

Efecto de la gammaglobulina humana intravenosa sobre el cultivo mixto de linfocitos

Calixto Herrera, Luis Fernando García

Se estudió el efecto de la gammaglobulina humana intravenosa (GGHIV) (Sandoglobulin) sobre la reacción alógena *in vitro* mediante el cultivo mixto de linfocitos (CML) en individuos normales. La GGHIV en concentraciones superiores a 0.5 mg/ml inhibió en 61% y 99% la respuesta proliferativa. Se descartó que la inhibición fuese debida a factores citotóxicos presentes en la GGHIV comercial y/o déficit nutricional en los medios de cultivo. La incubación de los CML con 4 mg/ml de GGHIV durante 4 h/37°C produjo un 74% de inhibición. Se observó un efecto más acentuado al preincubar las células estimuladoras. La adición de GGHIV al CML, ocasionó una inhibición dependiente del tiempo de adición, mayor entre las 0 horas (h) (90%) y las 48 h (40%). El fenómeno inhibitorio no fue específico sobre la reacción alógena puesto que también se encontró sobre la respuesta proliferativa a concavalina A (Con A) (63%), fitohematoglutina A (PHA) (62%) y derivado proteico purificado (PPD) (84%). La inhibición sobre el CML, se revirtió parcialmente con la adición de 100 U de IL-2 rH en las primeras 24 h. La GGHIV redujo en un 79% la expresión del receptor de IL-2 al quinto día del CML. Los resultados de cuantificación de IL-1 en los sobrenadantes de CML con y sin GGHIV no arrojaron datos concluyentes. Se discuten los posibles mecanismos de acción y

futuras utilidades de la GGHIV como inmunomoduladora en los trasplantes de tejidos.

INTRODUCCION

Desde el informe inicial de Imbach y cols(1) en el cual describen la mejoría de las equimosis y la trombocitopenia en un paciente tratado con gammaglobulina humana intravenosa (GGHIV), han aparecido numerosas publicaciones que destacan la utilidad de la GGHIV en el tratamiento de enfermedades de origen autoinmune tales como púrpura trombocitopénica idiopática (2, 3), hemocitopenias (4, 5), el síndrome de Kawasaki (6, 7), miastenia gravis (8,9) y enfermedad de Von Willebrand (10,11). Su efectividad ha sido tal que en algunas entidades ha desplazado terapias convencionales tales como agentes citotóxicos, glucocorticoides y aun procedimientos quirúrgicos (3,12).

Hasta ahora la GGHIV se ha utilizado en el campo de los trasplantes de tejidos con fines de inmunización pasiva, tratamiento y profilaxis antiinfecciosa; ha demostrado gran efectividad en el caso del trasplante de médula ósea (13, 14).

El cultivo mixto de linfocitos ha sido un modelo *in vitro* importante para el estudio de la alorreactividad y para la definición de las características genéticas y celulares que predominan en la reacción alógena como los antígenos clase II, los linfocitos T ayudadores y la interleuquina 2 (IL2) (15-17).

La correlación entre la respuesta proliferativa medida por la incorporación de timidina tritiada por las células del receptor frente a las células estimuladoras irradiadas del donante y la supervivencia del injerto, ha sido uno de los mejores indica-

Dr. Calixto Herrera Gómez: Médico Inmunólogo, Jefe de Laboratorio del Centro Inmunológico Colombiano; Dr. Luis Fernando García: Médico Inmunólogo, Jefe del Laboratorio Central de Investigaciones, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.

Solicitud de separatas al Dr. Herrera.

dores para la selección del donante adecuado (16-18).

Los grandes escollos a los cuales se enfrentan los trasplantes de tejidos, son la barrera genética y el control de la respuesta del sistema inmune. Las terapias con agentes citotóxicos e inmunosupresores, el advenimiento de la ciclosporina, los anticuerpos monoclonales como el anti-CD3, han contribuido al avance de los trasplantes (19, 20), pero el hecho de lesionar el sistema inmune para prolongar la supervivencia del injerto, somete a los pacientes a complicaciones infecciosas y hasta neoplásicas muchas veces letales. La hipótesis de que la GGHIV puede modular el rechazo alógeno, se fundamenta en la efectividad de ésta en procesos autoinmunes. Teóricamente si el rechazo alógeno es mediado en parte por los mismos sistemas efectores que en las enfermedades autoinmunes (21, 22), la GGHIV podría tener una acción inmunomoduladora sobre éste. Las preparaciones disponibles en el comercio se obtienen de una mezcla de plasma proveniente de por lo menos 5.000 donantes. El proceso de extracción de la fracción de las gammaglobulinas elimina los virus tales como hepatitis A y B, el HIV-I y el citomegalovirus (CMV), haciéndola un producto seguro desde ese punto de vista (23-25). Existen varias preparaciones en el mercado las cuales difieren en cuanto a los métodos de extracción y tratamiento químico que pueden alterar la estructura de las gammaglobulinas. (Sulfonación, reducción y alquilación, tratamiento con B-propiolactona, plasmina y pepsina) (23-26). Otros procedimientos mantienen intactas las moléculas e impiden la formación de agregados (cromatografía de intercambio iónico, tratamiento con polietilén glicol y pH de 4). La GGHIV utilizada en nuestros experimentos, (Sandoglobulin®) es IgG monomérica tratada a pH de 4 con Fc intacta. El 94% de la gammaglobulina es IgG monomérica, 2 a 4% son dímeros y menos de 1% es IgA. La composición en cuanto a subclases de IgG es muy similar a la del plasma, siendo aproximadamente 65% IgG1, 30% IgG2, 6% IgG3 y 2% IgG4 (2,4). Sus efectos moduladores de la respuesta inmune están mediados directa o indirectamente por la estructu-

ra funcional completa o sus fragmentos Fc, Fab y aun por sus productos de degradación (25-28).

Los mecanismos de acción más estudiados son los siguientes:

Bloqueo de los receptores Fc. La saturación de los receptores Fc tiene efectos reguladores y supresores sobre los linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, células NK y Polimorfonucleares (PMN) (29-31). Se conoce que este mecanismo frena la producción de autoanticuerpos por las células B, aumenta la vida media de células opsonizadas por anticuerpos y altera la afinidad y expresión de los receptores Fc (31-36). Estos efectos pleiotrópicos mediados por la fracción Fc y sus distintos tipos de receptores explican en parte su efecto inmunomodulador (37-39).

Anticuerpos antiidiotípicos. Se ha comprobado la existencia de anticuerpos antiidiotípicos de reacción cruzada (40-49); los más estudiados reaccionan contra el Factor VIII el DNA y el FR, (38, 44,47,50), se han encontrado algunos en los lotes de GGHIV (10,38). Estos actuarían bloqueando la unión del antígeno, inhibiendo así su efecto patogénico y contribuyendo a la depuración de estos autoanticuerpos. Se postula que el entrecruzamiento a nivel de las inmunoglobulinas de membrana de los linfocitos B productores de autoanticuerpos con el antiidiotipo de reacción cruzada, produce un bloqueo en la producción de éstos (47, 50, 55). A su vez la producción de antiidiotipos contra la GGHIV podría generarla producción de antiidiotipos contra el receptor T (56) (anticlonotípicos), los cuales podrían compartir idiotopes con las inmunoglobulinas de membrana de los linfocitos B, bloqueando la unión con el antígeno e impidiendo la activación de la respuesta inmune en ambos niveles (56,57).

Anticuerpos de reacción cruzada. Existen otros autoanticuerpos que reaccionan en forma cruzada contra diversos antígenos (ssDNA, FR, tiroglobulina, insulina, toxoide tetánico) y que son de baja afinidad. Estos son producidos por los linfocitos BCD5+ (57). Se tiene evidencia de la presencia de estos anticuerpos en los lotes de GGHIV (41), lo cual es factible, dado el gran volumen de donantes de plasma, ya que sus concentraciones

normalmente son muy bajas. Estos anticuerpos podrían actuar produciendo una depuración más rápida o la solubilización de diversos complejos inmunes formados, impidiendo la activación de linfocitos T y B predeterminados contra estos antígenos.

Supresión mediada por células. Existen linfocitos T supresores y ayudadores, isotipo e idiotipo específicos así como inespecíficos (28, 52, 55); éstos poseen receptores Fc para las inmunoglobulinas. En la década de los 70 se diferenciaron funcionalmente en supresores si poseían el receptor Fc gamma y ayudadores si tenían el Fc mu (58, 60).

Esta clasificación aunque no es exacta explica parte de los efectos reguladores producidos por la GGHIV al activar los circuitos T gamma supresores que disminuyen la actividad de los linfocitos T y la producción de autoanticuerpos.

Modulación de receptores. La célula normalmente endocita los receptores Fc de membrana ocupados por inmunoglobulinas (28,61,62). También lo hace cuando existe unión y/o entrecruzamiento de las inmunoglobulinas por antígeno o anticuerpos contra ellas (28, 29, 33, 37, 61, 62). Cuando se saturan los receptores Fc y el estímulo es continuo, la célula entra en un fenómeno de baja regulación "down regulation" tornándose inactiva. Este proceso mediado por la fracción Fc y su receptor (63) podría actuar sobre las células efectoras o presentadoras de antígeno, células pasajeras y endoteliales, inhibiendo la reacción alérgica. Se conoce que la infusión de GGHIV produce un bloqueo del sistema monocítico-fagocitario, disminuye la actividad NK, incrementa la relación CD4/CD8 e inhibe la blastogénesis inducida por mitógenos (34, 61, 64, 68). Por otra parte, puede ocurrir comodulación de receptores y/o antígenos así como de moléculas de asociación que impedirían el reconocimiento y activación de las células (37,61, 62).

Producción de linfoquinas. Existen informes demostrando que la infusión de GGHIV a dosis de 400 mg/kg/d produce una disminución *in vitro* de la producción de IL-1 e IL-2 (67, 69). Si este mecanismo operase *in vivo* sería factible explicar la

inmunosupresión tanto humoral como celular observada con la infusión de GGHIV (66, 67), y haría más factible su utilización en trasplantes, conociendo el papel de la IL-2 como piedra angular en el rechazo alogénico (70-71).

Estas evidencias indican que la GGHIV puede ser utilizada en un futuro como inmunomodulador en trasplantes, inhibiendo, por un lado, la reacción alérgica y la producción de anticuerpos citotóxicos e induciendo tolerancia, y por otro, confiriendo inmunidad humoral pasiva a los pacientes, lo que permitiría reducir la terapia inmunosupresora actual disminuyendo el riesgo en los pacientes sometidos a trasplante de órganos.

Basados en estos razonamientos, en el presente trabajo se escogió el cultivo mixto de linfocitos (CML) como modelo *in vitro* para someter a confirmación la hipótesis de que la GGHIV puede modular la reacción alérgica. Mediante un protocolo que buscó establecer la concentración efectiva, la cinética de su efecto, la acción sobre las células respondedoras y/o estimuladoras, el efecto sobre la viabilidad celular, la temperatura de la reacción, la producción de interleuquinas y receptores, se intentó dilucidar parte de las incógnitas con el propósito de contribuir al conocimiento de los mecanismos de acción que permitan en un futuro utilizarla GGHIV en la prevención, tratamiento e inmunomodulación de la reacción alérgica.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron sujetos jóvenes clínicamente sanos pertenecientes al personal de empleados y estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, la mayoría de ellos con HLA conocido. Estos fueron sangrados por venopunción bajo condiciones asépticas obteniéndose 10-20 ml de sangre, la cual se depositó en Erlenmeyers estériles de 50 ml con 15 perlas de vidrio, sometida a agitación suave y continua durante 10 min para desfibrinar la sangre. Posteriormente, bajo condiciones estériles, ésta se diluyó en igual volumen de una solución tampón salina de fosfatos (PBS) 0.15 M, pH 7.2 a 4° C y luego se procedió a realizar la separación de células mononucleares mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque

en proporción 3:1 (v/v) (Ficoll: Sigma, Hypaque Sódico, Wintrob, densidad 1.077), centrifugándose 800g/15 min. Se aspiró la capa de mononucleares de la interfase depositándola en tubos de vidrio de 16x100 y se lavó dos veces con 10 ml de PBS a 4°C a 800 g/10 min, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 1-2 ml de RPMI-1640 (Gibco) con 25 mM de Hepes, 24 mM de Bicarbonato de Sodio, 10% de una mezcla de sueros humanos (MSH), inactivados a 56°C/30 min, penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 ug/ml) y anfotericina (0.5 ug/ml). A este medio se le denominó Medio Completo (MC) y al RPMI-1640, Medio (M).

Para el conteo de células se utilizó hemocitómetro; la viabilidad se determinó por exclusión con azul de tripano (Aldrich) al 0.2%; ésta siempre fue mayor de 90%. La concentración se ajustó de acuerdo a las condiciones experimentales.

En este trabajo se utilizó GGHIV (Sandoglobulin, Laboratorios Sandoz, Basilea, Suiza). Como características especiales el 99% de esta gamaglobulina es IgG monomérica intacta, tratada a pH con trazas de pepsina y obtenida de una mezcla de 5.000 donantes, en presentación de 1.3 y 6 g/vial. Contiene sucrosa como estabilizador. Se utilizaron los lotes: 8.361.2480, 7.362.2290 los cuales se disolvieron con M a concentraciones de 10, 40 y 80 mg/ml de GGHIV, dispensándose en viales de congelación de 2 ml que se mantuvieron a 70°C hasta su utilización.

Microcitotoxicidad

Con el objeto de descartar linfocitotoxicidad en los diferentes lotes se procedió a estudiar su efecto sobre la viabilidad celular. Se tomaron 0.5 ml de las células mononucleares aisladas previamente y se colocaron en pitillos de plástico que contenían nylon (Leukopac) para separar por adherencia los linfocitos T y B (72). Las columnas se incubaron a 37°C/30 min, después se lavaron con medio suplementado con 5% de SBF a 37°C (5ml) y se centrifugaron a 800 g/10 min obteniendo los linfocitos T. Para extraer los linfocitos B, adherentes al nylon, se lavó la columna utilizando M a 4°C, ejerciendo una presión firme hacia abajo. Las

células se recuperaron como en el paso anterior y la concentración se ajustó a 3×10^6 cel/ml. Para efectuar la reacción de microcitotoxicidad (73) se utilizaron microplatos de Terasaki que contenían 5 µl de aceite cristal/pozo, colocando 1 µl/pozo de GGHIV o MSH y 1 µl/pozo de la suspensión de células. Los microplatos se incubaron a 4, 20 y 37°C/30 min para linfocitos T y 60 min para linfocitos B, agregando posteriormente 5 µl/pozo de complemento de conejo. Se incubaron de nuevo por 60 y 120 min para linfocitos T y B respectivamente. Se adicionaron después 5 µl/pozo de una solución al 1% de azul de tripano en dilución 1:2 con tampón barbital EDTA pH 7.4, incubando durante 10 min a temperatura ambiente. El exceso de colorante se descartó por inversión, agregando finalmente 5 µl tampón barbital EDTA. La lectura se efectuó en un microscopio invertido (Zeitz) contabilizándose el porcentaje de células muertas de acuerdo a la siguiente escala:

0	Y < 10%	células muertas	= 1
> 10%	Y < 20%	células muertas	= 2
> 20%	Y < 40%	células muertas	= 3
> 40%	Y < 80%	células muertas	= 6
> 80%		células muertas	= 8

Se consideraron positivas las reacciones con valores iguales a 4 o mayores.

Con el mismo fin se procedió a cultivar células mononucleares en MC más GGHIV a 2 y 4 mg/ml, a una concentración de 2×10^5 cel/pozo en platos de 96 pozos de fondo en U (Nunclon), incubando a 37°C/5% CO₂ y ambiente húmedo (CGA-Precisión). El número y viabilidad se determinó cada 24 h.

Análisis de la mezcla de sueros humanos y medios de cultivo

A la mezcla de sueros humanos (MSH) se le realizó electroforesis en papel y desintometría para cuantificar proteínas y gammaglobulinas. Mediante nefelometría (Hyland-Nephelometer) se determinó la concentración de IgG, IgA, e IgM. También se realizaron mediciones de osmolari-

dad (Osmometre-Precision) a los diferentes medios de cultivo utilizados para los experimentos con GGHIV.

Cultivo mixto de linfocitos

Una vez obtenidas las células mononucleares se procedió a realizar diferentes tipos de cultivos mixtos de linfocitos en una y dos vías. Se realizaron variaciones en la concentración de GGHIV y en la MSH; en diferentes tiempos y temperaturas preincubación de las células estimuladoras y/o respondedoras adición de IL2 recombinante humana (IL - 2rH. Cetus Corp.) de GGHIV y lavado de esta última a diferentes tiempos durante el CML.

Siempre se utilizaron las células respondedoras a una concentración de 1×10^6 cel/ml y las estimuladoras irradiadas con 2.500 rads (Gammatron-Siemens) a 5×10^5 cel/ml. Se sembraron 100 μ l de cada una en platos de cultivo estériles de 96 pozos (Nunclon) fondo en U con M C en el cual se varió la concentración de la MSH, según los experimentos. Una vez mezcladas las células se incubaron los microplatos a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ y ambiente húmedo (CGA-Precisión), durante 5 días, realizando un pulso final de 8 h con 0.5 μCi /pozo de ^3H TdR (Amersham, actividad específica 17.8 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$) en 50 μ l de medio. Después se recuperaron las células pulsadas en un colector (PhD-Cambridge) con filtros de fibra de vidrio (Cambridge), los cuales se depositaron en viales de centelleo (Omnivials-Eaton) dejándolos secar para finalmente agregarles 2 ml de solución de centelleo y determinar la radioactividad en un contador de centelleo líquido (LKB-Wallac, Modelo 1211).

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado realizando un control autólogo (A x Ax), una reacción alogénica (A x Bx) y un control de mezcla de células de 3 ó 4 personas no relacionadas (A x Px). Con los resultados en cuentas por minuto se calculó la media y desviación estándar, obteniéndose el Índice mitótico (IM), el porcentaje de inhibición (PI) y el porcentaje de respuesta relativa (%RR).

$$\text{IM} = \frac{\text{CPM alogénica}}{\text{CPM autóloga}}$$

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{CPM Experimental}}{\text{CPM Control}} \times 100$$

$$\% \text{RR} = \frac{(\text{CPM alogénica}) - (\text{CPM autóloga})}{(\text{CPM mezcla cels} - (\text{CPM autóloga}))} \times 100$$

Inmunofluorescencia Indirecta para la detección del receptor de IL-2

Se utilizó un anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón (Anti-Tac TU 69, Biotest) contra el receptor humano de IL-2 y un anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína (Sigma). Como control positivo se utilizaron células del individuo respondedor estimuladas durante 72 h con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PHA (Difco) en medio completo. Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/ml. Se tomaron 200 (μ l en un tubo Fisher y se centrifugaron a 400 g/5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 μ l de anti-Tac en dilución 1:10 dejando incubar por 30 min/ 4°C . Posteriormente se lavó tres veces con 200 μ l de PBS suplementado con 2% de SBF y 0.01% Azida de Sodio (Merck) a 400 g/ 4°C /4 min. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 μ l del anti-IgG conjugado con fluoresceína, incubando durante 30 min/ 4°C . Posteriormente se lavó tres veces como en el paso anterior, resuspendiendo las células en 100 μ l de PBS con formaldeído al 10% y se procedió a depositar 50 μ l de la suspensión en un portaobjeto, para leer la reacción en un microscopio de epifluorescencia (Leitz). Se contaron un total de 100 células y se determinó el porcentaje de fluorescentes.

Proliferación con antígenos y mitógenos

Se utilizaron PHA (Difco) a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Con -A (Sigma) a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y PPD a 4 mg/ml. Este último, obtenido y procesado en nuestro laboratorio del medio de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, precipitado con sulfato de amonio dializado contra PBS y filtrado por 0.2 μ y cuyas proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (74). Las células se sembraron en microplatos de cultivo (Nunclon), fondo en U a una concentración de 1×10^5 cel/pozo en un volumen final

de 200 µl/pozo, incubándolas durante 72 h a 37°C/5% CO₂ y ambiente húmedo (CGA-Precision). Finalmente se pulsaron con 0.5 µCi/pozo de 3HTdR (Amersham) en 50 µl de M. Se efectuó un control negativo con células en M C.

Cuantificación de interleuquina 1β

Se utilizó un ensayo inmunoenzimático para cuantificar la IL-1β en los sobrenadantes de los CML (Interleukin 1β ELISA. Cistron, Biotechnology, N.J, EE.UU). Los pozos estaban precubiertos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL 1β. Se depositaron 100 µl de sobrenadantes de CML realizados en presencia de GGHIV a 2 y 4 mg/ml y recolectados en diferentes tiempos con su respectivo control. Las muestras se incubaron a 37°C/1 h y se lavaron tres veces con 300 U1 de PBS más 0.1% de Tritón x-100 y 0.02% de Tio-merosal. Luego se agregaron 100 µ3 de un anticuerpo de conejo anti-IL 1β incubando 1 h/37°C, se lavaron como en el paso anterior y se agregaron 100 µl de un antisuero de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano. Nuevamente se incubaron por 30 min a temperatura ambiente para luego lavar tres veces y adicionar 100 µl de una solución con D-fenilén-diamina (DPD) y peróxido de hidrógeno, dejando incubar 15 min a temperatura ambiente, al cabo de los cuales, se paralizó la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 4N. La intensidad de la reacción colorimétrica se leyó en un microlector de ELISA (Minireader 11), Dynatgch Laboratories, EE.UU.) con un nitro de 490 nm. Se construyó una curva patrón con estándares entre 20 y 1000 pg de IL1β y blancos con medio completo con o sin GGHIV. La cantidad de IL 1β se determinó mediante interpolación con los valores netos de DO: 490 nm de la curva estándar. Estos se dieron en pg/ml de IL 1B.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa de computador Statgraphics, el cual se corrió en un Clon XT, IBM compatible. Se efectuaron los tests de ANOVA en una y dos vías, t-student, análisis de correlación. Los gráficos se construyeron utilizando el programa HG.

RESULTADOS

Para iniciar los experimentos con GGHIV (Sandoglobulin) se partió de los resultados de la electroforesis en papel y la nefelometría realizada a la MSH para cuantificar el contenido de proteínas e inmunoglobulinas, cuyos resultados fueron los siguientes:

Proteínas totales:	8.0	g/dl
Albúmina:	4.0	g/dl
Alfa 1:	0.43	g/dl
Alfa 2:	1.01	g/dl
Betaglobulinas:	1.19	g/dl
Gammaglobulinas:	1.38	g/dl
IgG:	1.01	g/dl
IgA:	0.170	g/dl
IgM:	0.042	g/dl

La osmolaridad de los medios con 10% de GGHIV (8 mg/ml), 5% GGHIV (4 mg/ml), 10% MSH, 5% MSH y 5% GGHIV + 5% MSH se encontró dentro de un rango de 300 a 310 mosmoles/l.

Efecto de la GGHIV a diferentes concentraciones sobre el CML manteniendo constante la concentración de la MSH

Con base en los resultados de la electroforesis de proteínas se procedió a realizar el siguiente análisis: el medio de cultivo suplementado con 10% de MSH contiene 1 mg/ml de IgG aproximadamente; entonces en los 200 µl/pozo habrá 200 µg/pozo de IgG. Partiendo de estos datos, se agregó GGHIV para observar y analizar sus efectos sobre el CML.

Se realizaron CML agregando GGHIV en el medio de cultivo con 10% de MSH en diluciones dobles desde 50 µg/ml hasta 3.125 µg/ml (Tabla 1). El porcentaje de respuesta relativa (RR) del control fue de 30%. No se encontró una diferencia significativa que mostrara un efecto de la GGHIV sobre el CML, variando los porcentajes RR entre 24 y 32%. Posteriormente se realizaron otros experimentos en los que sólo se efectuó la reacción alogénica (A z Bx), agregando GGHIV en diluciones quintuplas a partir de una concentración de 5 mg/ml (cinco veces la concentración de IgG del MC con 10% MSH) hasta 0.04 mg/ml (Figura 1).

Tabla 1. Efecto de la GGHIV sobre el CML.

GGHIV*	AxAx	AxBx	AxPx	%RR
0	**702 (151)	7844 (1198)	24541 (4394)	30
3.13	1172 (197)	8604 (1238)	24174 (4562)	32
6.25	724 (162)	5847 (839)	22267 (4286)	24
12.5	864 (217)	6751 (830)	21586 (4194)	28
25	306 (36)	6693 (805)	22127 (4324)	29
50	503 (97)	7106 (873)	21319 (4379)	32

* µg/ml.
** cpm (error/estándar) 5 exptos por triplicado.

Se observó una disminución en las cpm dependiente de la concentración de GGHIV, siendo el efecto más notorio a partir de 1 mg/ml. Con 5 mg/ml las cpm disminuyeron en promedio de 25.447 a 4.473 alcanzando los porcentajes de inhibición (PI) valores entre 73 y 90% ($p < 0.0001$). Dosis inferiores a 1 mg/ml arrojaron resultados variables sin mostrar efecto inhibitorio.

Efecto del reemplazo de las proteínas de la MSH por GGHIV

Como ya se indicó, la electroforesis de la MSH mostró una concentración de 8g/dl de proteínas totales, por lo tanto, el medio al 10% de MSH con-

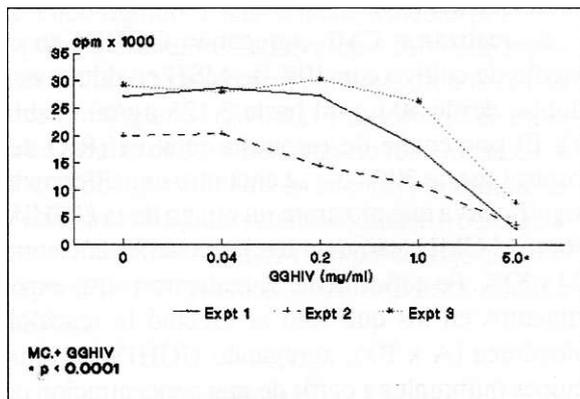


Figura 1. Efecto de la GGHIV sobre la reacción alogénica.

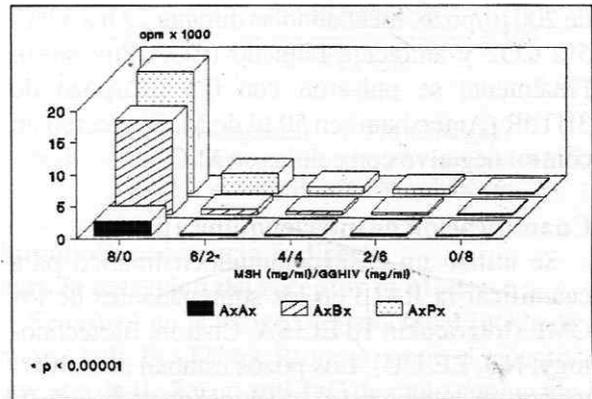


Figura 2. Efecto del reemplazo de las proteínas MSH por GGHIV sobre el CML.

tiene 8 mg/ml de proteínas. Se procedió a efectuar experimentos en los cuales se reemplazó progresivamente la concentración de proteínas por GGHIV a partir de 2mg/ml hasta 8 mg/ml o sea la concentración total de proteínas del medio de cultivo al 10% de MSH (Figura 2). Se observó un efecto inhibitorio global sobre el CML. Cuando se reemplazaron 2 mg/ml de proteínas por GGHIV se encontró una disminución en las cpm del control autólogo de 2.327 a 328 cpm en el cultivo con GGHIV, resultando un PI de 86% ($p < 0.0001$). En la reacción alogénica, el control fue de 14.727 cpm y el experimental de 863 cpm, lo cual arrojó un PI de 94% ($p < 0.0001$). Contra la mezcla de células el control fue de 18.985 cpm mientras que en el experimental fue de 3.054 cpm. Esto significa un PI de 84% ($p < 0.0001$). El %RR control fue de

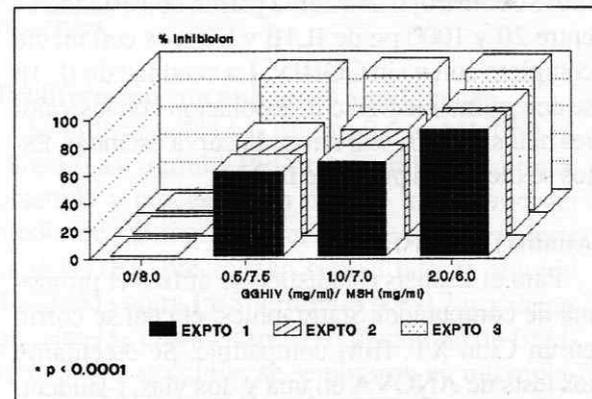


Figura 3. Efecto del reemplazo de las proteínas MSH por GGHIV sobre la reacción alogénica.

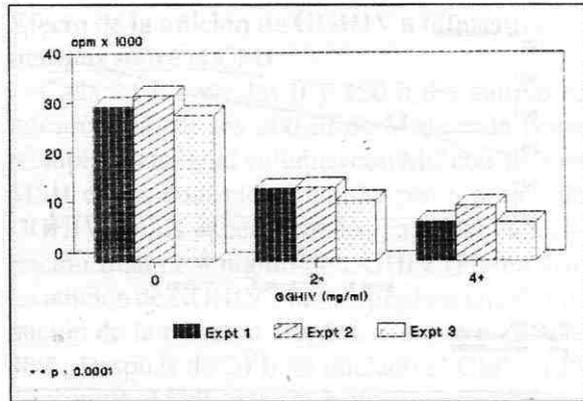


Figura 4. Efecto de la GGHIV sobre el CML en dos vías.

65% observándose una reducción al 20% con GGHIV.

Al reemplazar concentraciones mayores de proteínas por GGHIV los PI ascendieron hasta el 99% y el %RR disminuyó del 65% al 17% ($p < 0.0001$).

Cuando se sustituyeron concentraciones de proteínas inferiores a 2 mg/ml hasta 0.5 mg/ml (Figura 3), efectuando sólo la reacción alogénica, continuó observándose una inhibición significativa dependiente de dosis que alcanzó PI entre 61 y 95% con 0.5 mg/ml de GGHIV ($p < 0.0001$).

Efecto de la GGHIV sobre el CML en dos vías

Se realizaron CML en dos vías utilizando GGHIV a 4 y 2 mg/ml encontrándose PI promedio de 72% y 60% respectivamente ($p < 0.0001$) (Figura 4).

Efecto de la GGHIV sobre la viabilidad celular

La prueba de microcitotoxicidad de los lotes de GGHIV y de la MSH, empleando un panel de células, en algunos casos individuos reaccionantes en el CML, fue negativa contra linfocitos T y B a todas las temperaturas en seis experimentos diferentes. También se realizaron cultivos de células solas en presencia de GGHIV a 4 y 8 mg/ml (Figura 5). Cada 24 h hasta por cinco días se verificó la viabilidad de las células comparándola con controles de los mismos individuos en MC al 10% de MSH. Utilizando medio con 4 mg/ml de GGHIV

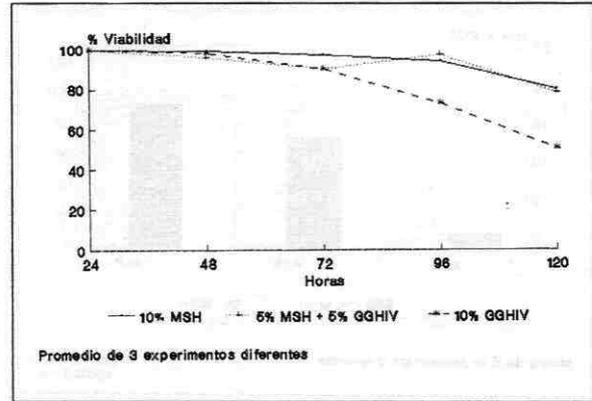


Figura 5. Efecto de la concentración de GGHIV sobre la viabilidad celular.

la viabilidad de las células a las 120 h fue del 78%, con un control de 80%. Al aumentar la concentración de GGHIV a 8 mg/ml sin MSH, la viabilidad disminuyó a partir de las 96 h al 73 y 50%.

Efecto de la sucrosa sobre el CML

Para descartar que la sucrosa utilizada como estabilizador en la presentación comercial de la GGHIV tuviese efectos inespecíficos sobre el CML (Figura 6), éstos se efectuaron adicionando sucrosa en diluciones dobles a partir de una concentración de 66.6 mg/ml hasta 8.5 mg/ml, equivalente a la que se encontraba en la GGHIV utilizada. Los controles se realizaron con MC 10% MSH; en los cultivos con sucrosa la concentración fue de 5% MSH. No se encontró efecto inhibitorio por parte de la sucrosa sobre la reacción alogénica en los dos experimentos realizados.

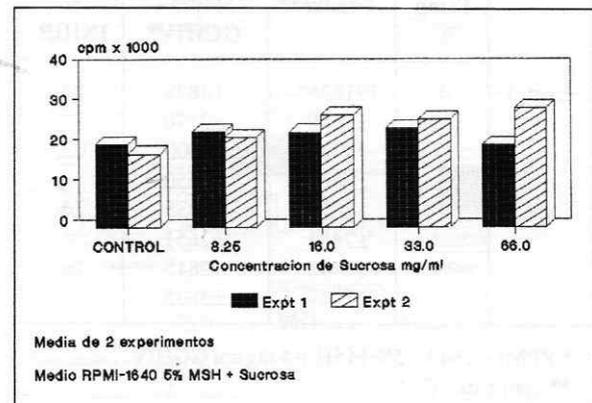


Figura 6. Efecto de la sucrosa sobre la reacción alogénica.

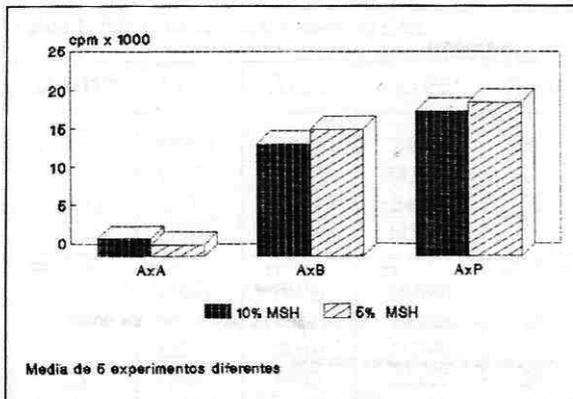


Figura 7. Efecto de la concentración de MSH sobre el CML.

Efecto de la disminución de la MSH sobre el CML

Con el fin de descartar un posible déficit nutricional al reemplazar en un 50% las proteínas de la MSH por GGHIV, se realizaron CML en medio al 10% y 5% de MSH (Figura 7). Se encontró un aumento en el %RR de 74% con 10% MSH a 81% con el medio al 5% MSH. Solamente en la respuesta autóloga se observó una ligera disminución respecto al control con 10% de MSH. En la reacción alogénica y contra la mezcla de células se encontró un incremento en las cpm de 14.727 a 16.552 y de 18.984 a 20.147 respectivamente. No se observó efecto de privación de nutrientes al reducir la concentración de la MSH.

Tabla 2. Temperatura y preincubación con GGHIV.

	Temp °C	Medio	Medio + GGHIV*	% INHIB
Expt. 1	4	19152** ±2640	14822 ±2170	23
	37	17792 ±2509	13000 ±3550	27
Expt. 2	4	17018 ±2681	13435 ±2651	24
	37	17446 ±1949	12845 ±3835	26

* RPMI - 1640 + 5% MSH + 4 mg/ml GGHIV.
 ** cpm ± ds. °C.
 Preincubación 2 h.

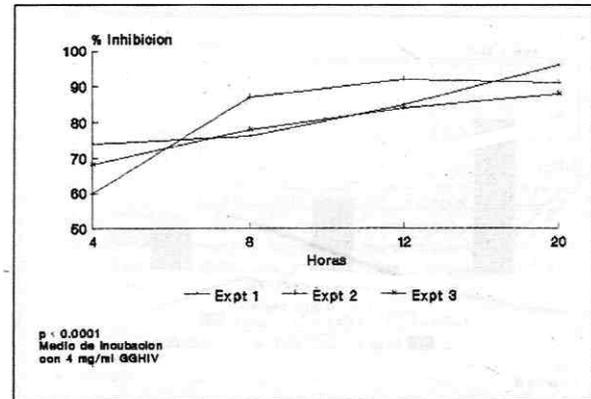


Figura 8. Efecto del tiempo de incubación con GGHIV sobre el porcentaje de inhibición.

Efecto de la preincubación del CML a diferentes tiempos y temperaturas en presencia de GGHIV

Se incubaron los CML en presencia de 4 mg/ml de GGHIV (AxBx) durante 2 a 4h y 37°C con su respectivo control en MC 10% MSH. Después se lavaron las células dos veces con medio y se re-suspendieron en MC 10% MSH hasta el día cinco (Tabla 2). La preincubación con esta dosis durante 2 h a 4°C produjo controles de 19.152 y 17.018 cpm y experimentales con GGHIV de 14.822 y 13.845 cpm respectivamente, es decir PI de 23% y 24%. La preincubación a 37°C produjo PI de 27 y 26%. No se encontró un efecto significativo de la preincubación por 2 h a estas dos temperaturas sobre la inhibición inducida por GGHIV.

Cinética de inhibición del CML mediada por la GGHIV

Se efectuaron CML (AxBx) con el mismo esquema anterior en presencia de 4 mg/ml de GGHIV pero a 37°C, lavando las células y controles dos veces con medio a las 4, 8, 12 y 20 h de iniciado el CML (Figura 8). Se encontró un PI promedio del 67% desde las 4 h el cual ascendió al 80% a las 8 h y hasta el 92% después de 20 h de incubación ($p < 0.0001$). Posteriormente se realizaron otros experimentos lavando los cultivos para remover la GGHIV cada 24 h hasta las 120 h (Figura 9). Los PI fueron muy similares a los obtenidos con 20 h de incubación, esto es entre 86 y 97% de inhibición ($p < 0.0001$).

Efecto de la adición de GGHIV a diferentes tiempos sobre el CML

Cada 24 h entre las 0 y 120 h del cultivo se retiraron 100 de los 200 pl de M de cada pozo, reemplazando igual volumen con MC con 10% de MSH en los controles y con M con 8 mg/ml de GGHIV en los experimentales para una concentración final de 4 mg/ml de GGHIV (Figura 10). La adición de GGHIV a las 0 h produjo una disminución de la reacción alógena en promedio del 90%. Después de 24 h de iniciado el CML el PI disminuyó al 60%, a las 48 h disminuyó a 37% y a las 72 h a 25% ($p < 0.0001$). La adición de GGHIV a las 96 y 120 h no produjo efectos significativos sobre el CML

Efecto de la preincubación de las células respondedoras y/o estimuladoras con GGHIV

Con el objeto de definir sobre cuál de las células ejerce la GGHIV su efecto inhibitorio, se realizaron experimentos preincubando las células respondedoras y/o estimuladoras separadamente durante 4 h en medio con 4 mg/ml de GGHIV. Los controles se preincubaron en MC. Posteriormente se lavaron las células dos veces y se sembraron en MC con 10% de MSH continuando el cultivo hasta el día cinco (Figura 11). Cuando se incubaron separadamente tanto las células respondedoras como las estimuladoras, los PI fueron de 32% en el experimento 1, 61% en el 2 y 60% en el 3. Al preincubar sólo las células estimuladoras se observó que en dos de los tres experimentos (excepto 1 y 2), la inhibición fue de la misma magnitud que cuando se preincubaron ambas células. (34% y 53%), mientras que en el experimento dos disminuyó del 61% al 35%. Al preincubar sólo las células respondedoras los PI fueron de -7, 37 y 22% respectivamente.

Efecto de la GGHIV sobre la proliferación inducida con mitógenos y antígenos

Para determinar si el efecto de la GGHIV era específico sobre la reacción alógena se realizaron una serie de experimentos utilizando células estimuladas con Con A, PHA y PPD en presencia de GGHIV a 4 mg/ml con sus respectivos contro-

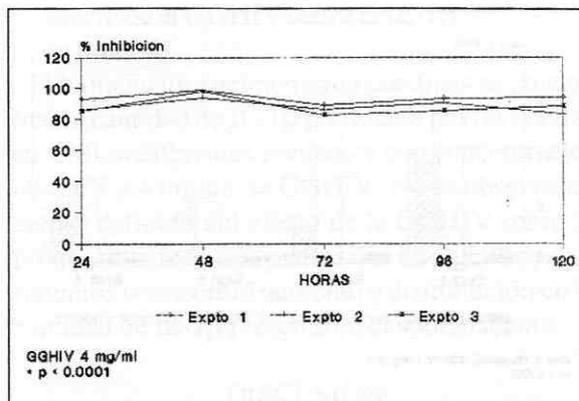


Figura 9. Efecto del tiempo de incubación con GGHIV sobre la reacción alógena.

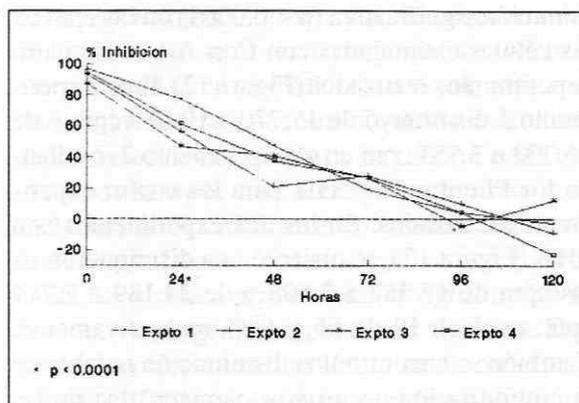


Figura 10. Efecto del tiempo de adicción de la GGHIV sobre el porcentaje de inhibición.

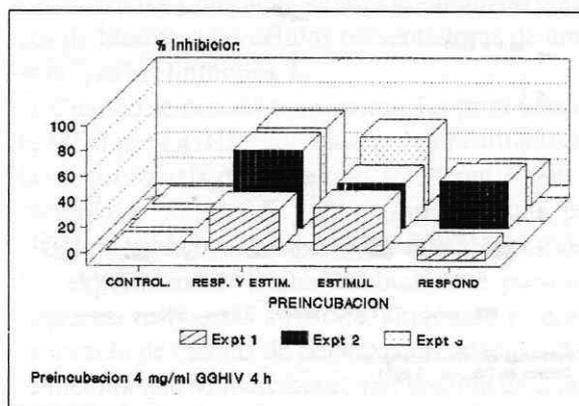


Figura 11. Efecto preincubación con GGHIV de las células respondedoras y/o estimuladoras.

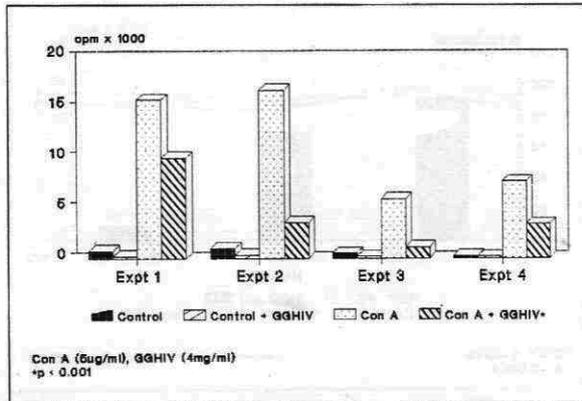


Figura 12. Efecto de la GGHIV sobre la proliferación inducida por CONA.

les. Se encontró que la GGHIV produjo una disminución significativa ($p < 0.0001$) en las cpm de las células estimuladas con Con A en los cuatro experimentos realizados (Figura 12). En el experimento 1 disminuyó de 15.770 a 10.019 cpm y de 16.702 a 3.555 cpm en el experimento 2, oscilando los PI entre 36 y 81% para los cuatro experimentos realizados. En los dos experimentos con PHA (Figura 13), se observó una disminución en las cpm de 17.357 a 7.608 y de 24.189 a 7.719 cpm, es decir PI de 56 y 68% respectivamente. También se encontró una disminución notable de la conformación en grumos característica de las células estimuladas con PHA así como de su apariencia distinta al microscopio. En el caso del PPD (Figura 14), se presentó una disminución de las

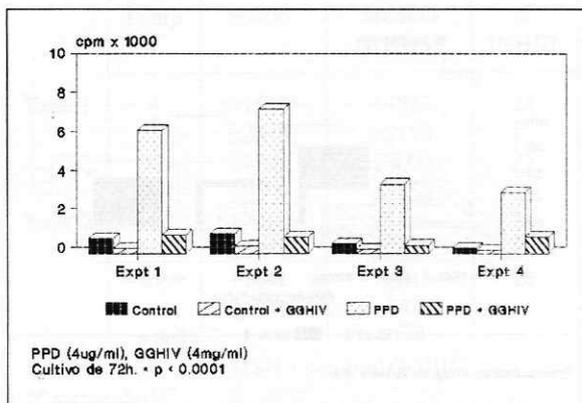


Figura 14. Efecto de la GGHIV sobre la proliferación inducida por PPD.

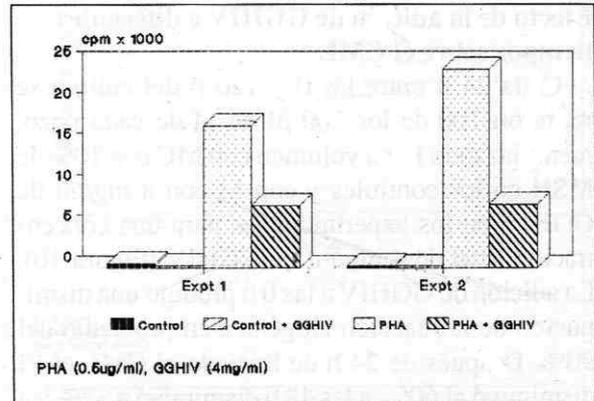


Figura 13. Efecto de la GGHIV sobre la proliferación inducida por PHA.

cpm en todos los casos, como en el experimento 1, en el cual bajó de 6.344 al 951 cpm. Esto produjo un PI promedio de 8% el cual se repitió en promedio para los tres experimentos restantes.

Efecto de la IL-2 rH sobre el CML en presencia de GGHIV

Estos experimentos se realizaron con el objeto de estudiar la capacidad de la IL-2 rH para revertir la inhibición inducida por la GGHIV (4mg/ml). Para ello se adicionaron 100 p/ml de IL-2 rH al CML cada 24 h hasta las 72 h (Figura 15). Se realizaron controles sin IL-2, con y sin GGHIV. En el experimento uno, al agregar la IL-2 desde las 0 h se incrementaron las cpm de 9.254 a 19.256 con un control de 28.628 cpm, es decir, se redujo el PI

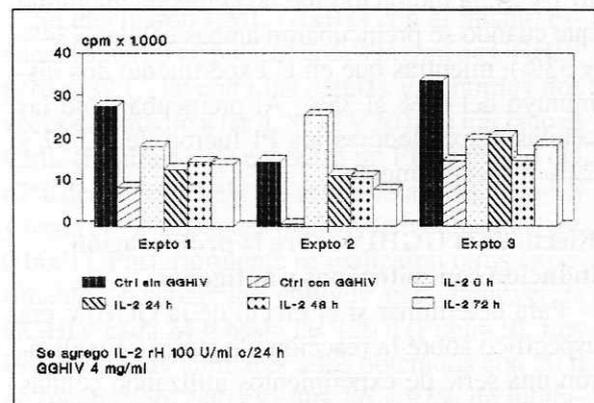


Figura 15. Efecto de la IL-2 sobre la proliferación inducida por la GGHIV.

de 68% a 32%. La adición de IL-2 rH a las 24, 48 y 72 h produjo valores promedio en cpm de 14.704 manteniéndose los PI en 48%. En el experimento dos la adición de IL-2rH desde las 0 h logró revertir completamente la inhibición inducida por la GGHIV de 642 a 26.582 cpm, por encima del control que fue de 15.574 cpm. Al adicionarla a las 24 h la reversión fue menor, pues se encontraron 12.374 cpm, a las 48 h, 11.899 y a las 72 h, 8.858 cpm. Los PI fueron de 20, 23 y 43% respectivamente. En el experimento tres la adición de IL-2 rH desde las 0 h sólo elevó las cpm de 15.639 a 20.763 y el PI disminuyó de 55 a 40%. En promedio los valores en cpm a las 24, 48 y 72 h se mantuvieron en 18.867 y los PI en 45% frente a un control de 15.639 cpm y un PI de 55%.

Efecto de la GGHIV sobre la expresión del receptor de IL-2

Se realizaron CML en presencia de 4 mg/ml de GGHIV y controles de los mismos individuos reaccionantes en MC con 10% de MSH. Se efectuó el estudio de inmunofluorescencia indirecta para comparar la presencia del receptor de IL-2 entre las células de CML con GGHIV y sus respectivos controles (Tabla 3) a las 72 y 120 h de iniciarse la reacción como control positivo se utilizaron células estimuladas durante 72 h con PHA (0.5 µg/ml) del individuo respondedor. A las 72 h el 81% de los blastos PHA, el 13% de las células del CML control y 11 % del CML con GGHIV, fueron positivos para el anti-Tac. A las 120 h el 14% de los controles fueron positivos. Se observó en estos últimos la presencia de células blásticas negativas para el anti-Tac mientras que en los controles todos los blastos eran positivos.

Tabla 3. Efecto de la GGHIV sobre el IL-2R.

	CML 72 h	PHA 120 h	72 h
Control GGHIV	13+ 11	14 3	81 -
* Porcentaje de células IL-2R* PHA (0.5µg/ml), GGHIV (4 mg/ml)			

Efecto de la GGHIV sobre la IL-1 β en los CML

Mediante un enzimo inmunoanálisis se cuantificó la cantidad de IL-1 β producida por las células en CML a diferentes tiempos y con concentraciones de 2 y 4 mg/ml de GGHIV. No se observó un patrón definido del efecto de la GGHIV sobre la producción de IL-1 β, puesto que en algunos experimentos se encontró aumento o disminución en la cantidad de IL-1β presente en el sobrenadante.

DISCUSION

En los experimentos iniciales se buscó establecer la concentración efectiva mínima capaz de modular la reacción alogénica. Para ello se realizaron CML agregando GGHIV en concentraciones bajas, manteniendo constante la concentración de la MSH. No se observó ningún efecto sobre la alorreactividad en el CML. Cuando se utilizaron dosis mayores, se encontró un efecto inhibitorio dependiente de dosis a partir de 1mg/ml o sea que al menos *kp'xktq*. si se eleva la concentración de IgG entre dos y cinco veces la concentración normal (1mg/ml) en el medio de cultivo con 10% de MSH, se produce una inhibición significativa de la reacción alogénica dependiente de dosis. Esto demuestra que existe un limite en la concentración de GGHIV para ejercer este efecto biológico, medible por la incorporación de 3HTdR. De acuerdo con los mecanismos de acción postulados (24, 28), las dosis bajas no alcanzarían a saturar los receptores, modular las moléculas de superficie involucradas y producir señales regulatorias capaces de bloquear las células presentadoras de antígeno y/o los linfocitos T.

Cuando se procedió a sustituir las proteínas de la MSH por GGHIV con base en los resultados de la electroforesis de proteínas, se encontró que al reemplazar entre 0.5 y 2 mg/ml de éstas por GGHIV había una inhibición sistémica en todos los experimentos. Dicha inhibición se presentó sobre las respuestas autóloga, alogénica y contra la mezcla de células de personas no relacionadas. A medida que se incrementó por encima de 2 mg/ml el reemplazo de proteínas por GGHIV, la inhibición fue casi total (90 a 99%).

Se quiso establecer si en el caso del CML en dos vías el efecto inhibitorio prevalecía, dado el hecho de que ninguna de las células estaba irradiada y la respuesta proliferativa sería máxima. Se observó una inhibición similar (60 y 70%), frente a las cpm del control sin GGIV.

Ante la magnitud del efecto supresor producido por la GGIV sobre la reacción alogénica, se procedió a descartar que fuese debida a un fenómeno tóxico de ésta sobre las células. Los resultados de las pruebas en microcitotoxicidad fueron siempre negativos para los lotes de GGIV utilizados descartando la presencia de citotoxinas. Se analizó también la viabilidad de las células en cultivo con GGIV utilizando las dosis máximas empleadas en los ensayos. No se encontró una disminución de la viabilidad celular en presencia de GGIV. Sólo cuando se reemplazaron todas las proteínas por GGIV, la viabilidad a las 120 h disminuyó a 50%. La sucrosa utilizada como estabilizador en la presentación comercial de la GGIV demostró no tener efecto inhibitorio sobre el CML aun en concentraciones mucho mayores que las utilizadas en los ensayos. Por otra parte, se realizaron experimentos para determinar si la reducción al 5% de la MSH en los CML alteraba la viabilidad, sin encontrar inhibición alguna; se encontró, por el contrario, un ligero incremento del 6 al 12% en las cpm de los CML realizados con 5% de MSH.

Otros factores como la osmolaridad y el pH de los medios con GGIV a diferentes concentraciones (4 y 8 mg/ml de GGIV + 4 mg/ml de MSH) se encontraron dentro de los límites fisiológicos. Todas estas evidencias experimentales demuestran que la supresión encontrada al agregar GGIV al CML, es debida a una modulación biológica de las funciones celulares y no a una alteración tóxica de la célula o a una privación nutricional que comprometa la viabilidad celular.

La preincubación con GGIV de los CML durante 2 a 4 h a 37°C produjo PI de 23 y 26% respectivamente. Estos resultados inducen a pensar que el fenómeno inhibitorio es temprano y que la temperatura a la cual se realice la unión de la GGIV con las células en el CML no es decisiva,

lo cual presupone que si la reacción se da a 4°C los procesos metabólicos no juegan un papel determinante, al menos en ese período. Esto sugiere una interacción tipo ligando-receptor de considerable afinidad, siendo la fracción Fc y su receptor (RFc), (27, 28) los componentes más opcionados a reaccionar bajo estas condiciones. Las células implicadas directamente en la respuesta alogénica (Linfocitos T, Linfocitos B, macrófagos, células NK, células dendríticas reticulares), poseen receptores para la fracción Fc (21, 22). Se conoce que la unión de esta fracción a su receptor ejerce actividades inmunomoduladoras sobre las células (27-33, 35-37) y podría ser clave en la supresión observada de la respuesta alogénica. Para comprobar esta hipótesis se tendrían que realizar CML agregando sólo la fracción Fc o F(Ab)₂ de las inmunoglobulinas y constatar si la inhibición es Fab, Fc dependiente o si requiere de la molécula intacta.

Cuando se realizaron otros experimentos incubando los CML durante tiempos variables con GGIV se observó un efecto inhibitorio dependiente del tiempo de incubación, llegando a un punto máximo que se sostuvo a partir de las 20 h. Es de resaltar que el efecto se mantuvo a pesar de retirar la GGIV del medio y que con sólo 4h de incubación los PI llegaron al 67% y con 20h al 99%. Cuando se agregó la GGIV cada 24 h después de iniciado el CML se observó que la inhibición disminuía en relación con el tiempo y que después de 72 h no se producía efecto inhibitorio. Estos resultados confirman la sospecha inicial de que la acción se produce en un estadio temprano y es factible suponer que sea en la fase del reconocimiento alogénico o de la activación celular. Los mecanismos iniciales podrían comprometer la comodulación de receptores y/o antígenos de histocompatibilidad, moléculas de asociación en los linfocitos T, B, macrófagos, o células dendríticas reticulares. La mejor forma de comprobar esto sería efectuando experimentos de doble marcaje con fluorocromos, uno para la GGIV y otro para el anticuerpo antimolécula o receptor, cuya comodulación se quiere investigar.

Otro mecanismo sería la alteración en la pro-

ducción de interleuquinas y/o sus receptores, traduciéndose en última instancia, sea cual fuere la acción inicial, en una disminución notable de la respuesta proliferativa.

La preincubación de las células estimuladoras o respondedoras separadamente con GGHIV reveló una inhibición mayor, aunque no concluyente, al preincubar solo las células estimuladoras. Este dato sugiere que la población sobre la cual la GGHIV ejercería un mayor efecto sería la de células estimuladoras. En el CML los linfocitos B, macrófagos y células dendríticas reticulares, actúan como células estimuladoras. Estas podrían fallar en la producción o expresión de señales como la IL-1, los antígenos de histocompatibilidad clase I y II o en establecer uniones para el reconocimiento estrecho entre los linfocitos T y las células estimuladoras debido a la modulación de moléculas de asociación (ICAM-1, ICAM-2, LFA-3) (61,62, 75-80).

Por otra parte, las células estimuladoras preincubadas con GGHIV podrían producir PGE₂, la cual es un reconocido inmunosupresor (81, 82), que además disminuye la expresión de los antígenos clase II (81-83), contribuyendo a la falta de estímulo alogénico. Habría que realizar experimentos en los que se utilice indometacina para inhibir su posible producción y comprobar esta hipótesis.

Recientemente se han encontrado inhibidores biológicos de la IL-1 (84), algunos producidos por los macrófagos cultivados con complejos inmunes o IgG, uno de los cuales bloquea la unión de la IL-1 a su receptor. Es posible que la GGHIV induzca su producción y de esta manera podría inhibir la señal inicial dada por la IL-1 sobre las células respondedoras (84-87).

El efecto de la GGHIV no es específico sobre la reacción alogénica; se encontró que inhibe la respuesta proliferativa inducida por mitógenos como la Con A y PHA, así como a un antígeno soluble, el PPD. Esto indica que el mecanismo inhibitorio actúa posiblemente a través de vías comunes de activación tales como la producción de interleuquinas y/o sus receptores en las células o induciendo la liberación de factores supresores

o bloqueadores como se analizó anteriormente y que en el caso de los mitógenos, no es debido a una modulación de los antígenos de histocompatibilidad. En los experimentos con PHA, la GGHIV redujo notablemente la formación de grumos característica de las células estimuladas con PHA; esta conformación se adopta por la producción de moléculas de adhesión que intervienen en procesos de reconocimiento asociativo entre las células (88,89); es posible que la GGHIV pudiese estar modulando negativamente su expresión. Es importante resaltar que las inmunoglobulinas provienen de un conjunto genético de origen ancestral llamado la superfamilia de las inmunoglobulinas (89), a la cual pertenecen una serie de proteínas como el receptor T, los antígenos de histocompatibilidad, CD2, CD3, CD4 y CD8 (90), las cuales intervienen en procesos de reconocimiento, transducción, asociación y activación celular. Los cambios a nivel de la membrana celular inducidos por la saturación y entrecruzamiento de los RFc, los productos de degradación de las inmunoglobulinas, podrían alterar la función de estas proteínas tan importantes. Si provienen de los mismos genes ancestrales, es posible que sean reguladas de tal manera que la GGHIV pudiera ejercer una acción moduladora. Esto contribuiría a explicar la inespecificidad del fenómeno. Siguiendo este orden de ideas, en los experimentos de adición de IL-2, se observó que sólo si se agregaba entre las 0 y las 24 h de iniciado el CML, se producía una reversión parcial del efecto inhibitorio. En un experimento, justamente en el que la GGHIV produjo mayor inhibición, se encontró una sobreestimulación, hecho para el cual no se tiene explicación.

Si el efecto se traduce en una falta de respuesta proliferativa ante diversos estímulos, es lógico pensar que la vía de activación por IL-2 esté afectada (66,67,70,71). En los experimentos con anti-Tac se evidenció que al menos a las 120 h las células del CML con GGHIV mostraron una franca disminución en la expresión del receptor para la IL-2 (IL2R). A las 72 h no se encontró diferencia en el porcentaje de células positivas para el Tac entre el CML con GGHIV y su control. Este hecho contrasta con los resultados de adición de IL-

2, la cual no logra revertir el efecto supresor cuando se agrega a las 72 h a pesar de que el IL-2R esté presente. Es factible considerar dentro de las posibles explicaciones de este hallazgo, el que se esté produciendo un fenómeno de inactivación de la señal atribuible a una alteración en la funcionalidad del receptor; los cambios en la fluidez de la membrana debidos al entrecruzamiento de los RFc (28-31) podrían inhibir la afinidad del IL-2R, así como la transducción de la señal de unión de su ligando, impidiendo que la IL-2 actúe. El encontrar células blásticas Tac negativas implica un posible catabolismo, internalización o liberación al medio de éste. También se observó que 81 % de las células estimuladas con PHA sin GGIV como control positivo expresaban el IL-2R; su morfología era francamente blástica y en agregados celulares era de difícil disrupción. Los ensayos para detectar cambios en la producción de IL-1B no arrojaron datos concluyentes; se encontró en algunos casos aumento o disminución no significativos.

Las investigaciones futuras en esta área se deben encaminar a reproducir y completar algunos de los experimentos anteriores y realizar otros, con el fin de dilucidar aún más los mecanismos básicos de inhibición de la respuesta proliferativa, como son la producción de IL-2 e IL-1, la regulación y expresión de sus receptores, la comprobación de que el efecto es F(ab)² o Fc dependiente, la comprobación de la comodulación de receptores, moléculas de asociación e integrinas. Posteriormente se podría iniciar una fase clínica en la que se utilizaría la GGIV como un inmunomodulador de la reacción alogénica. Existe suficiente experiencia acumulada en el mundo gracias a los tratamientos de las inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes como para utilizarla con seguridad (1- 11,23-26,91,92).

Tendría utilidad concreta en el caso de los trasplantes intrafamiliares y las transfusiones específicas, cuyo riesgo de sensibilización que es de 10 a 30% (93) es preocupante debido a las connotaciones futuras de sobrevida y espera de un trasplante cadavérico. La administración de GGIV pretrasplante, pretransfusión, perioperatoria y/o

para preincubación de las células a transfundir del donante, así como los ciclos de mantenimiento con las dosis convencionalmente utilizadas (400 mg/kg/d), las cuales producen concentraciones farmacológicamente activas que se correlacionan con los hallazgos *in vitro*, podrían favorecer la inducción de un estado de tolerancia. La IgG monomérica intacta produce tolerancia cuando se administra con antígenos (94, 95). Esto contribuiría a la generación y activación de células supresoras, anticuerpos anti-idiotípicos (54, 66, 68, 96), bloqueo del sistema monocítico fagocitario (31), disminución de la actividad NK (34) y otros posibles mecanismos que disminuirían la interacción de las células efectoras con las células presentadoras de antígeno o sus blancos. Por otra parte, como la GGIV modula la producción de anticuerpos (26, 28, 65), ejercería una regulación negativa sobre la producción de anticuerpos citotóxicos y autoanticuerpos, como en el caso de las citopenias autoinmunes (31). Probablemente, podría impedir la alo-sensibilización (97, 98), y aun, en el caso de estar instaurada, evitaría o disminuiría la acción de los sistemas efectores (22).

Los niveles de IgG regulan la producción de factores fijadores de IgG (IgG Bf) los que a su vez junto con los linfocitos T supresores isotipo-específicos regulan la producción de ésta (54, 55, 99). Tal mecanismo se encuentra mejor estudiado a nivel de la regulación de IgE (100). En este proceso intervienen linfocitos TH1 y TH2 (101), interferón gamma e interleuquinas como la IL-4 e IL-5 (101), orquestando un fino engranaje que se encuentra alterado en diversas entidades autoinmunes, neoplásicas e infecciosas en los que la hipergamaglobulinemia contribuye al estado de inmunosupresión (55, 101-103). Es posible que la GGIV dependiendo de la dosis, las subclases y los diferentes tipos de GGIV utilizados, contribuya a balancear este sistema.

Se sabe que los linfocitos B son muy eficaces en la presentación de antígenos (77) y que la saturación y entrecruzamiento de los receptores Fc, puede inhibirla síntesis de inmunoglobulinas (28-31). Este es otro posible mecanismo de acción que podría operar en los pacientes con auto o alo-anti-

cuerpos. La presencia de anti-idiotipos de reacción cruzada en la GGIV y de anti-idiotipos que inhiben la ADCC por anticuerpos contra antígenos clase I (M. Kazatehkine, comunicación personal), podrían favorecer a estos pacientes, como se ha demostrado en otras citopenias y enfermedades autoinmunes (31, 38,42).

Existen evidencias experimentales que demuestran *in vivo e in vitro* que la GGIV revierte los depósitos de complejos inmunes a nivel de riñón (104-106), con mejorías dramáticas de la función renal, en casos resistentes a corticosteroides y otros inmunosupresores. Esto despliega un nuevo campo en la investigación de la prevención de la falla renal terminal en las glomerulopatías.

Con base en los hallazgos *in vitro*, podría pensarse que la GGIV induciría un estado paradójico de inmunosupresión tal, que los pacientes podrían tener una mayor propensión a infecciones intra o extracelulares. La experiencia clínica es categórica demostrarlo contrario (1-14,23-26).

Debe considerarse que la GGIV no es, ni será, la solución mágica al problema, pero sí podría contribuir junto con otras terapias a mejorar la supervivencia del injerto y la calidad de sobrevida en los pacientes trasplantados; se constituiría en un arma bifuncional muy eficaz, ya que por un lado modularía el rechazo alógeno y por otro, conferiría inmunidad humoral pasiva, disminuyendo el riesgo de infecciones, las dosis de inmunosupresores y la alo sensibilización, mejorando así el pronóstico y la sobrevida de los pacientes trasplantados. Sin esta comprobación, el anterior trabajo pasaría a engrosar la lista de empolvadas publicaciones en las bibliotecas.

CONCLUSIONES

1) La GGIV utilizada en estos experimentos (Sandoglobulin: IgG monomérica intacta, tratada a pH 4) ejerció un potente efecto supresor sobre la reacción alógena. 2) Dicho efecto fue proporcional a la dosis empleada, alcanzando un nivel máximo con 2 mg/ml de GGIV. 3) Los resultados experimentales no fueron inducidos por un déficit nutricional en los medios, por efectos citotóxicos

de la GGIV o de la MSH. 4) El efecto inhibitorio no se vio modificado por la temperatura a la cual se realizó la incubación inicial del CML con la GGIV. 5) La inhibición fue proporcional al tiempo de incubación con GGIV, siendo máxima con 20 h de incubación. 6) No se necesitó la presencia continua de la GGIV en el medio de cultivo para que se diera el efecto inhibitorio, el cual resultó inversamente proporcional al tiempo de adición al CML. 7) La preincubación de las células estimuladoras parece inducir una mayor inhibición de la reacción alógena. 8) El fenómeno de inhibición no es específico sobre la reacción alógena; se observó también sobre la proliferación inducida por Con A, PHA y PPD. 9) Se revirtió parcialmente la inhibición al adicionar IL-2 rH entre las 0 y las 24 h de iniciado el CML. 10) La GGIV inhibió la expresión del receptor de IL-2 en las células del CML a las 120 h.

SUMMARY

The effect of Intravenous Human Gammaglobulin (IVHGG) on the allogenic reaction *in vitro*, by using Mixed Lymphocyte Culture (MLC), was studied among healthy individuals. The proliferative response was inhibited between 61 and 99% with IVHGG concentrations above 0.5 mg/ml. This inhibition was not due to cytotoxic factors present in the commercial product (IVHGG) and/ or to nutritional deficiency of the culture media. The inhibition was time dependent, greater between 0 h (90%) and 48 h (40%) and was not specific for the allogenic reaction as it was also found on the proliferative response to Con A (63%), PHA (62%) and PPD (84%). The above results are discussed as well as IVHGG possible usefulness as immunomodulator in tissue transplantation.

REFERENCIAS

1. Imbach P, Baramdum SD, Apuzzo V, et al. High dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1981; 1: 12281.
2. Imbach P, Barundun S, Baumgartner C. High dose intravenous gammaglobulin therapy of refractory purpura in particular idiopathic thrombocytopenia in childhood. *Helv Pedir Acta* 1981; 36: 81.
3. Warrier IA, Lusher JM. Intravenous gammaglobulin (Gamimune) for treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): A two year follow up. *Am J Hematol* 1986; 4: 323.
4. Pollack S, Cunningham C, Smithwick EM. High-dose intravenous

- gammaglobulin for autoimmune, neutropenia. *N Engl J Med* 1992; 307-253.
5. **Bussel J.** Therapy in cytopenia. *Vox Sang* 1986; 51: 69.
 6. **Leung DYM, Burns JC, Newburger JW, Geha RS.** Reversal of lymphocyte activation in vivo in the Kawasaki syndrome by intravenous gammaglobulin. *J Clin Invest* 1987; 79: 468.
 7. **Rowley AH, Shulman ST.** What is the status of intravenous gammaglobulin for Kawasaki syndrome in the United States and Canada *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 463.
 8. **Moghadam AF, Wick M, Besinger U, Geursen RG.** High-dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *Lancet* 1984; 4: 849.
 9. **Ippoliti G, Cosi V, Piccolo G, Lombardi M, Mantegaz R.** High-dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *Lancet* 1984; 10: 809.
 10. **Sultan Y, Maisonneuve P, Kazatchkine MD, Nydegger UE.** Anti-idiotypic suppression of autoantibodies to factor VIII (Antihemophilic Factor) by high-dose intravenous gammaglobulin. *Lancet* 1984; 10:765.
 11. **Macik BG, Gabriel DA, High K, Roberts H.** The use of high dose intravenous gamma-globulin in acquired Von Willebrand syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112:143.
 12. **Bussel JB, Schulman I, Hilgartner N W.** Intravenous use of gammaglobulin in the treatment of chronic immune thrombocytopenic purpura as a means to defer splenectomy. *J Pediatr* 1983; 103:653.
 13. **Tutschka PJ.** Diminishing morbidity and mortality of bone marrow transplantation *Vox Sang* 1986; 51: 87.
 14. **Sullivan KM.** Immunoglobulin therapy in bone marrow transplantation. *Am J Med* 1987; 83: 34.
 15. **Bach F, Sondel P.** Differential function of Major Histocompatibility Complex Antigens in T-Lymphocyte Activation. *Nature* 1976; 259: 273.
 16. **Harmon WE, Parkmann R, Gavin PT, et al.** Comparison of cell mediated lympholysis and Mixed Lymphocyte Culture in the immunological evaluation for renal transplantation. *J Immunol* 1982; 129:1573.
 17. **Colombe B, Garavoy MR.** Clinical histocompatibility testing. In: Milford EL, ed. Renal Transplantation. Churchill Livingstone. 1989; 21.
 18. **Dausset J.** The Major Histocompatibility Complex in man. *Science* 1981; 213: 1469.
 19. **Norman DJ.** The clinical role of OKT3. *Clin Immunol Allergy*. 9:95.
 20. **Halloran PH, Cockfield SM, Madrenas J.** The molecular immunology of transplantation and graft rejection. *Clin Immunol Allergy* 1989; 9:1.
 21. **Hayri P, Willebrand Von E, Phartenais E, et al.** The inflammatory mechanism of allograft rejection. *Immunol Rev* 1984; 77: 85.
 22. **Mason DW, Morris PJ.** Effector mechanisms in allograft rejection. *Ann Rev Immunol* 1986 4: 119.
 23. **Hassig A.** Conditions nécessaires pour l'obtention de préparations modernes d'immunoglobulines intraveineuses et pour leur utilisation clinique sans risque. *Triangle* 1987; 27: 169.
 24. **Schwartz RS.** Overview of the biochemistry and safety of a new native intravenous gammaglobulin, IVIG, pH 4.25. *Am J Med* 1987; 83: 46.
 25. **Morell A.** Various immunoglobulin preparations for intravenous use. *Vox Sang* 1986; 51: 44.
 26. **Colomb MG, Drouet C, Law DTS, Painter RH.** In: Morell A, Nydegger UE, eds. Structural and biological properties of three intravenous immunoglobulin preparations. *Academic Press* 1986; 27.
 27. **Anderson CL, Looney RJ.** Human leukocyte IgG Fc receptors. *Immunol Today* 1986; 7:264.
 28. **Daeron M, Fridman WH.** Fc receptors as regulatory molecules. *Ann Inst Pasteur/Immunol* 1985; 136(C): 383.
 29. **Morgan L, Weigle W.** Biological activities residing in the Fc region of immunoglobulin. *Adv Immunol* 1987; 40: 61.
 30. **Hogg N.** The structure and function of Fc receptors. *Immunol Today* 1988; 9: 185.
 31. **Davidson HR.** Mechanism of action intravenous immunoglobulin in immune mediated cytopenias. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1249.
 32. **Sinclair NR, Panoskaltzis A.** Immunoregulation by Fc signals. *Immunol Today* 1987; 8:76.
 33. **Kolsch E, Oberbarnscheidt J, Burner K, Heuer J.** The Fc receptor: its role in the transmission of differentiation signals. *Immunol Rev* 1980; 49:61.
 34. **Engelhard D, Waner JL, Kapoor N, Good RA.** Effect of intravenous immune globulin on Natural Killer Cell Activity: Possible association with autoimmune neutropenia and idiopathic thrombocytopenia. *J Pediatr* 1986; 108: 77-25.
 35. **Moretta L, Moretta A, Canónica GW, Bacigalupo A, Mingari MC, Cerottini JC.** Receptors for immunoglobulin on resting and activated human T cells. *Immunol Rev* 1981; 56: 141.
 36. **Wedgwood RJ, Ochs HD.** Immunologic disorders: The regulation of humoral immunity. *Vox Sang* 1986; 51: 14.
 37. **Sinclair NR, Panoskaltzis A.** The immunoregulatory apparatus and immunity. *Immunol Today* 1988; 9: 260.
 38. **Rossi F, Sultan I, Kazatchkine MD.** Spontaneous and therapeutic suppression of autoimmune response to factor VIII by anti-idiopathic antibodies. In: Morell, Nydegger, eds. Intravenous Immunoglobulins. *Academic Press* 1986; 421.
 39. **Hodes RJ, Germain R, Bluestone J.** The regulation of the immune system. *Immunol Today* 1984; 5: 279.
 40. **Nydegger E.** Aspectos fisiopatológicos de la enfermedad autoinmune como base para el tratamiento con transfusiones de mezclas de anticuerpos monoclonales. *Triángulo* 1985; 23: 141.
 41. **Dietrich G, Rossi F, Kazatchkine M.** Modulation of autoimmune responses with normal polyspecific IgG for therapeutic use. In: Melchers et al, eds. *Progress in Immunology VII*. Berlin: Springer Verlag, 1989; 1221.
 42. **Nydegger UE, Blaser K, Hassig A.** Antiidiotypic immunosuppression and its treatment with human immunoglobulin preparations. *Vox Sang* 1984; 47: 92.
 43. **Abdou NI, Wall H, Lindsley HB, Halsey JF, Susuki T.** Network theory in autoimmunity. *J Clin Invest* 1981; 47: 1297.
 44. **Hanh HB, Ebling F.** Idiotypic restriction in murine lupus; high frequency of three public idiotypes on serum IgG in nephritic NZB/NZW F1 mice. *J Immunol* 1987; 138: 2110.
 45. **Kohler H, Kieber-Emmons T, Srinivasan S, et al.** Revised immune network concepts. *Clin Immunol* 1989; 52: 104.
 46. **Erlanger BF, Cleveland WL, Wasserman UN, et al.** Autoantibodies to receptors by an autoantidiotypic route. In: Drachman D, ed. *Myasthenia Gravis: Biology and treatment*. NY, Acad Scien, 1987; 416.
 47. **Ilowite TN, Wegwood JF, Bonagura VR.** Expression of the Major Rheumatoid Factor cross-reactive idiotype in juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 265.
 48. **Kearney JF.** Idiotypic networks. In: Paul W, ed. *Fundamental Immunology*. Raven Press, 1989; 663.
 49. **Huetz F, Jacquemart F, Rossi PC.** Autoimmunity: The moving boundaries between physiology and pathology. In: Bach JF, ed. *Immunointervention in autoimmune diseases*. Academic Press, 1989; 11.
 50. **Natvig JB, Randen I, Thompson K, Forre O, Munthe E.** The B cell system in the rheumatoid inflammation. *Spring Sem Immunol* 1989; 11: 301.
 51. **Scott DW, Klinman NR.** Is tolerance the result of engaging surface Ig of B cells in cycle? *Immunol Today* 1987; 8: 105.
 52. **Teale JM, Abraham K.** The regulation of antibody class expression. *Immunol Today* 1987; 8: 122.
 53. **Manca F, Fenoglio D, Kunkl A, Cambiaggi C, Piro G, Celada F.** B cells on the podium: regulatory roles of surface and secreted immunoglobulins. *Immunol Today* 1988; 9: 300.
 54. **Lynch RG.** Immunoglobulin specific suppressor T cells. *Adv Immunol* 1987; 40:135.
 55. **Hodes RJ.** T cell mediated regulation: Help and suppression. In: Paul W, ed. *Fundamental immunology*, 2nd Ed. Raven Press, 1989; 587.
 56. **Allison JP, Lainer LL.** Structure function and serology of the T cell antigen receptor complex. *Ann Rev Immunol* 1987; 5: 503.

57. **Casali P, Notkins AB.** CD5+ B Lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today* 1988; **10**: 364.
58. **Pichler JW, Broder S.** In vitro functions of human T cells expressing Fc-IgG or Fc-IgM receptors. *Immunol Rev* 1981; **56**: 163.
59. **Fridman WH, Combe RC, Neaupourt-Sauces C, Gisler RH.** Characterization and function of T cell gamma receptor. *Immunol Rev* 1981; **56**:51.
60. **Gupta S, Good R.** Subpopulations of human T lymphocytes: Laboratory and clinical studies. *Immunol Rev* 1981; **56**: 89.
61. **Leswerman L.** The introversion of the immune response. A hypothesis for T-B interaction. *Immunol Today* 1985; **6**: 352.
62. **Telerman A, Amson RB, Romasco F, Wybran J, Galand P, Mosselmanns R.** Internalizations of human T lymphocyte receptors. 1987; **17**:991.
63. **Hogg N.** The structure and function of Fc receptor. *Immunol Today* 1988; **9**: 185.
64. **Salmon JE, Kapur S, Kimberly RP.** Gamaglobulin for intravenous use induces an Fc Gamma receptor specific decrement in phagocytosis by blood monocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; **43**: 23.
65. **Stohl W.** Cellular mechanisms in the in vitro inhibition of pokeweed mitogen-induced B cell differentiation by immunoglobulin for intravenous use. *J Immunol* 1986; **136**:4407.
66. **Kawada K, Teresaki PI.** Evidence for immunosuppression by high dose gamaglobulin. *Exp Hematol* 1987; **2**: 133.
67. **Abe T, Matsuda J.** Effects of immunoglobulin on cellular and humoral immunity of haemophiliacs with reversed T4/T8 ratio of lymphocytes. In: Morell A, Nydegger UN, eds. Clinical use of immunoglobulins. Academic Press, 1986; 385.
68. **Tsubakio T, Kurata Y, Katagiri S, et al.** Alteration of T cells subsets and immunoglobulin synthesis in vitro during high dose gamaglobulin therapy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Exp Immunol* 1983; **53**: 697.
69. **Iwata M, Shimozato R, Tokiwa H, Tsubura E.** Antipyretic activity of human immunoglobulin preparations for intravenous use in an experimental model of fever in rabbits. In: Morell A, Nydegger UE, eds. Clinical use of immunoglobulins. Academic Press, 1986; 327.
70. **Schreier MH.** La interleukina 2 y su función en la respuesta inmune. *Triángulo* 1985; **23**:151.
71. **Malkovsky M, Medawar P.** Is immunological tolerance non responsiveness a consequence of IL2 deficit? *Immunol Today* 1984; **5**: 340.
72. **Danylous JA, Ayoub G, Teresaki PI.** B lymphocyte isolation by thrombin nylon wool. In: Teresaki PI, ed. Histocompatibility testing. Munksgaard, 1980; 287.
73. **Hopkins KA, McQueen M.** Basic microlimphocitotoxicity technique. In: Zachary AA, Braun W, eds. The aacht laboratory manual, New York, *Aacht* 1981; **II**: 1-1.
74. **Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of protein micrograms quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248.
75. **Bona CA, Kobrin VC, Manheimer AJ, Bellon B, Rubinstein LJ.** Regulatory arms of the immune network. *Immunol Rev* 1984; **79**:25.
76. **Edidin M.** Function by association? MHC antigens and membrane receptor complexes. *Immunol Today* 1988; **9**: 218.
77. **Chesnut RW, Grey HM.** Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions. *Adv Immunol* 1986; **39**: 51.
78. **Ukkonen P, Lewis V, Marsh M, Helenius A, Mellman I.** Transport of macrophage Fc receptors and Fc receptor-bound ligands to lysosomes. *J Exp Med* 1986; **163**:952.
79. **Staunton D, Dustin M, Springer TA.** Functional cloning of cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989; **339**: 61.
80. **Rigald D, Bonnard M, Andreoni C, Bernaud J, Rousset F.** Effet immunosuppressif des gammaglobulines intraveineuses (IGIV): Modulation de l'antigène LFA-1. IX Congrès Soc Fr. Hematol, Grenoble.
81. **Ninneman JL, Stockland AE.** Participation of prostaglandin E in immunosuppression following thermal injury. *J Trauma* 1984; **24**: 201.
82. **Fernández LA, Macsween JM.** The suppressive effects of monocytes in the autologous mixed lymphocyte reaction. *Immunol* 1981; **44**: 653.
83. **Durandy A, Griscelli C.** Activation by injectable gammaglobulins of the suppressive functions of the humoral response tested in vitro. *Press Med* 1983; **12**: 2567.
84. **Larrick JW.** Native interleukin 1 inhibitors. *Immunol Today* 1989; **10**:61.
85. **Fiad HD, Loppnow H, Feist W, et al.** Interleukin 1 and tumor necrosis factor: studies on the induction by lipopolysaccharide partial structures. *Lympho Res* 1989; **8**: 235.
86. **Flad HD, Kirchner H, Resch K.** Interleukin 1 and related cytokines. *Lympho Res* 1989; **8**: 227.
87. **Di Giovine F, Duff WG.** Interleukin 1: The first interleukin. *Immunol Today* 1990; **11**: 13.
88. **Shevach E.** Accessory molecules. In: Paul W, ed. Fundamental immunology. Raven Press 1989; 413.
89. **Anderson P, Morimoto C, Breitmeyer J, Schlossman SF.** Regulatory interactions between members of the immunoglobulin superfamily. *Immunol Today* 1988; **9**: 199.
90. **Bierer BB, Slecman BP, Ratnofsky SE, Burakoff S.** The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Ann Rev Immunol* 1989; **7**: 579.
91. **Cunningham C.** Treatment of AB deficiencies. *Vox Sang* 1986; **51**:63.
92. **Hill HR.** The use of intravenous immunoglobulin in the treatment and prophylaxis of bacterial and viral infections. *Immunol Allergy Clin N Am* 1988; **8**: 29.
93. **García LF, Arango AM, Rezonew, et al.** Random and donor specific blood transfusions in living related donor kidney transplants. *Trans Proc. Aceptado para publicación.*
94. **Weigle WO, Scheuer WV, Hobbs MV, Morgan EL, Parks E.** Modulation of the induction and circumvention of immunological tolerance to human gamaglobulin by interleukin 1. *J Immunol* 1987; **138**: 2069.
95. **Stohl W, Cunningham RC, Thompson C, Mayer L.** Modulation of the immune response by immunoglobulin for intravenous use. II. Inhibitory effects of sera from treated patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; **41**: 273.
96. **Nossal GJV.** Immunologic tolerance. In: Paul W, ed. Fundamental immunology. Raven Press, 1989; 571.
97. **Lee EJ, Norris D, Schiffer CA.** Intravenous immune globulin for patients alloimmunized to random donor platelet transfusion. *Transfusion* 1987; **27**: 245.
98. **Kurtzberg J, Friedman HS, Kinney SC, Falleta JM.** Treatment of platelet alloimmunization with intravenous immunoglobulin: two case reports and review of the literature. *Am J Med* 1987; **83**: 30.
99. **Hoffman MK.** Antibody regulates the cooperation of B cells with helper cells. *Immunol Rev* 1980; **49**: 79.
100. **Iwata M, Huff T, Ishizaka K.** Modulation of the biological activities of IgE-binding factor. *J Immunol* 1984; **132**: 1286.
101. **Mosmann TR, Coiffman RL.** TH1 and TH2 cells different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989; **7**:145.
102. **Sultzer BM.** Polyclonal lymphocyte activation by M tuberculosis and its products. In: Bendinelli M, Friedman H, eds. *Micobacterium tuberculosis*. London: Plenum Press, 1988; 277.
103. **Hanh H, Ebling FM, Panosian-Sahakian N, et al.** Idiotype selection is an immunoregulatory mechanism which contributes to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Bach JF, ed. *Immuno-intervention in medicine*. Academic Press, 1989; 177.
104. **Tomino Y, Sakai H, Takaya M, Suga T, Endoh M, Nomoto Y.** Solubilization of intraglomerular deposits of IgG immune complexes by human sera or gamma-globulin in patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol* 1984; **58**: 42.
105. **Sato M, Kojima H, Koshikawa S.** Modification of immune complexes deposited in complexes in tissue sections treated with sulfonized gammaglobulin. *Clin Exp Immunol* 1986; **64**: 623.
106. **Lin CY, Hsu HC, Chiang H.** Histological and immunological reversal in steroid and immunosuppressive drug resistant lupus nephritis by high dose intravenous gammaglobulin. Xth International Congress of Nephrology. London 1987.