estímulos. Esto permitiría una respuesta inmediata frente a una agresión sin necesidad de poner en marcha todo el mecanismo de respuesta inmune (61).

Esto es lo que ocurriría en condiciones normales ante una agresión, por ejemplo una infección. Pero como hemos dicho, las hsp muestran una analogía importante a lo largo de la escala filogenética, de forma que cuando se produce una reacción inmune contra estas proteínas en el curso de una infección es posible que a su vez se esté desencadenando un proceso autoinmune contra las propias proteínas del huésped (88,65). Esta reacción autoinmune sería la responsable de perpetuar el cuadro al producir un aumento de la expresión de las hsp en las células dañadas y por tanto un aumento de la respuesta inmune cerrando así el círculo vicioso que se observa en las enfermedades autoinmunes.

Las células $\tau\delta$ estarían por lo tanto en condiciones de eliminar células autólogas estresadas incluyendo aquellas que son autoreactivas (34,37). En este sentido, se ha comprobado como los linfocitos intraepiteliales del ratón reconocen antígenos propios

expresados en los queratinocitos vecinos y reaccionan contra ellos de una manera no se encuentra limitada por el MHC (89).

Los linfocitos intraepiteliales (IEL) constituyen una población de células dentro del sistema inmune con propiedades poco conocidas. Hay 4 subpoblaciones de este tipo de linfocitos, definidas por la expresión del fenotipo CD4 y CD8. La más común es CD3+CD4-CD8+, con un 75%, siendo el resto de las subpoblaciones CD3+CD4-CD8-(DN), CD3+CD4+CD8- y CD3+CD4+CD8+ alrededor del 8-9% cada una. Una gran parte de estos linfocitos (20-80%) son portadores del TCR α (90-93,29). En el intestino de los ratones y de los pollos se ha visto que existe un aumento de linfocitos α intraepiteliales (90,91,29) aunque no se ha podido encontrar esta misma correlación en el hombre (94,95,85).

Algunos autores (92), en función de la capacidad de los linfocitos α intraepiteliales para producir linfoquinas IL5 y IFN- γ piensan que pueden tener una función inmunoreguladora asegurando una buena respuesta inmune ante una agresión externa. Por otro lado, estos mismos autores en un trabajo anterior (93) demostraron como los α IEL transferidos a ratones que previamente se los había hecho tolerantes a hematíes de caballo, eran capaces de eliminar dicha tolerancia restableciendo la respuesta inmune ante proteínas extrañas.

La función cooperadora de los linfocitos parece que va asociada a la presencia de la molécula CD4. Como cabría esperar, las células DN al faltarles dicha molécula carecen de esta capacidad. En este trabajo se ha demostrado que efectivamente los linfocitos DN, tanto en reposo como preactivados con IL2, se han mostrado incapaces de sustituir a los CD4+ en su capacidad cooperadora. Estos datos confirman los hallazgos de otros autores (21,27,96,97).

En este trabajo hemos encontrado que las células DN, particularmente los linfocitos con TCR $\alpha\beta$, poseen una potente capacidad supresora de la producción de anticuerpos. Sin embargo, para que estas células realicen su acción en cantidades que se puedan considerar como fisiológicas, es decir entre 1-10%, es imprescindible que estén activadas. Cantidades de células DN en reposo entre el 25-50% fueron capaces de suprimir la producción de Igs en nuestros experimentos. Esta cifras se encuentran bastante lejos de lo que se puede considerar como fisiológico, que es alrededor de un 3%. También existió una gran variabilidad, como puede verse en la figura, dependiendo de los experimentos y probablemente en relación con el grado de activación de estas células en los diferentes donantes. Sin embargo, cuando fueron preactivadas con IL2, aunque probablemente otro tipo de activación sea suficiente, con cantidades fisiológicas comprendidas ente el 1-10% se

produjo una importante supresión de la producción de Igs.

El mecanismo responsable de esta supresión no ha sido estudiado todavía pero se ha visto que en los cultivos de células DN con linfocitos Sac-B y linfocitos CD4 que se usaron para estos experimentos se podía observar que aquellos en los que se producía el fenómeno supresivo no se formaban acúmulos de células en proliferación (clusters), mientras que en los cultivos de linfocitos Sac-B y CD4 al final del tiempo de cultivo se observaban grandes "clusters" (Rivera J, Horwitz D. Datos no publicados). Esto indica que el mecanismo de acción es a través de la inhibición de la proliferación de linfocitos CD4+.

Cuando se estimula a los linfocitos, éstos expresan en su superficie una serie de moléculas llamadas de activación que les va a permitir realizar la función prevista. Como hemos visto anteriormente, entre estas moléculas se encuentran las hsp que pueden ser reconocidas por los linfocitos T δ reaccionando contra las células que las expresan en su superficie y destruyéndolas mediante citotoxicidad o simplemente inhibiendo su proliferación mediante la secreción de linfoquinas. Así pues, los linfocitos T δ suprimirían la producción de anticuerpos eliminando, o simplemente inhibiendo, a los linfocitos CD4+ con actividad cooperadora y/o a los linfocitos B activados, productores de anticuerpos. Esta es la primera vez que se ha

demostrado que los linfocitos $\tau 6$ cuando están activados poseen una potente capacidad supresora de la formación de anticuerpos.

La otra subpoblación comprendida dentro de las células DN son los linfocitos DN $\alpha\beta$. Su función es más parecida a la que tienen los linfocitos CD4+ o CD8+ (86,98,99). Estas células cuando están activadas se convierten en autoreactivas proliferando bien en una reacción autóloga de linfocitos aunque en ningún caso se convierten en citotóxicas (100,101). En algún caso de proliferación casi exclusiva de estas células en síndromes de inmunodeficiencia en el ser humano, se ha podido comprobar que se acompañan de fenómenos de autoreactividad del tipo de enfermedad injerto contra huésped (102). Es poco probable que dadas sus características estas células puedan producir supresión.

Sin embargo, se ha demostrado que algunos tipos de células DN $\alpha\beta$, obtenidas de ratones recién nacidos o de ratones irradiados con dosis letales y posteriormente trasplantados, poseen capacidad supresora del cultivo mixto de linfocitos en el ratón (103-106). Cabría dentro de lo posible pensar que el efecto supresor que hemos visto en los linfocitos DN activados fuera debido a las células DN $\alpha\beta$. Sin embargo en los experimentos que se hicieron deplecionando las células DN de linfocitos $\alpha\beta$ o $\tau 6$ mediante la utilización de AcM específicos contra estos receptores, se pudo

comprobar que las poblaciones deplecionadas de células τ no producían el mismo efecto supresor y que incluso en varios de los experimentos los linfocitos DN α β produjeron un efecto estimulador de la producción de Igs.

Las células nulas CD3-CD4-CD8- previamente hemos demostrado que tienen capacidad estimuladora de la producción de Igs (107). En este trabajo se ha confirmado nuevamente este dato obteniendo células nulas de dos formas diferentes y mostrando en ambos casos capacidad estimuladora. Además, en aquellos experimentos en los que la población de células DN estaba contaminada con gran número de células nulas, era más fácil ver un aumento en la producción de Igs, sobre todo cuando se añadían altas concentraciones de células.

Estos experimentos indican que el efecto supresor se encuentra en la fracción τ y que tanto las células DN α β como las células nulas tiene capacidad estimuladora de la producción de anticuerpos.

Hay que tener en cuenta que la población de linfocitos CD4+ que se preparaba como cooperadora de las células B en la producción de anticuerpos, contenía el mismo porcentaje de linfocitos DN que en sangre periférica, o incluso aumentado por la depleción de otras subpoblaciones linfocitarias que se había hecho para obtener estas células cooperadoras. Aunque esta población sólo constituyó como

mucho el 35% de las células que se pusieron en los cultivos, cantidades tan pequeñas como 100 células DN estimuladas son suficientes para producir el efecto supresor, como previamente hemos demostrado (ver figura 7).

La confirmación de que el efecto supresor está mediado por las células $\tau\delta$ y no por las $\alpha\beta$, se obtuvo cuando se añadió AcM anti- $\delta 1$ en los cultivos celulares viéndose como se eliminaba completamente el efecto supresor. El AcM anti- $\delta 1$ es un anticuerpo común para las cadenas δ de todas las células $\tau\delta$ (46) por lo cual cuando se usó en los cultivos celulares de estos experimentos, dicho AcM se fijó tanto en las células DN preparadas como en aquellas que estaban contenidas en la población de linfocitos CD4. El AcM anti- $\delta 1$ probablemente bloquee el TCR impidiendo el reconocimiento del ligando específico por parte de estas células.

Se pudo comprobar que la función supresora de los linfocitos $\tau\delta$ en estos experimentos necesitó del reconocimiento del MHC en las células autólogas, como puede verse en el experimento de la figura 15. A diferencia de los linfocitos CD4 o CD8 que reconocen al antígeno presentado por moléculas del MHC tipo II o tipo I (19,20), respectivamente, las células DN, al faltarles dichas moléculas, reconocerían al antígeno de una forma no limitada por el MHC. Sin embargo, existen trabajos en los que la capacidad citotóxica de clones de linfocitos $\tau\delta$ fue inhibida

por anticuerpos dirigidos contra el TCR, lo cual demuestra que existe restricción por el MHC en el reconocimiento del antígeno por parte de estas células (108,36,68), bien sea por el tipo I (108,96), como por el tipo II (109) y también por parte de las moléculas CD1 (80).

De todas formas, la cuestión de si estas células necesitan reconocimiento del MHC para realizar alguna o todas de sus funciones específicas, es algo que todavía no está completamente zanjado. Hay numerosos trabajos donde se demuestra que el efecto citotóxico de estos linfocitos no está restringido por las moléculas del MHC. En estos trabajos la mayoría de las células DN provienen de clones celulares que están muy estimulados para mantenerse en crecimiento y esto pudiera originar su actividad citotóxica (26,110).

Al menos por nuestros experimentos queda claro que la capacidad supresora de los linfocitos DN γ se encuentra restringida por el MHC.

Clásicamente se ha atribuido a los linfocitos CD8+ una función supresora y citotóxica (18). Recientemente, Takahashi et al. (51) han comprobado como las células CD8+ son capaces de suprimir la producción de Igs por las células B dependientes de los linfocitos T, con las mismas condiciones de cultivo que se han utilizado en estos experimentos. En este trabajo, se ha podido confirmar ese

hallazgo.

Hay datos que sugieren que existe una interacción entre las células $\tau\delta$ y las $\alpha\delta$ (88,111). En este caso, las células $\tau\delta$ controlarían la respuesta de las células $\alpha\delta$ a través de las linfoquinas liberadas produciendo un efecto regulador de la respuesta inmune (92). Por otro lado, es curioso ver como las células $\tau\delta$ se encuentren elevadas en dos situaciones un tanto opuestas como son los procesos autoinmunes y los síndromes de inmunodeficiencia (88). Para Holoshitz (88), en ambas situaciones existe una alteración de los linfocitos $\alpha\delta$ que dejaría libre a las células $\tau\delta$ produciéndose la enfermedad. Esta situación revela una clara interacción entre ambos tipos de linfocitos.

Aquí se trató de ver si los linfocitos $\tau\delta$ ejercían algún tipo de influencia en la supresión de la producción de Igs por las células CD8+. En el experimento de la figura 16, se puede ver como los linfocitos CD8+ fueron capaces de suprimir la producción de Igs con y sin la presencia de las células $\tau\delta$. Este dato indica que ambas poblaciones tienen capacidad supresora de una forma independiente.

Aunque no existen hoy día trabajos en la literatura que demuestren tan claramente como lo hemos hecho aquí la función supresora de la producción de anticuerpos

por los linfocitos τ_6 , hay datos, tanto a nivel experimental en ratones, como en determinados procesos patológicos en el ser humano, que sugieren que una de sus funciones pueda ser esta.

En ratones a los que se ha eliminado la población de linfocitos $\alpha\beta$ mediante tratamiento con un AcM anti- $\alpha\beta$ TCR y que por lo tanto sólo tienen linfocitos τ_6 , Carbone et al. (97) han podido comprobar que la capacidad funcional de las células B es normal aunque se encuentra fuertemente deprimida. Por otro lado, estos animales no son aloreactivos y aceptan injertos sin que se produzca rechazo. (97). Probablemente en estos ratones las células τ_6 estén ejerciendo algún tipo de supresión sobre la producción de Igs por las células B.

Los ratones infectados por vía nasal con el virus influenza tipo A desarrollan un proceso inflamatorio de vías altas y neumonía. En los exudados se ha podido comprobar que existe un aumento de células τ_6 coincidiendo con la mejoría del cuadro (112). Esto implica que las células τ_6 están frenando de alguna manera la reacción inmunológica que está teniendo lugar en las vías respiratorias de estos ratones.

En el ser humano, en las biopsias endomiocárdicas de trasplantados de corazón existe un aumento significativo del número de linfocitos τ_6 que

infiltran el tejido. Estas células sólo se pueden ver en fases tardías cuando ha pasado el riesgo de rechazo agudo. Se piensa que la presencia de las células T₈ en estos pacientes está relacionada con la supresión del rechazo (113).

Un paciente trasplantado de médula ósea experimentó una expansión en sangre periférica de una subpoblación de linfocitos T₈. Estas células purificadas a partir de la sangre periférica del paciente fueron capaces de suprimir la reacción mixta de linfocitos y la respuesta proliferativa a la estimulación con lectinas de los linfocitos tanto del propio paciente como del donante. La función supresora que ejercieron en este caso las células T₈ fue evidente (114).

Es probable que una de las funciones de las células T₈ en condiciones fisiológicas sea la de suprimir la respuesta inmune, bien sea suprimiendo la producción de anticuerpos, como hemos demostrado en este trabajo, o bien eliminando las células que expresan en su superficie las hsp, como las células autoreactivas. Un cambio en su función supresora, una disminución en su número o bien una alteración en su interacción con los linfocitos así podría convertir a las células T₈ en estimuladoras, o bien hacerlas insuficientes frente a otras poblaciones de células autoreactivas. Por lo tanto es probable que estas células estén jugando un papel importante en la patogénia de las

enfermedades autoinmunes.

En este sentido, en el LES se ha comprobado que existe un aumento de los linfocitos DN α (40) y que tanto éstos como los T δ son capaces de inducir la producción de autoanticuerpos por las células B (41). En los ratones MRL lpr/lpr, que desarrollan espontáneamente un cuadro inmunológico similar al LES, el hallazgo patológico más importante es la presencia de una linfadenopatía generalizada producida por linfocitos DN α (115,116). El aumento de estas células autoreactivas se ha encontrado también en otras cepas de ratones que desarrollan enfermedades autoinmunes (42). En esta enfermedad parece por lo tanto que los linfocitos DN, especialmente los α , están jugando un papel importante en la aparición de la autoreactividad que la caracteriza.

Desde que Holoshitz et al. (117) aislaron un clon de linfocitos DN δ en el líquido sinovial de un paciente con AR, se ha intentado relacionar a estos linfocitos en la patogénia de la AR. Algunos autores han encontrado un aumento de las células T δ en los pacientes con AR (43,118,119), mientras que otros las encuentran disminuidas (120,121). En esta misma enfermedad, también se ha encontrado una correlación entre el aumento de linfocitos T δ y linfocitos B CD5+ (43). Estos últimos linfocitos se han relacionado con la producción de anticuerpos en las enfermedades autoinmunes (122). Por otro lado, los

linfocitos del líquido sinovial de pacientes con AR parece que responden preferentemente a antígenos procedentes de mycobacterias (117), produciéndose una expansión de la población de linfocitos T_H (123).

Como vimos anteriormente, en sangre periférica de sujetos sanos existen dos tipos de subpoblaciones de células T_H mutuamente excluyentes V_H9/V_D6(diferente de 1) y V_H1(diferente de 9)/V_D1 (35,65-68). Tanto en la AR como en la artrosis, el 90% de las células T_H de sangre periférica son V_H962 pero en la membrana sinovial de AR se ha encontrado que son V_H1(diferente de 9)/V_D6(diferente de 1),V_D6(diferente de 2), mientras que no ocurre así en la artrosis (124). Cabe preguntarse si esta expansión clonal de las células T_H que se observa en la sinovial de la AR obedece a una necesidad de suprimir una respuesta inmune que está teniendo lugar en las articulaciones frente a un antígeno responsable de la enfermedad.

La infección por el HIV se está revelando como algo más que una simple infección vírica. En estos pacientes se ha comprobado que existen diversas manifestaciones reumáticas y procesos autoinmunes (125-127) que tienen como base una alteración del sistema inmunitario como la que se puede ver en los fenómenos de autoinmunidad. Existen datos hoy día que permiten pensar que en la infección por el VIH la producción de células autoreactivas

y de anticuerpos contra estructuras propias son responsables en gran medida de la patogénia de esta enfermedad (128,129).

En la sangre periférica de estos pacientes se ha encontrado un aumento de los linfocitos DN (130), principalmente de las células Tó (131) y fundamentalmente a expensas de la subpoblación Vó1+, que habitualmente está en menor número en sangre periférica, mostrando por lo tanto que también existe una expansión clonal (67,132). El significado de este aumento de las células Tó en la infección por HIV tampoco está claro pero su función nuevamente podría ser la de frenar la actividad de las células autoreactivas y productora de autoanticuerpos que existen en esta enfermedad.

En algunas otras enfermedades estudiadas se ha observado también una expansión de células Tó. Diversos síndromes de inmunodeficiencia (133), la lepra y otras enfermedades con formación de granulomas (134), la enfermedad celíaca (135), linfadenitis tuberculosa (81), mononucleosis infecciosa (136) y un caso descrito de polimiositis cuyo infiltrado inflamatorio muscular estaba constituido preferentemente por linfocitos Tó (137). Salvo la alteración que existe en todas ellas a nivel del sistema inmune, no existe aparentemente ningún otro dato en común. El papel que están jugando los linfocitos Tó en estas enfermedades es también desconocido pero desde luego tanto

el papel de vigilancia de células alteradas, como la función supresora de la producción de anticuerpos descrita en este trabajo son perfectamente posibles.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo quedan claramente demostrados una serie de hechos de los que podemos sacar las siguientes conclusiones principales:

1.- Los linfocitos DN activados con IL2 en sujetos sanos producen una marcada supresión de la producción de anticuerpos por las células B, en presencia de células CD4+. Este efecto se consigue con pequeñas concentraciones comprendidas entre el 1 y el 10%, cantidades que se pueden considerar como fisiológicas.

a) Los linfocitos DN en reposo también son capaces de producir dicha supresión aunque se necesitan mayores

concentraciones, entre el 25 y el 50%, para producir este efecto.

- b) Los linfocitos DN, tanto en reposo como activados, estimulados con anti-CD2 son incapaces de inducir la transformación de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos. Esta incapacidad también es manifiesta en el caso de los linfocitos B preactivados.
- c) Los linfocitos DN proliferan mejor que las PBMc o los linfocitos totales al estímulo con IL2. La estimulación con lectinas y anti-CD3 muestra un efecto contrario.
- d) En los cultivos de linfocitos DN estimulados con IL2 se produce una expansión casi exclusiva de los linfocitos T6.

2.- Las células responsables de este efecto supresor se encuentran en la subpoblación de linfocitos DN con TCR $\tau\delta$.

a) El mecanismo de esta supresión es a través de la inhibición de la proliferación de los linfocitos CD4+ y/o de células B.

b) La capacidad supresora de los linfocitos DN $\tau\delta$ necesita del reconocimiento del MHC.

c) Los linfocitos DN $\tau\delta$ en cultivo muestran una sobreexpresión de las moléculas del TCR $\tau\delta$.

3.- Por el contrario, los linfocitos DN con TCR $\alpha\beta$ producen un efecto estimulador en la producción de anticuerpos.

4.- Las células nulas CD3-CD4-CD8-, después de ser preactivadas con IL2, también tienen capacidad estimuladora de la producción de anticuerpos.

- 5.- La capacidad supresora de los linfocitos CD8+ es independiente de su interacción con las células $\tau\delta$.

RESUMEN

Recientemente se ha comprobado que los linfocitos DN están elevados en las enfermedades con características autoinmunes. En el LES además inducen a un aumento de la producción de anti-DNA, de indudable capacidad patogénica. En la AR también se ha visto que existe una expansión clonal de los linfocitos $\tau\delta$.

Las propiedades inmuno reguladoras de los linfocitos DN $\alpha\delta$ y $\tau\delta$ en los sujetos normales no es del todo conocida y ha sido el objetivo principal de este trabajo.

Se han aislado linfocitos DN de sangre periférica de donantes sanos y se ha valorado su capacidad para inducir a las células B a madurar y convertirse en células productoras de anticuerpos. Para ello se han utilizado cultivos de células B con linfocitos CD4+ como cooperadores para la producción de Igs y se han estimulado con anti-CD2. Se ha medido al efecto que producen las diferentes subpoblaciones de células DN en la producción de IgG e IgM.

Los linfocitos DN activados, pero no en reposo, produjeron una supresión marcada de la producción de anticuerpos. Mediante estudios de depleción se pudo comprobar que la subpoblación responsable de este fenómeno de supresión eran los linfocitos T_H mientras que tanto los linfocitos T_H como las células nulas producían una estimulación.

Este trabajo muestra por primera vez en la literatura que los linfocitos T_H poseen una potente capacidad inhibidora de la producción de anticuerpos. La alteración en el número o en el estado de activación de estas células puede afectar a la capacidad supresora dando lugar a una falta de inhibición de la producción de autoanticuerpos como ocurre en el LES y en otras enfermedades autoinmunes.

TABLA 1:

Fenotipo de las diferentes poblaciones de linfocitos utilizadas en este trabajo.

Subpoblación de linfocitos	% (*)
CD3+CD4-CD8-	87 ± 9
γδ	74
αβ	26
CD4+CD8-	86 ± 3
CD4-CD8+	85 ± 4
células B	84 ± 12

(*) Media ± desviación estándar

TABLA 2:

Producción de IgG por células Sac-B a las que se han añadido diferentes tipos de linfocitos y se han estimulado con anti-CD2. A diferencia de los linfocitos CD4+, las células DN en reposo o activadas no inducen a la producción de IgG. Resultados de 3 experimentos representativos.

TABLA 2:

(Ver leyenda en la página anterior)

Linfocitos añadidos a las células Sac-B	Producción de IgG (ug/ml)	
	Medio	anti-CD2
Experimento 1		
Nada	<0.5	<0.5
CD4+	<0.5	9.7
CD3+ CD4- CD8-	<0.5	<0.5
CD3+ CD4- CD8- tratadas con IL2	<0.5	<0.5
Experimento 2		
Nada	<0.1	<0.1
CD4+	<0.1	19.8
CD3+ CD4- CD8-	<0.1	ND
CD3+ CD4- CD8- tratadas con IL2	<0.1	<0.1
Experimento 3		
Nada	<0.1	<0.1
CD4+	0.8	16.4
CD3+ CD4- CD8-	ND	<0.1
CD3+ CD4- CD8- tratadas con IL2	<0.1	<0.1

TABLA 3:

Resultado de la proliferación de diferentes tipos de células con varios estímulos. Los linfocitos DN fueron los que mostraron la mejor respuesta al estímulo con IL2 y sin embargo la respuesta con PHA fue bastante pobre en comparación con los otros grupos.

Tipo de células	Proliferación (*)			
	anti-CD3	Med.	PHA	IL2
PBMc	12.666	551	44.201	3.202
Linfocitos	449	723	62.473	2.698
Linfocitos + monocitos 50%	6.237	464	73.780	4.225
DN	508	271	10.502	6.457
DN + monocitos 50%	523	782	30.742	8.253

(*) cpm

FIGURA 1:

Análisis del fenotipo de las PBMc de un donante sano por citofluorografía. En el eje de abcisas está representado el logaritmo de la intensidad de las células teñidas con anti-CD4 y anti-CD8 marcados con fluoresceína. En el eje de ordenadas aquellas células teñidas con anti-CD3 marcado con ficoeritrina. La población de células DN es la que se encuentra en el cuadrante I con el fenotipo CD3+CD4-CD8- y constituye el 2.8% del total de PBMc.

FIGURA 1:

(Ver leyenda en la página anterior)

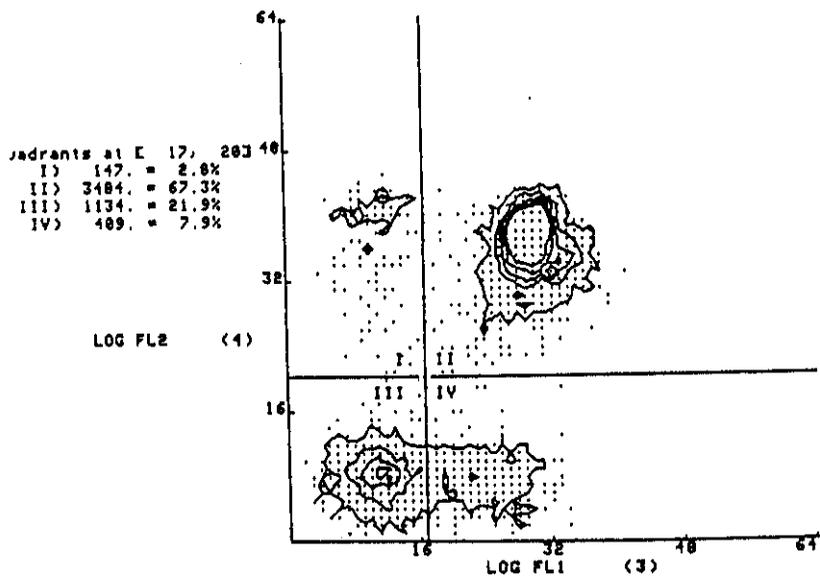


FIGURA 2:

Después del proceso de separación marcando el fenotipo de las células con diferentes AcM fluoresceinados y separándolas por citometría de flujo, la población de células DN alcanzó una pureza del 83% en este experimento, como muestra el cuadrante I. (Ver la leyenda de la figura 1)

FIGURA 2:

(Ver leyenda en la página anterior)

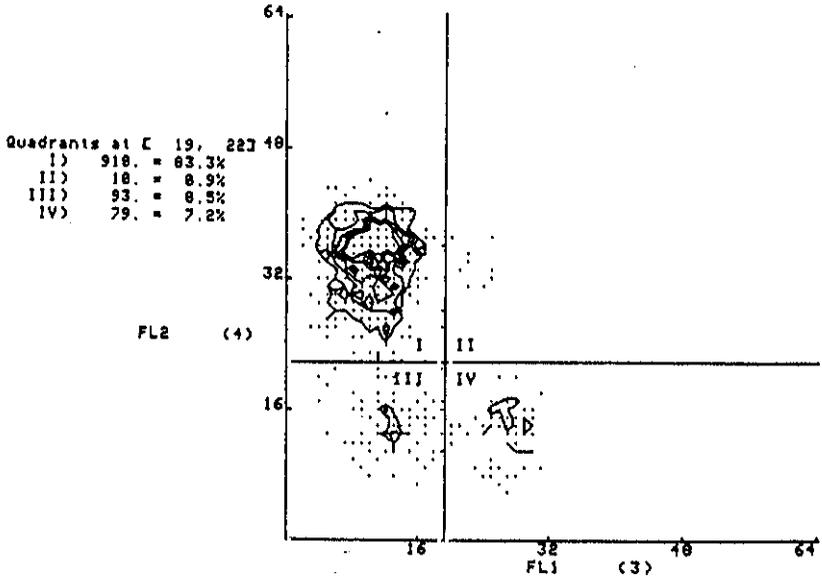


FIGURA 3:

Comparación en la producción de Igs por células B y células preactivadas Sac-B a las que se han añadido linfocitos CD4+ y diferentes tipos de células DN. Los linfocitos Sac-B produjeron mayor cantidad de Igs (columnas abiertas) y la supresión producida por las células DN-IL2 (columnas negras) fue mayor que la de las células DN (columnas ralladas). Datos obtenidos de un experimento representativo.

FIGURA 3:

(Ver leyenda en la página anterior)

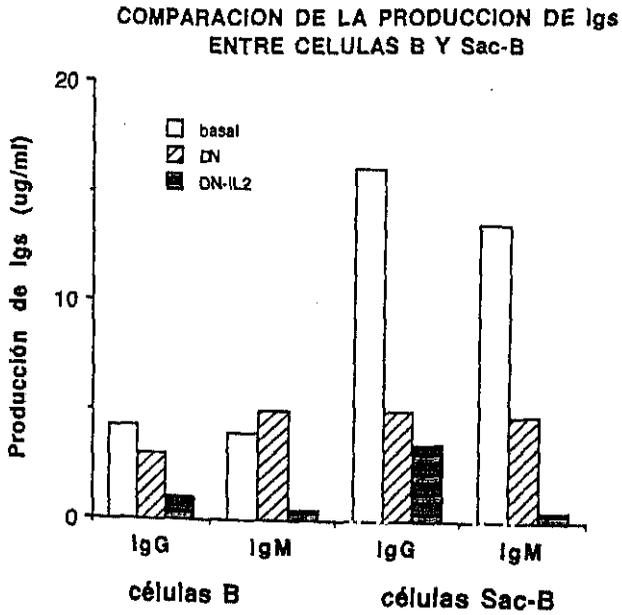


FIGURA 4:

Resultados de un experimento tipo. Tanto las células DN como las células DN-IL2 fueron incapaces de inducir la maduración y producción de Igs por las células Sac-B sin la presencia de los linfocitos CD4+. En este experimento se puede ver como grandes concentraciones de linfocitos DN-IL2 son capaces de eliminar la supresión que se produce a pequeñas concentraciones. También se puede ver como la adición de IL2 a los cultivos elimina la supresión que producen las células DN-IL2.

FIGURA 4:

(Ver leyenda en la página anterior)

PRODUCCION DE IGG E IGM POR DIFERENTES CULTIVOS DE LINFOCITOS

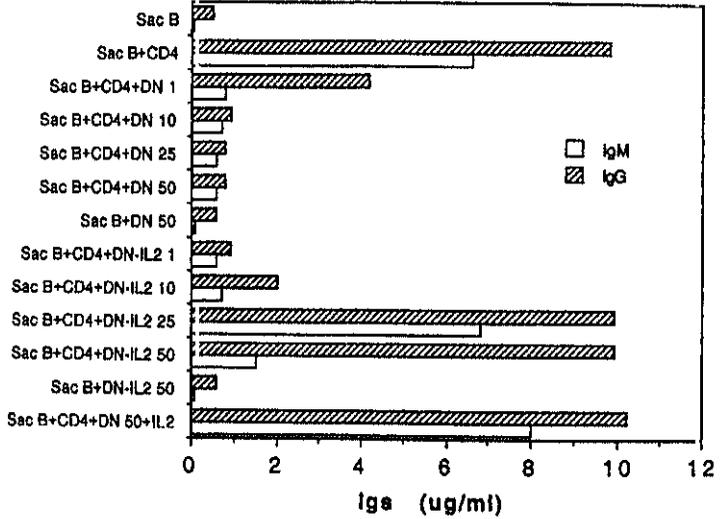


FIGURA 5:

Efecto de las células DN sobre la producción de anticuerpos en 6 diferentes experimentos. Sólo las altas concentraciones de células DN fueron capaces de suprimir la producción de anticuerpos por células Sac-B. Las bajas concentraciones entre 1-10%, que se pueden considerar como mínimas, no produjeron ningún efecto.

FIGURA 5:

(Ver leyenda en la página anterior)

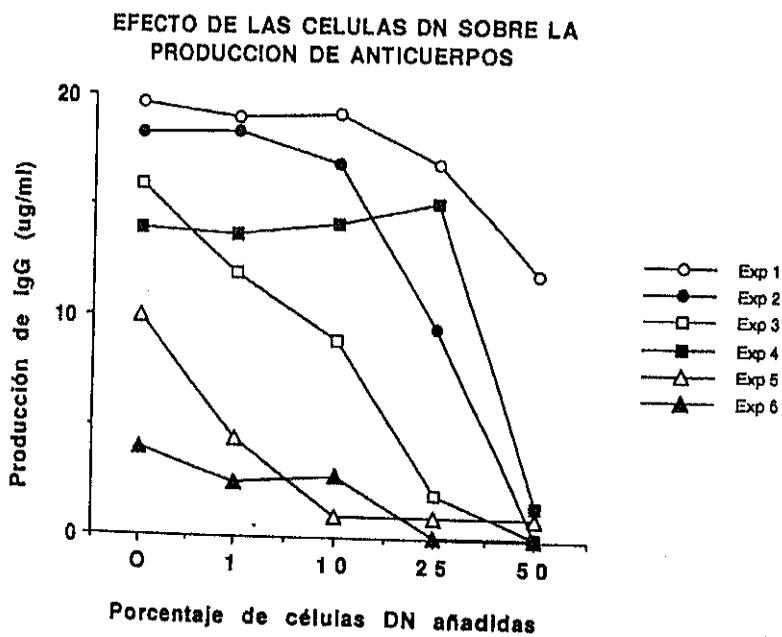


FIGURA 6:

Efecto de las células preactivadas DN-IL2 sobre la producción de anticuerpos. Aquí se puede ver el fenómeno de la supresión con bajas concentraciones de células y el fenómeno de la estimulación a altas concentraciones. La estimulación no sigue un patrón homogéneo como le ocurre a la supresión.

FIGURA 6:

(Ver leyenda en la página anterior)

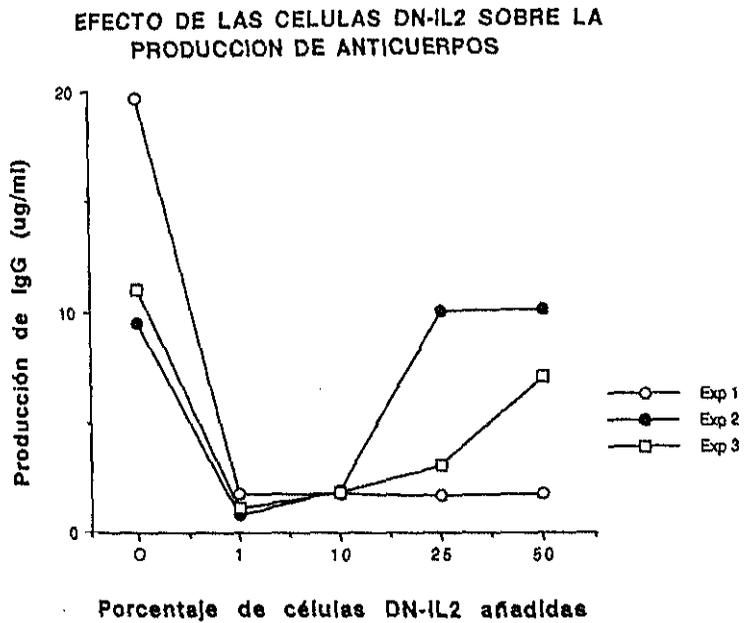


FIGURA 7:

En este experimento se puede ver que cantidades tan pequeñas como el 0.1% de células DN-IL2 añadidas a los cultivos fueron capaces de producir cierto grado de supresión.

FIGURA 7:

(Ver leyenda en la página anterior)

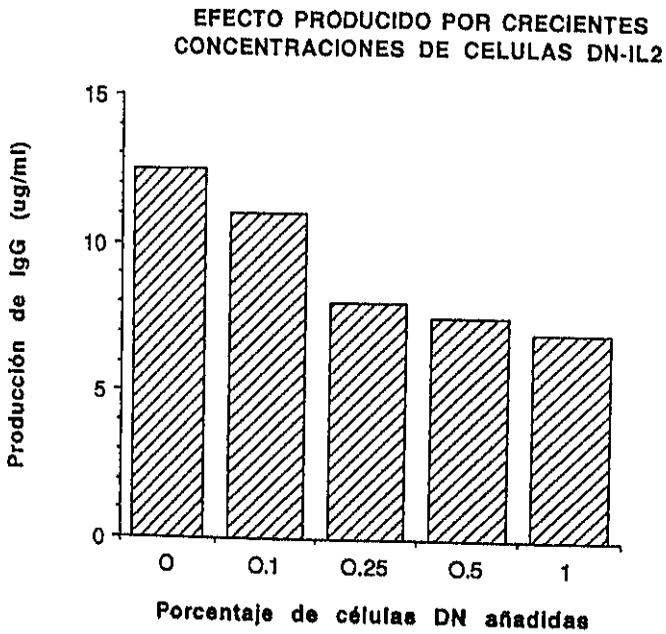


FIGURA 8:

Efecto producido por la depleción de las células $\tau\delta$. La población de células DN-IL2 produjo una marcada supresión de la producción de Igs a bajas concentraciones. Sin embargo, cuando a esa población se le privó de las células $\tau\delta$, la población resultante (DNab) no fue capaz de producir la misma supresión.

FIGURA 8:

(Ver leyenda en la página anterior)

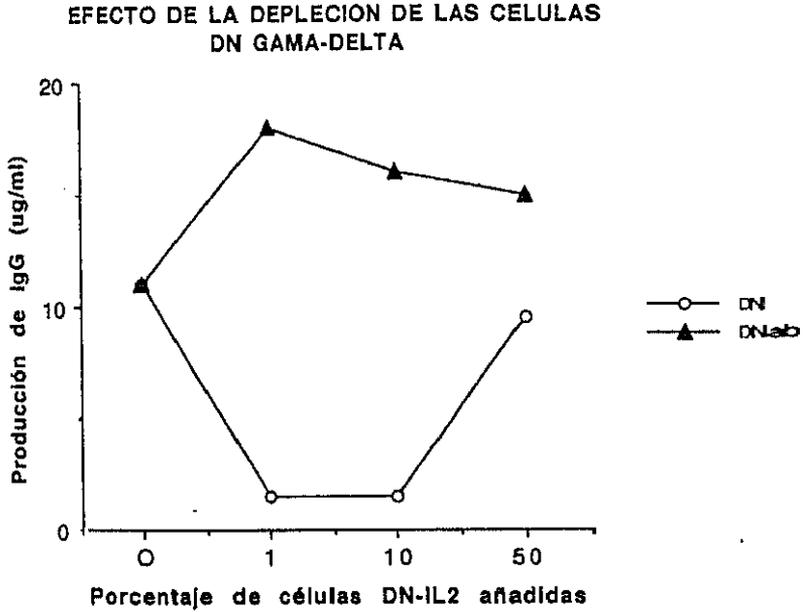


FIGURA 9:

Efecto producido por diferentes poblaciones de células DN sobre la producción de IgG. A concentraciones del 25%, sólo la población de células DNt δ fue capaz de producir una significativa supresión.

FIGURA 9:

(Ver leyenda en la página anterior)

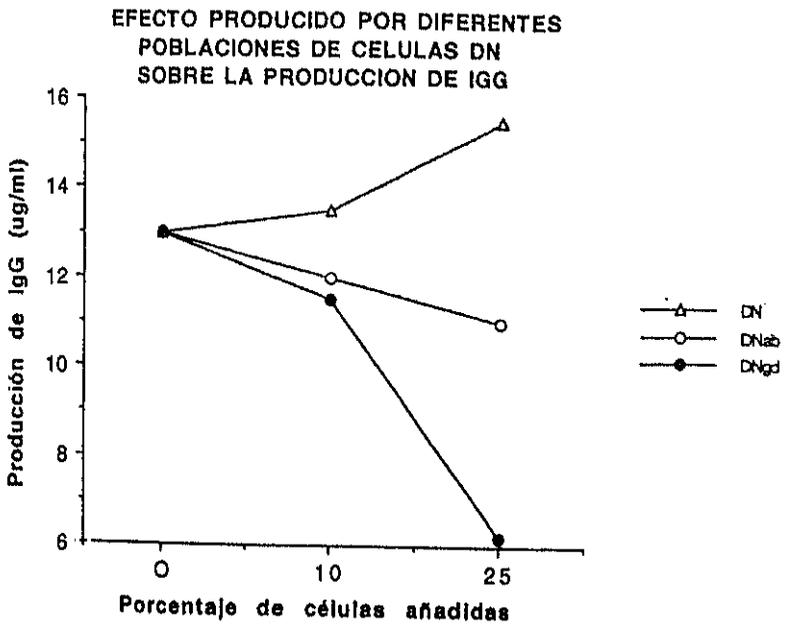


FIGURA 10:

Producción de IgM en el experimento de la figura anterior. A altas concentraciones (25%) se observa como las células DN inhiben la producción de IgM, la inhibición producida por las células DNt6 es todavía mayor y, por el contrario, a esa concentración se observa un aumento de la producción de IgM por las células DNa8.

FIGURA 10:

(Ver leyenda en la página anterior)

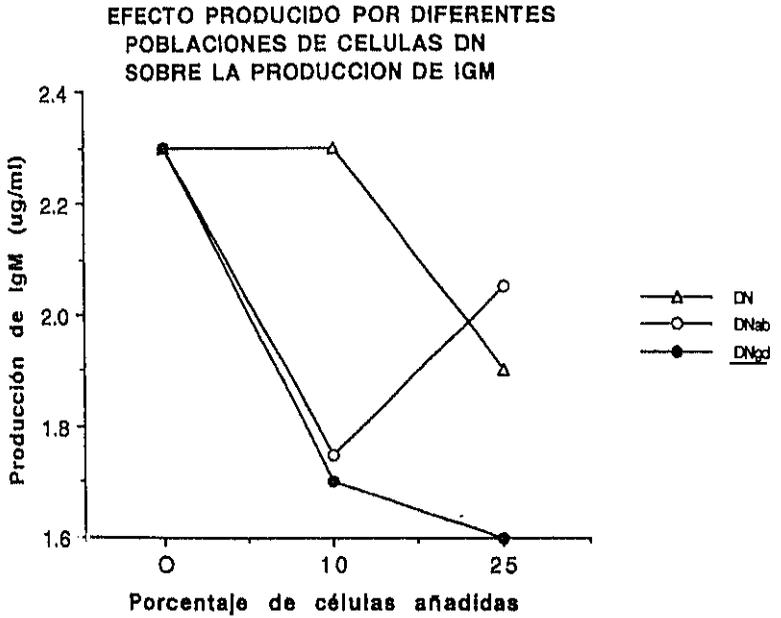


FIGURA 11:

Efecto producido por la adición al medio de cultivo del AcM anti-r δ . La supresión producida por las células DN-IL2 es completamente eliminada por este AcM. En alguno de los experimentos, como el de la figura, se produjo un gran aumento de la producción de anticuerpos sugiriendo que la estimulación de estas células vía TCR produce un efecto diferente al que estamos estudiando.

FIGURA 11:

(Ver leyenda en la página anterior)

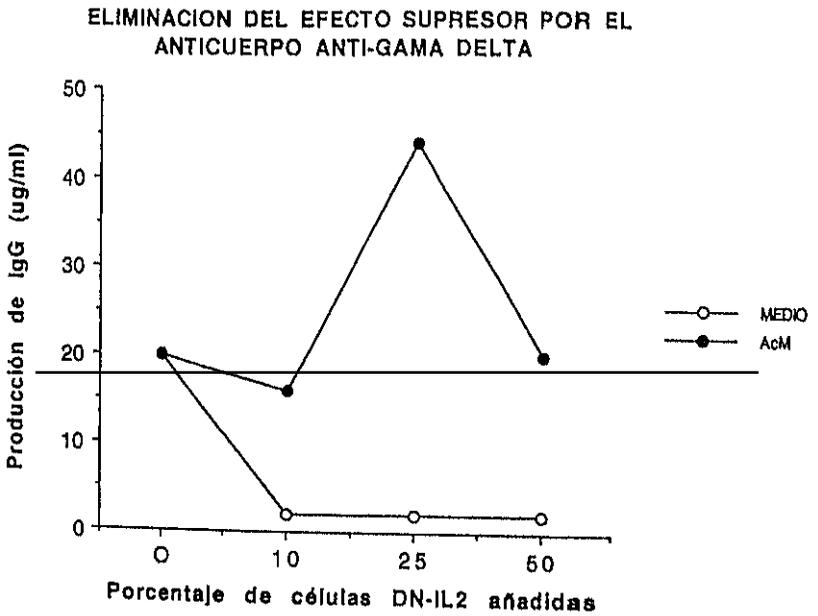


FIGURA 12:

En esta figura también se puede ver como el AcM anti- $\tau\delta$ es capaz de eliminar la supresión producida por altas concentraciones de células DN en reposo.

FIGURA 12:

(Ver leyenda en la página anterior)

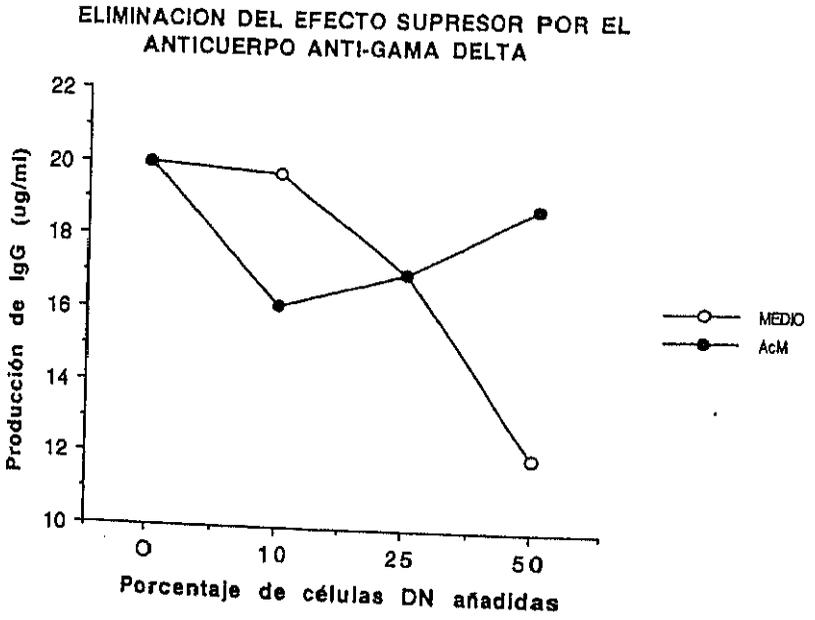


FIGURA 13:

Las células nulas CD3-CD4-CD8- produjeron una estimulación en la producción de anticuerpos por las células B dependientes de los linfocitos CD4+. Las células nulas, actuando directamente sobre los linfocitos B, no fueron capaces de inducir la maduración y diferenciación de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos.

FIGURA 13:

(Ver leyenda en la página anterior)

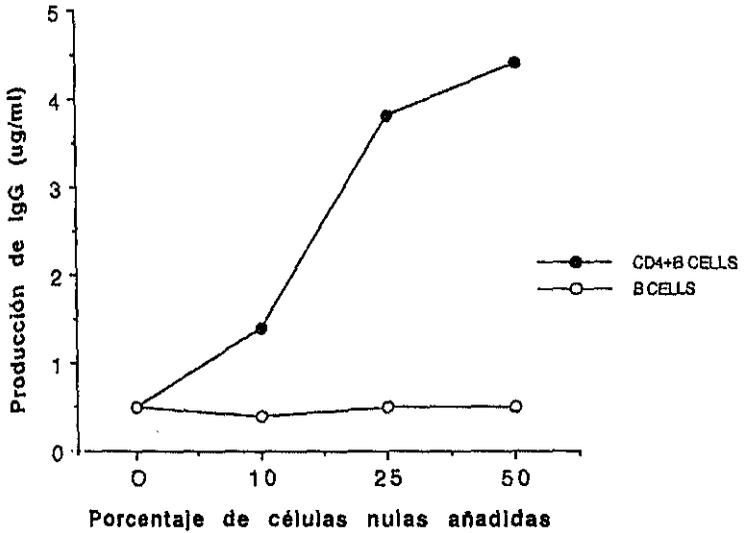
**ESTIMULACION DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS
PRODUCIDA POR LAS CELULAS NULAS**

FIGURA 14:

Secuencia que muestra el fenotipo $\tau 6$ positivo de los linfocitos de un cultivo de células DN estimuladas con IL2 en los días 1', 5'y 8'. En el día 1^o un 56% de las células son $\tau 6+$ mientras que el resto son células nulas y linfocitos $\alpha\beta$. Al 5^o día, el 70% de las células son $\tau 6$ y además hay una subpoblación que está expresando el TCR $\tau 6$ con mayor intensidad. El último día de cultivo, prácticamente la totalidad de las células del cultivo son linfocitos $\tau 6$.

FIGURA 14:

(Ver leyenda en la página anterior)

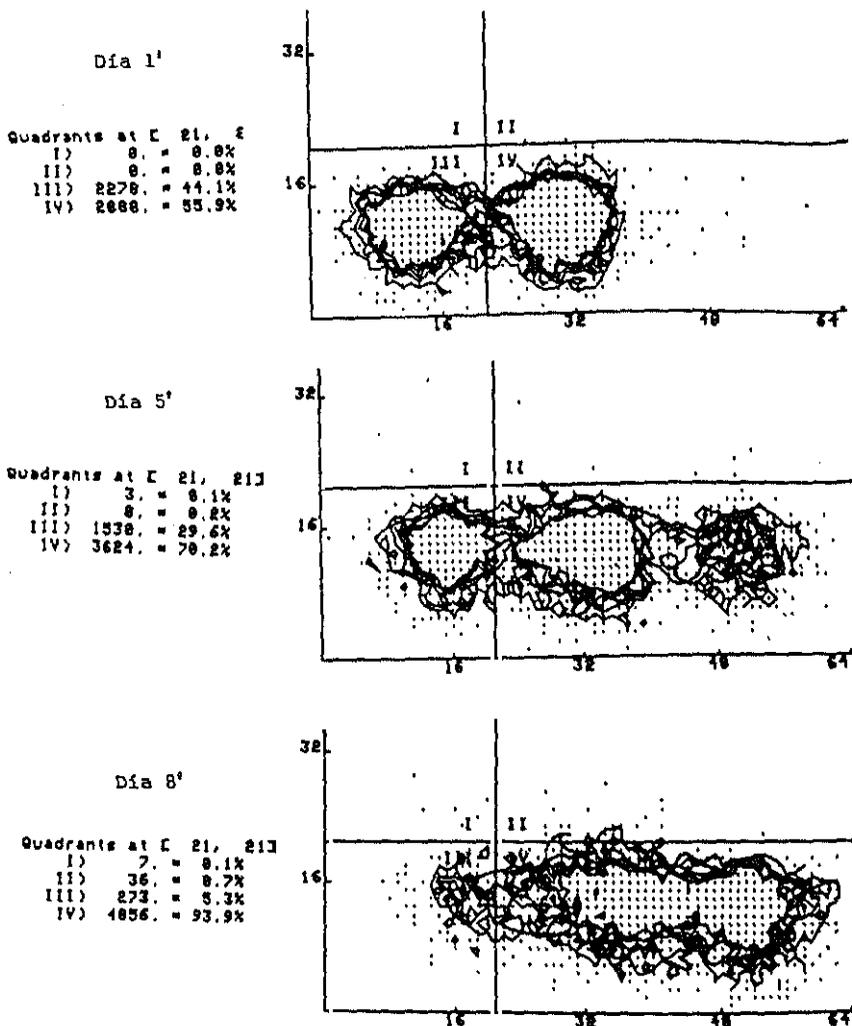


FIGURA 15 y 15 bis:

Efecto de las células DN alogénicas en la producción de IgG e IgM. El fenotipo de los donantes es como sigue:

Donante 1: A24, A26, B7, B44, CW5, DR3, DQw2

Donante 2: A1, A32, B8, B40, CW3, DR3, DRw2

Mientras que las células DN autólogas produjeron supresión de la producción de anticuerpos, las células alogénicas fueron incapaces de hacerlo.

FIGURA 15:

(Ver leyenda en la página anterior)

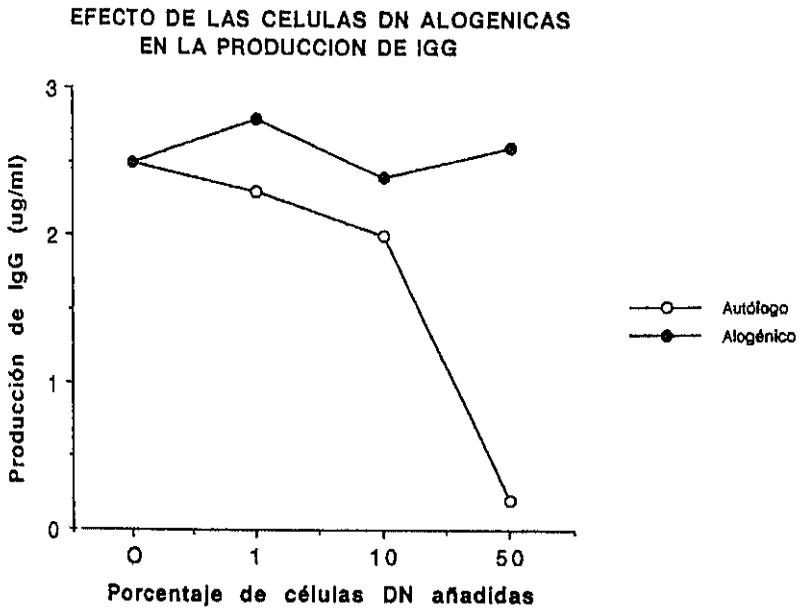


FIGURA 15 bis:

(Ver leyenda en la página anterior)

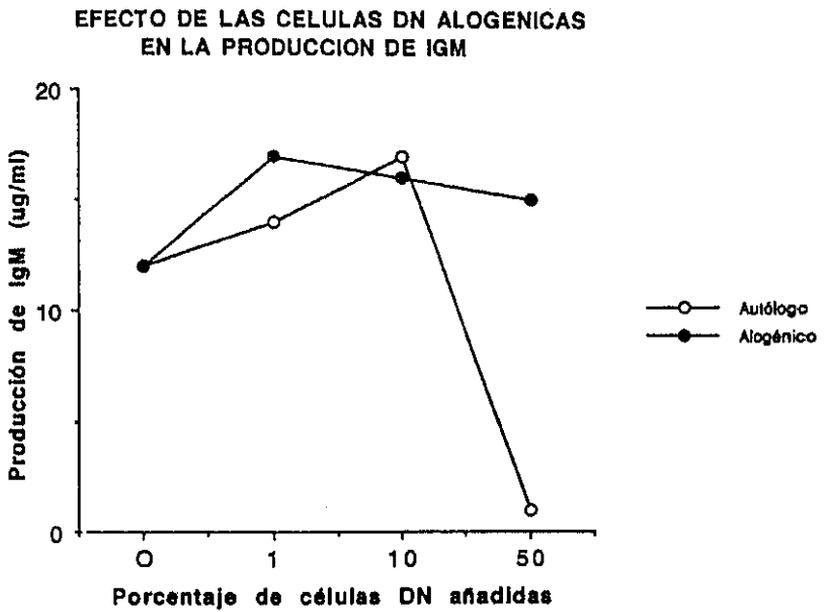
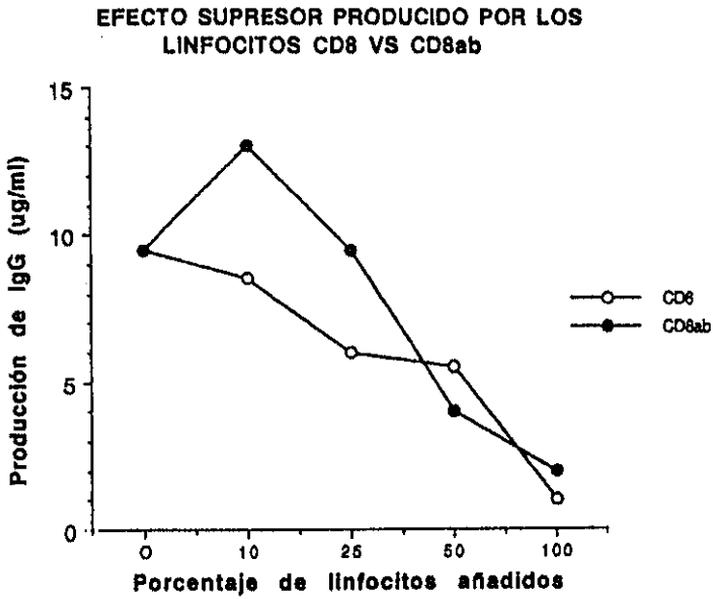


FIGURA 16:

Comparación del efecto supresor producido por los linfocitos CD8+ con el efecto producido por una población de linfocitos CD8+ a los que se ha deplecionado de células $\tau\delta$. En este experimento no se observaron diferencias significativas produciendo ambas poblaciones el mismo efecto supresor.

FIGURA 16:

(Ver leyenda en la página anterior)



ABREVIATURAS

Principales abreviaturas usadas en este trabajo.

ACM	Anticuerpos monoclonales
AR	Artritis reumatoide
C	región Constante
cpm	cuentas por minuto
D	región Diversidad
DN	Doble negativos
hsp	proteínas del estrés
Igs	Inmunoglobulinas
IL2	Interleuquina 2
J	región de Unión
LES	lupus eritematoso sistémico
MC	Medio completo de cultivo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
PBMc	células periféricas mononucleares
Sac	Parades celulares de <u>S. aureus</u>
TCR	Receptor de la célula T
V	región Variable

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Allison JP, McIntyre BW, Bloch D. Tumor specific antigen of murine T lymphoma defined with monoclonal antibody. *J Immunol* 1982;129:2293-2300
- 2.- Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988;6:381-405
- 3.- Leder P, Honjo T, Packman S, Swan D, Nau M, Norman B. The organization and diversity of immunoglobulin genes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974;71:5109-5114
- 4.- Dreyer WJ, Bennett JC. The molecular basis of antibody formation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1965;54:864-869
- 5.- Legler MK, Cohen EP. Hybridization properties of immunoglobulin mRNA: Failure to detect cocally associated IgG mRNA transcripts of reiterated and unique mouse DNA. *Proc Nat Acad Sci USA* 1977;74:3528-3532
- 6.- Capra JD, Kehoe JM. Hypervariable regions,

- idiotype and the antibody combining site. *Adv Immunol* 1975;20:1-40
- 7.- Meuer S, Fitzgerald K, Hussey R, Hodgson J, Schlossmann S, Reinherz E. Clonotypic structures involved in antigen specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J Exp Med* 1983;157:705-719
- 8.- Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1983;157:1149-1169
- 9.- Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri N. The molecular genetics of the T cell antigen receptor and T cell antigen recognition. *Ann Rev Immunol* 1986;4:529-591
- 10.- Siu G, Clark SP, Yoshikai Y. The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. *Cell* 1984;37:393-401
- 11.- Hood L, Kronenberg M, Hunkapiller T. T cell antigen receptor and the immunoglobulin supergene family. *Cell* 1985;40:225-232
- 12.- Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-581
- 13.- Geppert TD, Davis LS, Gur H, Wachsoltz MC,

- Lipsky PE. Accessory cell signals involved in T-cell activation. *Immunol Rev* 1990;117:5-66
- 14.- Kindred B, Shreffler DC. H-2 dependence cooperation between T and B cells in vivo. *J Immunol* 1972;109:940-945
- 15.- Lafaille JJ, DeCloux A, Bonneville M, Takagaki Y, Tonegawa S. Junctional sequences of T cell receptor α/δ genes: Implications for $\alpha\delta$ T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 1990;59:859-870
- 16.- Borst J, Prendiville MA, Terhorst C. The T3 complex on human lymphocytes involves four structurally distinct glycoproteins. *J Biol Chem* 1983;258:5135-5142
- 17.- Reinherz EM, Schlossman SF. The function and differentiation of human T cells. *Cell* 1980;19:821-827
- 18.- Engleman EG, Benike CG, Gluckman E, Evans RL. Antibodies to membrane structures that distinguish suppressor/cytotoxic and helper T lymphocyte subpopulations block the mixed lymphocyte reaction in man. *J Exp Med* 1981;154:193-198
- 19.- Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1987;330:256
- 20.- Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littmann DR. Cell-cell adhesion mediated by CD8

- and MHC class I molecules. Nature 1888:336:79
- 21.- Lanier LL, Ruitenberg JJ, Phillips JH. Human CD3+ T lymphocytes that express neither CD4 nor CD8 antigens. J Exp Med 1986;164:339-344
- 22.- Borst J, van de Griend RJ, van Oostveen JW, Ang SL, Melief CJ, Seidman JG, Bolhuis RLH. A T-cell receptor α /CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. Nature 1987;325:683-688
- 23.- Bender A, Kabelitz D. CD4-CD8- Human T Cells: Phenotypic Heterogeneity and Activation Requirements of Freshly Isolated "Bouuble Negative" T Cells. Cell Immunol 1990;128:542-554
- 24.- Fowlkes BJ, Pardoll D. Molecular and cellular events of T cell development. Adv Immunol 1989;44:207-264
- 25.- Toribio ML, Martínez-A C, Marcos MAR, Marquez C, Cabrero E, de la Hera A. A role for T3+4-8-transitional thymocytes in the differentiation of mature and functional T cells from human prothymocytes. Proc Nat Acad Sci USA 1986;83:6985-6988
- 26.- Lanier LL, Weiss A. Presence of T_i (WT31) negative T lymphocytes in normal blood and thymus. Nature 1986;324:268-270
- 27.- Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman JG, Ip S, Rosen

- F, Krangel MS. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 1986;322:145-149
- 28.- Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 1984;309:757-762
- 29.- Bucy RP, Chen CLH, Cihak J, Losch U, Cooper MD. Avian T cell expressing $\tau\delta$ receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J Immunol* 1988;141:2200
- 30.- Scott CS, Richards, SJ, Roberts BE. Patterns of membrane TCR $\alpha\beta$ and TCR $\tau\delta$ chain expression by normal blood CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8^{dual} and CD4-CD8- lymphocytes. *Immunology* 1990;70:351-356
- 31.- Smith MD, Worman C, Yüksel F, Yüksel B, Moretta L, Ciccone E, Grossi CE, Mackenzie L, Lydyard PM. T $\tau\delta$ -cell subsets in cord and adult blood. *Scan J Rheumatol* 1990;32:491-495
- 32.- Inghiremi G, Ying Zhu B, Chess L, Knowles DM. Flow cytometric and immunohistochemical characterization of the $\tau\delta$ T-lymphocyte population in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. *Am J Pathol* 1990;136:357-367
- 33.- Allison JP, Havran WL. The immunobiology of the T cells with invariant $\tau\delta$ antigen

- receptors. *Annu Rev Immunol* 1991;9:679-705
- 34.- Asarnow DM, Kuziel WA, Bonyhadi M, Tigelaar RE, Tucker PW, Allison JP. Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Cell* 1988;55:837
- 35.- Borst J, Whicherink A, Van Dongen JJM, De Vries E, Commans-Bitter WH, Wassenaar F, Van Den Elsen P. Non-random expression of T-cell receptor α and δ variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood. *Europ J Immunol* 1989;19:1559-1568
- 36.- Haregewoin A, Soman G, Hom RC, Finberg RW. Human $\alpha\delta$ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature* 1989;340:309-312
- 37.- Janeway CA, Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cells bearing $\alpha\delta$ receptors. *Immunol Today* 1988;9:73-76
- 38.- Bandeira A, Itohara S, Bonneville M, Burlen-Defranoux O, Mota-Santos T, Coutinho A, Tonegawa S. Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor $\alpha\delta$. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991;88:43-47
- 39.- Horwitz D. Systemic lupus erythematosus: Generalized autoimmunity arising from disordered immune regulation. En: *Arthritis and allied conditions*. Editado por McCarty DJ.

Philadelphia, 1992.

- 40.- Shivakumar S, Tsokos GC, Datta SK. T Cell receptor α/β expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J Immunol* 1989;143:103-112
- 41.- Rajagopalan S, Zordan T, Tsokos GC, Datta SK. Pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T helper cell lines from patients with active lupus nephritis: Isolation of CD4-8- T helper cell lines that express the δ T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7020-7024
- 42.- Masuda T, Ohteki T, Abo T, Seki S, Nose M, Nagura H, Kumagai K. Expansion of double negative CD4-8- $\alpha\delta$ T cells in the liver is a common feature of autoimmune mice. *J Immunol* 1991;147:2907-2912
- 43.- Brennan F, Plater-Zyberk C, Maini RN, Feldmann M. Coordinate expansion of "fetal type" lymphocytes (TCR δ + T and CD5+ B) in rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1989;77:175-178
- 44.- Huet S, Wakasugi H, Sterkers G, Gilmour J. T cell activation via CD2 (T, gp50): The role of accessory cells in activating resting T cells via CD2. *J Immunol* 1986;137:1420-1425

- 45.- Posnett DN, Bigler RD, Boshkin Y, et al. T cell antiidiotype antibodies reveal differences between two human leukemias. *J Exp Med* 1984;160:494-500
- 46.- Band HF, Hochstenbach F, McLean J, Hata S, Krangel MS, Brenner MB. Immunochemical proof that a novel rearranging gene encodes the T cell receptor delta subunit. *Science* 1987;238:682-684
- 47.- Kurrle R, Kanzy EJ, Racenberg J, Lang W, Seiler FR. BMA 031- A TCR-specific monoclonal antibody for clinical application. *Transplant Pro* 1989;21:1017-1019
- 48.- Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii K, Nakahima K, Kishimoto T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 1988;167:332-344
- 49.- Takahashi T, Gray D, Horwitz D. Human CD8+ lymphocytes stimulated in the absence of CD4+ cells enhance IgG production by antibody-secreting B cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;58:352-365
- 50.- Shau H, Golub SH. Depletion of NK cells with the lysosomotropic agent L-Leucine methyl ester and the in vitro generation of NK activity from NK precursor cells. *J Immunol* 1985;134:1136-1141

- 51.- Takahashi T, Gray D, Hirokawa M, Horwitz D. Antibody production induced by CD4+ or CD8+ T cells stimulated with anti-CD2: A novel role for B cells as accessory cells. (En prensa)
- 52.- Gray D, Horwitz D. Lymphocytes expressing type 3 complement receptors proliferate in response to interleukin 2 and are the precursors of lymphokine-activated killer cells. J Clin Invest 1988;81:1247-1254
- 53.- Abo W, Gray JD, Bakka A, Horwitz D. Studies on human blood lymphocytes with iC3b (type 3) complement receptors. II. Characterization of subsets wich regulate pokeweed mitogen induced lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis. Clin Exp Immunol 1987;67:544-555
- 54.- Toribio ML, Alonso JM, Bârcena A, Gutiérrez JC, de la Hera A, Marcos MAR, Márquez C, Martínez-A C. Human T-cell precursors: Involvement of the IL-2 pathway in the generation of mature T cells. Immunol Rev 1988;104:55-79
- 55.- Scollay R, Wilson A, D'Amico A, Kelly K, Egerton M, Pearse M, Wu L, Shortman K. Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. Immunol Rev 1988;104:81-120
- 56.- Allison JP, Lanier LL. The T-cell antigen receptor gamma gene: Rearrangement and cell

- lineages. Immunol Today 1987;8:293-296
- 57.- Pardoll DM, Fowlkes BJ, Bluestone JA, Kruisbeek A, Maloy WL, Coligan J, Schwartz RH. Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. Nature 1987;326:79-83
- 58.- Pantelorius EM. Absence of thymus in a mouse mutant. Nature 1968;217-370-375
- 59.- Itohara S, Nakanishi N, Kanagawa O, Kubo R, Tonegawa S. Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor α 5: Analysis of α 5 T cells in thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. Proc Nat Acad Sci USA 1989;86:5094-5098
- 60.- Bonneville M, Itohara S, Krecko EG, Monbaerts P, Ishida I, Katsuki M, Berns A, Farr AG, Janeway CA, Tonegawa S. Transgenic mice demonstrate that epithelial homing of α 5 T cells is determined by cell lineages independent of T cell receptor specificity. J Exp Med 1990;171:1015-1026
- 61.- Lefrançois L. Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unequal T-cell repertoire?. Immunol Today 1991;12:436-438
- 62.- Boehmer H von, Kisielow P. Self-nonself discrimination by T cells. Science 1990;248:1369-1373

- 63.- Rivera J, Horwitz D. IL-2 activated $\alpha\delta$ CD3+CD4-CD8- (Double negative) lymphocytes markedly inhibit T-cell dependent antibody production. (Enviado para publicación)
- 64.- Yachie A, Ueno Y, Takano N, Miyawaki T, aniguchi N. Developmental changes of double negative (CD3+4-8-) T cells in human peripheral blood. Clin Exp Immunol 1989;76:258-261
- 65.- Bolhui RLH, Sturm E, Fisch P, Sondel PM, Braakman E. Human $\alpha\delta$ T lymphocytes subsets: Activation by superantigens ? Res Immunol 1990;141:658-663
- 66.- Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, Glass D, Strominger JL, Brenner MB. Evidence for extrathymic changes in the T-cell receptor $\alpha\delta$ repertoire. J Exp Med 1990;171:1597-1612
- 67.- Kabelitz D, Pechhold K, Bender A, Waselborg S, Wesch D, Friese K, Janasen O. Activation and activation-driven death of human $\alpha\delta$ T cells. Immunol Rev 1991;120:71-88
- 68.- Moretta L, Ciccone E, Ferrini S, Pelicci PG, Mingari MC, Zeromski J, Bittino C, Grossi C, Moretta A. Molecular and cellular analysis of human T lymphocytes expressing $\alpha\delta$ T-cell receptor. Immunol Rev 1991;120:117-135
- 69.- Miyawaki T, Kasahara Y, Taga K, Yachie A,

- Taniguchi N. Differential expression of CD45RO (UCHL-1) and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR- γ/δ lymphocytes. *J Exp Med* 1990;171:1833-1838
- 70.- Beverly PCL. Human T cell subsets. *Immunol Letters* 1987;14:263-270
- 71.- Aparicio P, Alonso JM, Toribio ML, Gutiérrez JC, Pezzi L, Martínez-A C. Differential growth requirements and effector functions of α/β and γ/δ human T cells. *Immunol Rev* 1989;111:5-33
- 72.- Ho S, Campana D. Phenotypic changes and proliferative activity of human $\gamma\delta$ T cell receptor-bearing cells upon activation. *Clin Exp Immunol* 1991;84:376-382
- 73.- Wesselborg S, Janssen O, Pechhold K, Kabelitz D. Selective activation of $\gamma\delta$ T cell clones by single anti-CD2 antibodies. *J Exp Med* 1991;173:297-304
- 74.- Meuer S, Hussey R, Fabbi M, Fox D, Acuto O, Fitzgerald K, , Hodgdon J, Protentis JP, Schlossmann S, Reinherz E. An alternative pathway of T cell activation: A functional role for the 50kD T11 sheep erythrocyte receptor. *Cell* 1984;36:397-412
- 75.- Morita CT, Verma S, Aparicio P, Martínez-A C, Spits H, Brenner MB. Functionally distinct subset of human $\gamma\delta$ T cells. *Eur J Immunol* (En prensa).

- 76.- Kabelitz D, Bender A, Schonhalmaier S, Da Silva Lobo ML, Janssen O. Human Cytotoxic lymphocytes: Frequency and Specificity of $\tau 8$ cytotoxic lymphocytes precursors activated by allogenic or autologous stimulator cells. J Immunol 1990;145:2827-2832
- 77.- Waldmann TA. The structure, function and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes. Science 1986;232:727-732
- 78.- Lanier LL, Phillips JH. Evidence of three types of human cytotoxic lymphocyte. Immunol Today 1986;7:132-134
- 79.- Ferrini S, Zarcone D, Viale M, Cerruti G, Millo R, Moretta A, Grossi CE. Morphologic and functional characterization of human peripheral blood cells expressing the gamma/delta T-cell receptor. Eur J Immunol 1989;19:1183-1188
- 80.- Porcelli S, Brenner M, Greenstein J, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4- CD8- cytolytic T lymphocytes. Nature 1989;341:447-450
- 81.- Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torigian V, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma/delta T-cell receptors in human

- infectious disease lesions. Nature 1989;339:544-548
- 82.- Born W, Hall L, Dallas A, Boymel J, Shinnick T, Young D, Brennan P, O'Brien R. Recognition of a peptide antigen by heat shock reactive $\tau\delta$ T lymphocytes. Science 1990;249:67-69
- 83.- Welch WJ, Kang HS, Beckmann RP, Mizzen LA. Response of mammalian cells to metabolic stress; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. Curr Top Microbiol Immunol (En prensa)
- 84.- Kaufmann SHE. Heat shock proteins and the immune response. Immunol Today 1990;11:129-136
- 85.- Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker J, Anderson T, Warnke A, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB. Human lymphocytes bearing T cell receptor $\tau\delta$ are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. J Exp Med 1989;169:1277
- 86.- Groh V, Fabbi M, Hochstenback F, Maziarz RT, Strominger JL. Double negative (CD4-CD8-) lymphocytes bearing T-cell receptor α and β chains in normal human skin. Proc Natl Acad Sci 1989a;86:5059-5063
- 87.- Takagaki Y, De Cloux A, Bonneville M, Tonegawa S. Diversity of gamma delta T-cell receptors on murine intestinal intraepithelial lymphocytes. Nature 1989;339:712

- 88.- Holoshitz J. Potencial role of $\tau 6$ cells in autoimmune diseases. Res Immunol 1990;141:651-657
- 89.- Havran Wl Chien YH, Allison JP. Recognition of self antigens by skin-derived T-cells with invariant $\tau 6$ antigen receptors. Science 1991;252:1430-1432
- 90.- Goodman T, Lefrancois L. Expression of the $\tau 6$ T cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. Nature 1988;333:855
- 91.- Bonneville M, Janeway CA, Ito K, Haser W, Ishida I, Nakanishi N, Tonegawa S. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of $\tau 6$ T cells. Nature 1988;336:479
- 92.- Taguchi T, Aicher WK, Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, Bluestone JA, Kiyono H. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. J Immunol 1991;147:3736-3744
- 93.- Fujihashi K, Taguchi T, McGee JR, Eldridge JH, Bruce MG, Green DR, Singh B, Kiyono H. Regulatory fuction for murine intraepithelial lymphocytes. J Immunol 1990;1457:2010-2019
- 94.- Brandtzaeg P, Halstensen TS, Scott H, Sollid LM, Valnes K. Epithelial homing of $\tau 6$ T cells ? Nature 1989;341:113
- 95.- Brandtzaeg P, Vosnes V, Halstensen TS, Scott H, Sollid LM, Valnes K. T lymphocytes in human

- gut epithelium preferentially express the $\alpha\beta$ antigen receptor and are often CD45/UCHL1 positive. *Scan J Immunol* 1989a;30:123.
- 96.- Bluestone JA, Cron RQ, Cotterman M, Houlden BA, Matis LA. Structure and specificity of T cell receptor ϵ/δ on major histocompatibility complex antigen-specific CD3+, CD4-, CD8- T lymphocytes. *J Exp Med* 1988;168:1899-1916
- 97.- Carbone A, Harbeck R, Dallas A, Nemazee D, FinkelT, O'Brien R, Kubo R, Born W. Alpha beta T-lymphocyte depleted mice, a model for $\epsilon\delta$ T-lymphocyte functional studies. *Immunol Rev* 1991;120:35-50
- 98.- Londei M, Verhoeff A, De Berardinis P, Kissonerghis MGrubeck-loebenstein B, Feldmann M. Definition of a population of CD4-8- T cells that express the $\alpha\beta$ T-cell receptor and respond to interleukins 2, 3 and 4. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989;86:8502-8506
- 99.- Brooks EG, Wirt DP, Goldblum RM, Vaidya S, Asuncion MT, Patterson JC, Ware CF, Klimpel GR. Double-negative (CD4-CD8-) T cells with an α/β T cell receptor. Non-MHC-Restricted cytolytic activity and lymphokine production. *J Immunol* 1990;144:4507-4512
- 100.- Prud'Homme GJ, Bocarro DC, Luke ECH. Clonal deletion and autoreactivity in extrathymic CD4-CD8- (Double Negative) T cell receptor $\alpha\beta$

- T cells. *J Immunol* 1991;147:3314-3318
- 101.- Boehmer H von, Kierberg J, Rocha B. An unusual lineage of α/β T cells that contains autoreactive cells. *J Exp Med* 1991;174:1001-1008
- 102.- Wirt DP, Brooks EG, Vaidya S, Klimpel GR, Waldmann TA, Goldblum RM. Novel T-lymphocyte population in combined immunodeficiency with features of graft-versus-host disease. *New Eng J Med* 1989;321:370-374
- 103.- Strober S. Natural suppressor cells, neonatal tolerance, and total lymphoid irradiation: Exploring obscure relationships. *Ann Rev Immunol* 1984;2:219-237
- 104.- Strober S, Dejbachsh-Jones S, Van Vlasserlaer P, Duwe G, Salimi S, Alliso JP. Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8 surface phenotype and the α , β heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol* 1989;143:1118-1122
- 105.- Bruley-Rosset M, Miconnet I, Canon C, Halle-Pannenko O. Mls generated suppressor cells. Suppression is mediated by double negative (CD3+CD4-CD8-) $\alpha\beta$ T cell receptor bearing cells. *J Immunol* 1990;145:4046-4052
- 106.- Van Vlasselaer P, Strober S. $\alpha\beta$ TCR+ CD3+ CD4- CD8- cloned natural suppressor cells produce an immunosuppressive factor which is different

- from IFN- τ and TGF- β . *Transplant Proc* 1991;23:200-202
- 107.- Rivera J, Horwitz D. Regulatory effects of activated CD3+ double negative (CD4-CD8-) T cells and a novel triple negative (CD3-CD4-CD8-) subset on CD4 helper cell activity. *Arthritis Rheum* 1991;34:S164
- 108.- Ciccone E, Viale O, Botino C, Pende D, Migone N, Casorati G, Moretta A, Moretta L. Antigen recognition by human T-cell receptor gamma-positive lymphocyte. Specific lysis of allogeneic cells after activation in mixed lymphocytes culture. *J Exp Med* 1988;167:1517-1522
- 109.- Kozbor D, Trinchieri G, Monos DS, Isobe M, Russo G, Haney JA, Zmijewski C, Croce C. Human TCR- τ / δ +, CD8+ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC restricted fashion. *J Exp Med* 1989;169:1847-1851
- 110.- Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982;155:1823-1841
- 111.- Ferrick DA, Sydora B, Wallace V, et al., Self-Reactive $\gamma\delta$ T Lymphocytes: Implications for T-Cell Ontogeny and Reactivity, *Immunological*

Reviews 1991;120:51-69

- 112.- Eichelberger M, Allan W, Carding SR, Bottomly K, Doherty PC. Activation status of the CD3-8- α -T cells recovered from mice with influenza pneumonia. *J Immunol* 1991;147:2069-2074
- 113.- Vaessen LM, Ouwehand AJ, Baan CC, et al. Phenotypic and functional analysis of T cell receptor α bearing cells isolated from human heart allografts. *J Immunol* 1991;147:846-850
- 114.- Vilmer E, Guglielmi P, David V, et al. Predominant expression of circulating CD3+ lymphocytes bearing α T cell receptor in a prolonged immunodeficiency after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1988;82:755-761
- 115.- Morse HC, Davidson WF, Yetter RA, Murphy ED, Roths JB, Coffman RL. Abnormalities induced by the mutant gene LPR: Expansion of a unique lymphocyte subset. *J Immunol* 1982;129:2612-2617
- 116.- Nemazee DA, Struder S, Steinmetz M, Dambic Z, Kiefer M. The lymphoproliferating cells of MRL-lpr/lpr mice are a polyclonal population that bear the T lymphocyte receptor for antigen. *Eur J Immunol* 1985;15:760-764
- 117.- Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, De Bruyn J, Strober S. Isolation of CD4- CD8- mycobacteria reactive T lymphocyte clones from rheumatoid

- arthritis synovial fluid. *Nature* 1989;339:226-229
- 118.- Rème T, Portier M, Frayssinoux F, Combe B, Miossec P, Favier F, Sany J. T cell receptor expression and activation of synovial lymphocyte subsets in patients with rheumatoid arthritis: phenotyping of multiple synovial sites. *Arthritis Rheum* 1990;33:485-492
- 119.- Jacobs MR, Haynes BF. Distribution of TCR $\alpha\beta$ cells in tissue from patients with inflammatory diseases. *Arthritis Rheum* 1990;32,S16
- 120.- Smith MD, Bröker B, Moretta L, Ciccone E, Grossi CE, Edwards JCW, Yüksel F, Colaco B, Worman C, Mackenzie L, Kinne R, Weseloh G, Glückert K, Lydyard PM. Tr δ cells and their subsets in blood and synovial tissue from rheumatoid arthritis patients. *Scand J Immunol* 1990;32:585-593
- 121.- Meliconi R, Pitzalis C, Kingsley H, Panayi GS. $\alpha\beta$ T cells and their subpopulations in blood and synovial fluid from rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;59:165-172
- 122.- Hardy RR, Hayakawa K, Shimizu M, Yamasaki K, Kishimoto T. Rheumatoid factor secretion from human Leu-1+ B cells. *Science* 1987;236:81-83
- 123.- Söderström K, Halapi E, Nilsson E, Grönberg A, Van Embden J, Klareskog L, Kiessling R.

- Synovial cells responding to a 65-kDa mycobacterial heat shock protein have a high proportion of a TCR α δ subtype uncommon in peripheral blood. *Scan J Immunol* 1990;32:503-505
- 124.- Andreu JL, Trujillo A, Alonso JM, Mulero J, Martinez-A C. Selective expansion of T cells bearing the α / δ receptor and expressing an unusual repertoire in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:808-814
- 125.- Berman A, Espinoza LR, Diaz JD, Aguilar JI, Rolando T, Vasey FB, Germain BF, Lockey RF. Rheumatic manifestations of human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* 1988;85:59-64
- 126.- Monteagudo I, Rivera J, Lopez-Longo J, Cosin J, Garcia-Monforte A, Carreño L. AIDS and rheumatic manifestations in patients addicted to drugs. An analysis of 106 cases. *J Rheumatol* 1991;18:1038-1041.
- 127.- Rivera J, Monteagudo I, Lopez-Longo J, Maldonado E, Carreño L. Anticardiolipin antibodies in drug addicted patients with AIDS. *Ann Rheum Dis* 1991;50:338.
- 128.- Hoffmann GW, Kion TA, Grant MD. An idiotypic network model of AIDS immunopathogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991;88:3060-3064

- 129.- Kion TA, Hoffmann GW. Anti-HIV and anti-anti-MHC antibodies in alloimmune and autoimmune mice. *Science* 1991;253:1138-1140
- 130.- Marcos MR, Gaspar ML, De la Hera A, Toribio ML, Márquez C, Millán I, Martínez-A C. Selective expansion of a CD3+CD4-CD8-subpopulation in clinical groups associated with human immunodeficiency virus infection. *Scan J Immunol* 1987;25:321-333
- 131.- Margolick JB, Scott ER, Odaka N, Saah AJ. Flow cytometric analysis of $\gamma\delta$ T cells and natural Killer cells in HIV-1 infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;58:126-138
- 132.- Paolli P de, Gennari D, Martelli P, Basaglia G, Crovatto M, Battistin S. A subset of $\gamma\delta$ lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1991;83:187-191
- 133.- Carbonari M, Cherchi M, Paganelli R, Gianinri G, Galli E, Gaetano C, Papetti C, Fiorilli M. Relative increase of T cells expressing the gamma/delta rather than the alpha/beta receptor in ataxia-telangiectasia. *N Eng J Med* 1990;322:73-76
- 134.- Uyemura K, Deans RJ, Band H, Ohmen J, Panchamoorthy G, Morita CT, Rea TH, Modlin RL. Evidence for clonal selection of $\gamma\delta$ T cells in response to a human pathogen. *J Exp Med* 1991;174:683-692

- 135.- Spencer J, Isaacson PG, Diss TC, McDonald TT.
Expression of disulphide linked and non-
disulphide linked forms of the T cell receptor
gamma/delta heterodimer in human intestinal
intraepithelial lymphocytes. Eur J Immunol
1989;19:1335-1342
- 136.- Hassan J, Faighery C, Bresnihan B, Whelan A.
Elevated T cell receptor $\gamma\delta$ T cells in
patients with infectious mononucleosis. Br J
Hematol 1991;77:255-258
- 137.- Hohfeld R, Engel AG, Ii K, Harper MC.
Polymyositis mediated by T lymphocytes that
express the $\gamma\delta$ receptor. New Eng J Med
1991;324:877-881