

CONDICIONANTES DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN IgM E IgG Y EL CAMBIO DE UNA A OTRA: ACCION DEL ANTIGENO, DE LOS ACTIVADORES POLICLONALES, DE LOS CITOTOXICOS Y CITOSTATICOS.

J. Gras, N. Tuset, T. Tilló y P. García.

La respuesta en anticuerpos implica a varias inmunoglobulinas, especialmente a la IgM, que se induce frente a un estímulo antigénico primario y la IgG, que se induce frente a un estímulo secundario. La IgM tiene un PM más elevado y un tiempo de vida más corto, mientras que la IgG tiene un PM menor y un tiempo de vida mucho más largo. La respuesta en IgM tiene una difusión orgánica limitada y un tiempo de actividad mucho más corto, mientras que la IgG difunde más ampliamente y con un tiempo de actividad mucho más prolongado.

El estímulo antigénico es el desencadenante inicial de estas respuestas pero en las mismas intervienen factores no específicos, que pueden estimularlas, como los activadores policlonaes, o inhibirlas, como los citostáticos y, además, es también muy importante la intensidad y persistencia del estímulo antigénico, que puede no tan sólo inducir el cambio de IgM a IgG, sino también inhibir la respuesta, a través de mecanismos e interacciones celulares entre células B y T, no del todo conocidos. Vamos a considerar la acción de esos diversos factores en las respuestas en IgM e IgG frente a antígenos no bloqueantes; son antígenos bloqueantes aquellos que por tener múltiples determinantes antigénicos de la misma especificidad en carriers inertes pueden bloquear directamente y no estimular, a una célula B con múltiples receptores antigénicos de dicha especificidad (1,2).

Es muy conocida la existencia de antígenos T dependientes y T independientes, es decir, antígenos que dan una respuesta intensa en animales tiectomizados y antígenos que requieren la intervención de células tímicas para dar una respuesta significativa. Hace ya unos años que estudiamos

la cinética del cambio de IgM a IgG y de su inhibición final frente a la estimulación persistente con antígenos de estos tipos, a dosis inmunogénicas. Así, como se observa en la Fig. 1, la inmunización persistente

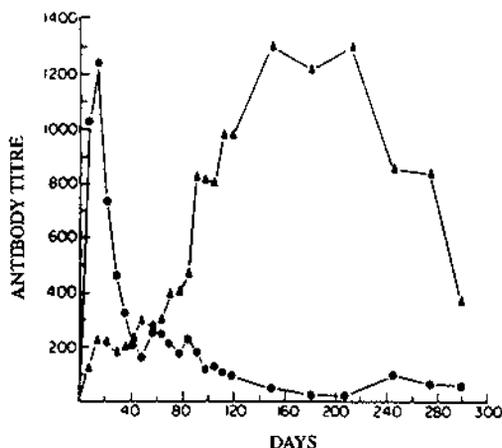


Fig 1. Curvas promedio de las respuestas en IgM (●) e IgG (▲) en conejos inoculados persistentemente con Br. abortus (= 1 mg. p seco/3v./semana) (v. pr. 10 animales).

con la Br. Abortus a dosis inmunogénica, antígeno T independiente, induce una onda inicial de respuesta intensa en IgM que llega a un máximo y se inhibe a los 40 días, mientras que la respuesta en IgG aparece un poco después, es inicialmente débil y va aumentando para llegar a un máximo los días 140 a 200 y después descender. Un factor primordial en estas respuestas y en su inhibición final es la persistencia del estímulo antigénico(3).

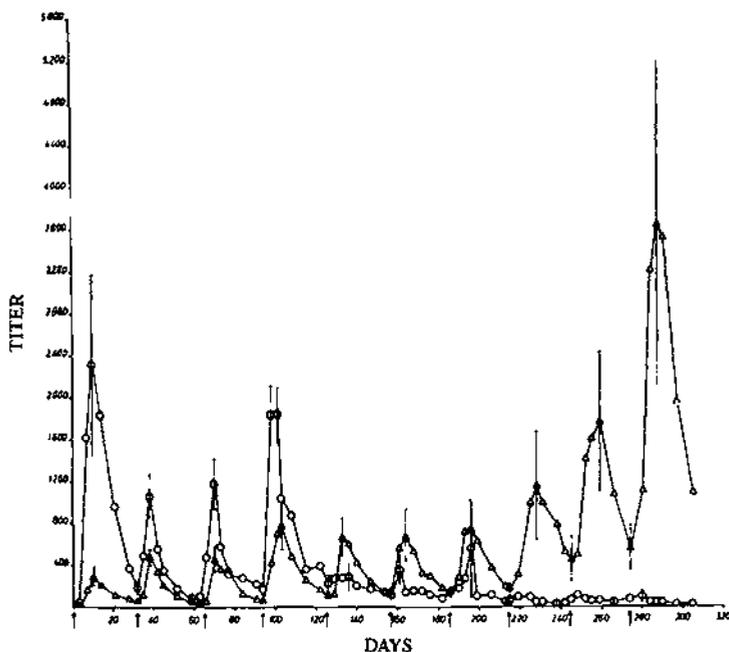
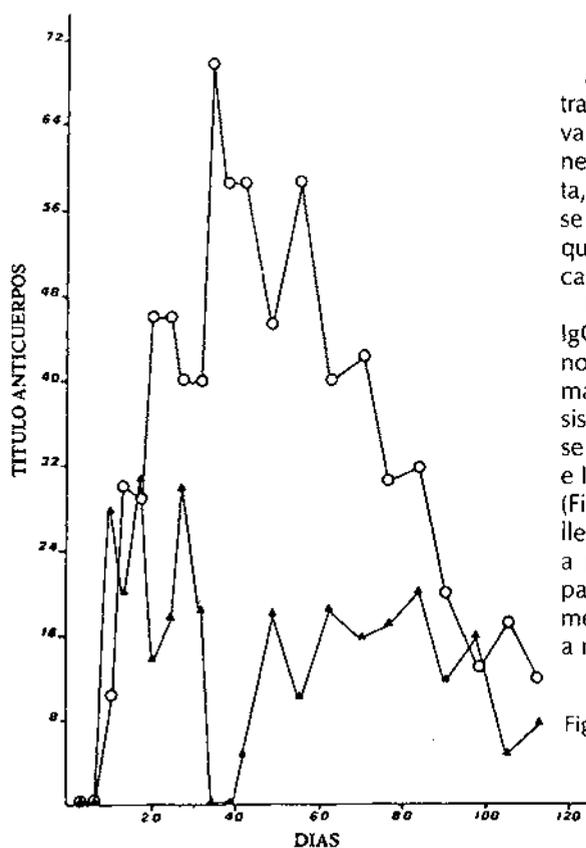


Fig 2. Respuesta en IgM (o) e IgG (△) en conejos inoculados con una dosis de Br. abortus (13.3 mg), cada 30 días, durante 339 días (v. pr. 5 animales).



Así, con la misma Br. Abortus, si administramos un estímulo cuantitativamente equivalente pero dado cada 30 días, se obtienen (Fig. 2) una serie de picos de respuesta, integrados hasta los 200 días, por IgM se inhibe a un nivel muy bajo, mientras que la IgG se incrementa fuertemente y es casi única a los 300 días(4).

Esta cinética de las respuestas en IgM e IgG es muy distinta en el caso de un antígeno T dependiente, como la albúmina humana. Administrada en el conejo a una dosis de 700 mg/Kg, tres veces a la semana, se inducen dos curvas de respuesta en IgM e IgG muy similares en cuanto a su cinética (Fig. 3), pero la que corresponde a la IgG llega a cifras mucho más altas a los 40 días, a partir de los cuales inicia su descenso para llegar a los 120 días a valores ligeramente superiores a los de la IgM y ambos a niveles muy bajos(5).

Fig 3. Respuestas en IgM (●) e IgG (△) en conejos inmunizados con 700 mg de seroalbúmina humana 3 v/semana (v. pr. 4 animales).

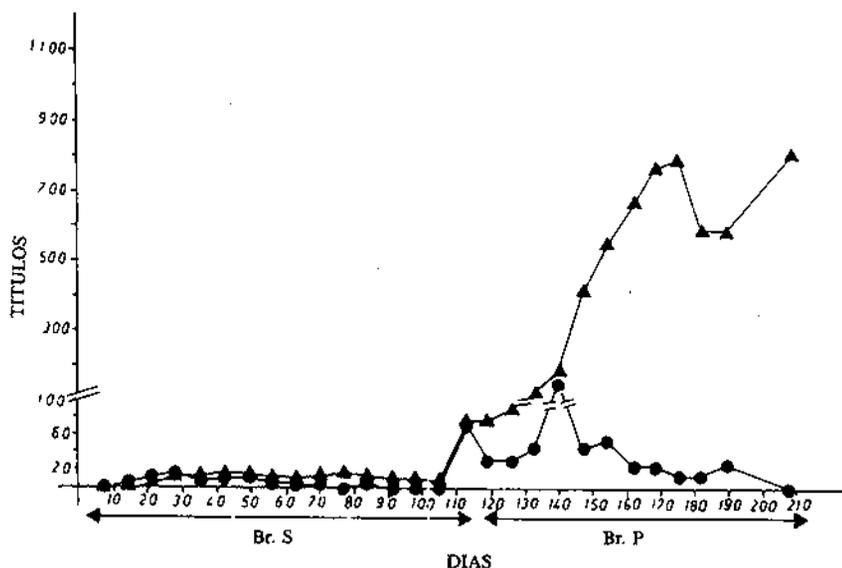


Fig 4. Respuesta en anticuerpos IgM (●) e IgG (▲) a la inoculación persistente de *Brucella* solubilizada durante 105 días y posteriormente de particulada hasta los 210 días, ambas en la cantidad de 0.3 ml. 3 v/s en el conejo (v. pr. 10 animales)

La respuesta a la *Br. Abortus* corresponde al lipopolisacárido de membrana, en cuanto a su especificidad a la fracción polisacárida del mismo y, en cuanto a su intensidad y T independencia, al lípido. Este lípido puede eliminarse fácilmente por hidrólisis alcalina, obteniéndose entonces la *Br.* soluble. La respuesta a esta *Br.* soluble, exenta del lípido que induce una respuesta a un nivel bajísimo, tanto para la IgM como para la IgG, aunque a partir de los 30 días está por encima de la primera. La sustitución en este momento de la *Br.* soluble por la *Br.* particulada induce un aumento rápido y a niveles altos de la respuesta en IgG, mientras que la de IgM, aunque también aumenta, lo hace a un nivel muy inferior y se sigue de un acentuado descenso(6).

Estos datos creemos que evidencian netamente que la especificidad de la respuesta depende de la acción del determinante antigénico y que el cambio de IgM a IgG es función fundamental de la persistencia de dicho estímulo, que si es suficientemente persistente llega a inducir la inhibición de dicha respuesta. La acción del activador policlonal, en este caso el lípido del LPS, es la de potenciar la acción del estímulo anti-

génico incrementando la intensidad de la respuesta, cuando esta es pequeña. Esta acción o señal 2, va íntimamente ligada a la del determinante antigénico, señal 1, y no puede sustituirla ni ejercerse si no va ligada, directa o indirectamente, al mismo.

Así, por ej., como se observa en la Fig. 5, la administración de *Br.* soluble conjuntamente con LPS de *E. Coli*, induce la misma respuesta que se obtiene con la *Br.* soluble sola, es decir a nivel bajísimo y la subsiguiente administración de *Br.* particulada potencia la respuesta en IgM en forma discreta y que enseguida se inhibe, mientras que la de IgG asciende a límites muy altos que se mantienen.⁶ Por el contrario, como se observa en la Fig. 6, si interrumpimos la administración de *Br.* particulada, y la sustituimos por la de LPS solo, las respuestas existentes en aquel momento, tanto en IgM como en IgG, no aumentan sino que van desapareciendo; esto implica que la acción no específica de la señal 2 está conectada con la específica de la señal 1(7).

La acción del LPS de la *E. Coli* la hemos estudiado también en el ratón sobre los anticuerpos naturales anti-TNP, valorándolos a nivel de CFP, que es más sensible, en lo-

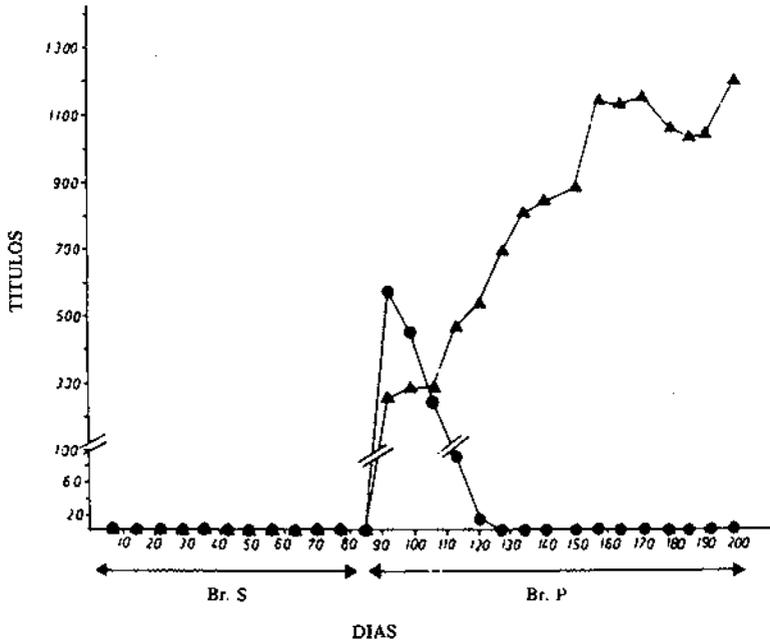


Fig 5. Respuesta en anticuerpos IgM (●) e IgG (▲) a la inoculación persistente de *Brucella* soluble (0.3 ml, 3 v/s) y 10 μ g/ml de LPS vía endovenosa (3 v/s) hasta los 200 días en el conejo (v. pr. 10 animales).

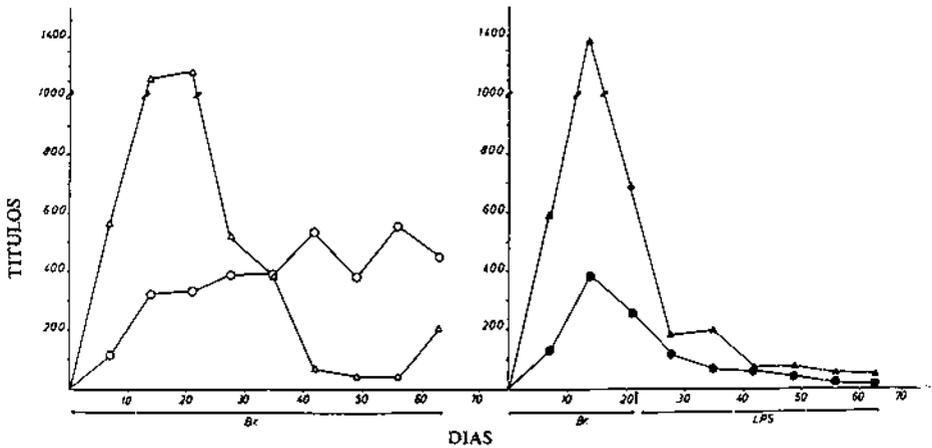


Fig 6. La interrupción de la inmunización persistente con *Brucella abortus* particulada y su sustitución por el LPS de la *E. Coli*, induce una desaparición de la respuesta (v. pr. de 6 animales)

tes de ratones Swiss y NZB. Como se observa en la tabla I, la administración de LPS a dosis única o repetida induce un aumento evidente en ambas cepas de ratones de las CFP anti-TNP, proporcional al nivel preexistente de las mismas, más alto en los NZB que en los Swiss, de manera que el cociente inoculadas/control es igual en todos los grupos (tabla II), lo que implica que el número de CFP anti-TNP en los inoculados con LPS es proporcional al número de CFP preexistente, es decir, al número de células formadoras de anticuerpos preexistente, tanto en IgM como en IgG. En este caso, por tanto, la acción del LPS es también la de potenciar una población celular previamente estimulada por el antígeno(8).

En el caso de los antígenos T-dependientes, como los hematíes, la señal 2 se induce exclusivamente a través de las interacciones de las células B o de las presentado-

ras con las células T, con la subsiguiente liberación de interleuquinas. Estos antígenos son muy sensibles a la timectomía, que induce una inhibición acentuada de su formación de anticuerpos. Como se observa en la tabla III, los ratones Swiss timectomizados dan unas respuestas en CFP anti-hematíes de carnero del orden de un 40 a 50% inferiores a las de los ratones no timectomizados(9).

Vamos a considerar ahora la acción de los citotóxicos y citostáticos, especialmente de la ciclosporina, sobre la respuesta inmunológica. Los citotóxicos, como por ejem. el HgCl₂ tienen una acción no específica, es decir sin preferencia para un tipo u otro de células, mientras que los citostáticos pueden actuar preferentemente sobre un determinado tipo celular de los que intervienen en la respuesta inmunológica. Así, la ciclofosfamida tiene acción prefe-

TABLA I

Valores promedio \pm DE₁ y de significación estadística₂ de CFP₃ anti-hematíes-TNP en ratones₄, inyectados con LPS a dosis única o repetidas(8).

| | CFP/10 ⁶ /4 días | | CFP/10 ⁶ /controles | |
|------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| | IgM | IgG | IgM | IgG |
| SWISS | | | | |
| 100 μ g | 39.39 \pm 8.54 p < 0.001 | 17.40 \pm 2.75 p < 0.001 | 3.07 \pm 0.54 | 1.12 \pm 0.30 |
| 50 μ g/s/3s | 15.92 \pm 1.66 p < 0.001 | 4.56 \pm 1.40 p:0.10-0.05 | 3.95 \pm 0.52 | 1.97 \pm 0.35 |
| 100 μ g/s/3s | 27.28 \pm 3.91 p < 0.001 | 9.91 \pm 2.27 p < 0.001 | 1.80 \pm 0.30 | 0.50 \pm 0.12 |
| NZB | | | | |
| 100 μ g | 95.48 \pm 18.31 p < 0.001 | 20.82 \pm 4.08 p < 0.001 | 15.80 \pm 5.83 | 2.68 \pm 0.74 |
| 50 μ g/s/3s | 49.81 \pm 13.02 p:00.1-0.01 | 11.60 \pm 7.95 p < 0.001 | 2.93 \pm 0.92 | 0.58 \pm 0.22 |
| 100 μ g/s/3s | 68.59 \pm 10.02 p < 0.001 | 3.51 \pm 1.24 p:0.70-0.80 | 10.04 \pm 2.86 | 2.92 \pm 0.97 |

1. DE, desviación standard.

2. Test de la T de Student

3. CFP, células formadoras de placas

4. Lotes de 20 ratones.

TABLA II

Valores promedio globales de CFP anti hematíes-TNP a los 4 días de la última dosis de LPS, en animales inyectados y en animales control, así como el cociente entre ambos(8).

| | N.º animales | CFP | |
|--|--------------|-------|-------|
| | | IgM | IgG |
| Swiss | 40 | 24.33 | 10.47 |
| Control | 46 | 2.63 | 1.04 |
| Cociente $\frac{\text{Swiss}}{\text{Control}}$ | - | 9.25 | 10.06 |
| NZB | 39 | 66.27 | 14.13 |
| Control | 37 | 7.85 | 1.69 |
| Cociente $\frac{\text{NZB}}{\text{Control}}$ | - | 8.44 | 8.36 |

rentemente sobre las células B, mientras que la ciclosporina sobre las T (10, 11, 12, 13, 14). Ha de tenerse en cuenta, además, que la acción citotóxica va muchas veces seguida de los que se conoce como "efecto rebote", es decir de una proliferación posterior estimulada de la población celular inicialmente inhibida.

La acción de los citotóxicos como el HgCl₂ puede dar lugar, precisamente, a un aumento de determinados anticuerpos, consecutivo a una lesión tisular que induce la liberación de antígenos celulares. Esta acción la hemos comprobado en los ratones Swiss y NZB, como se observa en la tabla IV. La administración de HgCl₂ da lugar a un aumento de las CFP anti-TNP en estos ratones(15), consecutiva a la liberación de antígenos como bases pirimídicas y RNA, de reacción cruzada(16).

Este "efecto rebote" se observa también con la ciclofosfamida. Experimentalmente lo hemos comprobado en el modelo Brucella-conejo. Como se observa en la Fig. 7 los conejos inmunizados persistentemente con 0.3 ml. de la suspensión de Br. abortus, 3 veces/semana, si se les administra ciclofosfamida a la dosis de 150 mg/Kg el día de la inmunización, dan una respuesta en IgM e IgG muy superior a la de los que se les administra únicamente la Brucella(17).

Esta acción de la ciclofosfamida, aunque a un nivel muy discreto, la hemos observado también frente a los anticuerpos naturales anti hematíes-TNP en el ratón, valorados a nivel de CFP. Como se observa en la tabla V, la administración de ciclofosfamida a dosis única o repetida induce no un descenso sino un aumento, aunque como hemos indicado discreto, de las CFP anti he-

TABLA III

Acción de la timectomía en la formación de CFP, directas e indirectas anti hematíes de carnero₁ en el ratón Swiss(9).

| CFP/bazo ₂ | Controles | Timectomizados | % |
|-----------------------|----------------|-----------------|------|
| Directas | 3 470 ± 759 | 1 724 ± 627.1 | 49.6 |
| Indirectas | 21 030 ± 6 900 | 8 576 ± 3 267.8 | 40.7 |

1. 5×10^8 hematíes 2 meses post timectomía

2. CFP, 8 días después de la inyección de antígeno (Pr ± SE) Lotes de 8 a 15 animales.

TABLA IV

Valores promedio \pm DE₁ y significación estadística₂ de CFP anti hemáties-TNP en ratones inyectados con HgCl₂ (Lotes de 20 ratones)(15)

| | CFP/10 ⁶ /4 días | | CFP/10 ⁶ /controles | |
|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| | IgM | IgG | IgM | IgG |
| Swiss | | | | |
| 15, 15, 30 y 60 μ g ₃ | 13.60 \pm 1.80 p < 0.001 | 2.43 \pm 0.65 p:0.02-0.05 | 3.93 \pm 0.59 | 0.79 \pm 0.27 |
| 30 μ g/3vs/7s | 8.60 \pm 1.26 p < 0.001 | 2.18 \pm 0.73 p:0.05-0.10 | 1.97 \pm 0.34 | 0.82 \pm 0.25 |
| NZB | | | | |
| 15, 15, 30 y 60 μ g ₃ | 27.30 \pm 5.93 p:0.05-0.10 | 9.05 \pm 2.14 p:0.02-0.05 | 15.05 \pm 2.54 | 3.95 \pm 1.02 |
| 30 μ g/3vs/7s | 30.92 \pm 7.04 p < 0.001 | 7.92 \pm 3.31 p:0.05-0.10 | 6.36 \pm 1.42 | 2.25 \pm 0.53 |

1. Desviación estandard

2. p mediante el test de la T de Student

3. Inoculados los días 1, 2, 3 y 6 con 15, 15, 30 y 60 μ g, respectivamente.

maties-TNP(15).

Vamos a considerar finalmente la acción de la ciclosporina A, citostático que actúa preferentemente sobre la señal 2, es decir la correspondiente a la liberación de interleuquinas. Como se observa en la tabla VI, la ciclosporina A inhibe netamente la respuesta primaria en IgM anti-hemáties de carnero en el ratón, valorada a nivel de CFP. Por el contrario, la respuesta secundaria en IgG es muchísimo más resistente y requiere una dosis de ciclosporina muy alta (300 mg/Kg) para inhibirla aproximadamente a la mitad(18).

Esta inhibición de la respuesta primaria inducida por la ciclosporina es contrarrestada por la administración de LPS, como se observa en la tabla VII. Esta observación es una comprobación más de que la ciclosporina A influye sobre la señal 2, es decir sobre la activación de las células "helper" específicas de la misma, por un camino de interacciones no bien establecido, pero que puede contrarrestarse por el LPS(18).

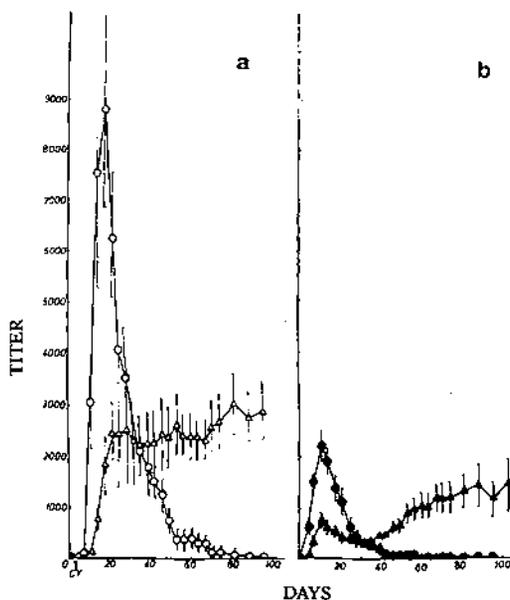


Fig 7. Curvas de respuesta en IgM (●) e IgG (▲) en conejos inmunizados persistentemente con Br. abortus, tratados con 150 mg. de ciclofosfamida el día 3 (7a) comparativamente a la de otro lote inmunizado igualmente pero a los que no se les administra ciclofosfamida (7b) (v. pr. 11 animales).

TABLA V

Valores promedio \pm DE₁ y de significación estadística₂ de CFP₃ anti hematíes-TNP en ratones₄, inyectados con ciclofosfamida(15).

| | CFP/10 ⁶ /4 días | | CFP/10 ⁶ /controles | |
|-------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| | IgM | IgG | IgM | IgG |
| Swiss | | | | |
| 3 mg | 6.68 \pm 1.17 p:0.20-0.30 | 1.16 \pm 0.31 p:0.70-0.80 | 4.96 \pm 0.68 | 0.97 \pm 0.48 |
| 3 mg/s/3s | 9.74 \pm 2.58 p:0.02-0.05 | 1.69 \pm 0.49 p:0.10-0.20 | 2.88 \pm 0.83 | 0.95 \pm 0.23 |
| 3 mg/2vs/3s | 4.53 \pm 1.12 p:0.70-0.80 | 0.74 \pm 0.41 p:0.60-0.70 | 3.95 \pm 1.06 | 0.52 \pm 0.14 |
| NZB | | | | |
| 3 mg | 11.01 \pm 1.39 p:0.05-0.10 | 6.34 \pm 2.37 p:0.20-0.30 | 6.87 \pm 1.46 | 2.60 \pm 1.06 |
| 3 mg/s/3s | 13.50 \pm 2.21 p:0.10-0.20 | 5.00 \pm 1.40 p:0.05-0.10 | 9.51 \pm 1.37 | 2.01 \pm 0.42 |
| 3 mg/2vs/3s | 14.75 \pm 4.91 p:0.10-0.20 | 6.72 \pm 3.55 p:0.05-0.10 | 7.17 \pm 1.64 | 0.57 \pm 0.23 |

1. DE, desviación standard
2. p mediante el test de la T de Student
3. CFP, células formadoras de placas
4. Lotes de 20 ratones

TABLA VI

Acción de la ciclosporina A sobre la respuesta primaria y secundaria anti-hematíes de carnero en el ratón₁ valoradas en CFP₂(18).

| | IgM | IgG |
|--|------------------|---------------------|
| Respuesta primaria₃ | | |
| HC (5 \times 10 ⁸) | 118.0 \pm 21.7 | 8.6 \pm 2.1 |
| HC (5 \times 10 ⁸) + CsA (150 mg/Kg) | 2.6 \pm 1.6 | 0.8 \pm 0.5 |
| Respuesta secundaria₄ | | |
| HC (5 \times 10 ⁸) + CsA (150 mg/Kg) | 62.0 \pm 1.8 | 1 783.2 \pm 275.6 |
| HC (5 \times 10 ⁸) + CsA (225 mg/Kg) | 30.4 \pm 10.9 | 2 691.8 \pm 721.1 |
| HC (5 \times 10 ⁸) + CsA (300 mg/Kg) | 5.5 \pm 1.9 | 959.5 \pm 623.0 |

1. Lotes de 20 animales
2. CFP, células formadoras de placas
3. Analizada a los 4 días de la inyección
4. Analizada a los 4 días de la 2ª inyección, administrada a los 30 días de la 1.ª

TABLA VII

Acción del LPS sobre la respuesta primaria a los hematíes de carnero en el ratón, inhibida por la ciclosporina A(18).

| | Respuesta primaria valorada en CFP a los 4 días | |
|--|---|----------------|
| | IgM | IgG |
| HC (5×10^8) | 118.0 \pm 21.7 | 8.6 \pm 2.1 |
| HC (5×10^8) + CsA (150 mg/Kg) | 2.5 \pm 1.6 | 0.8 \pm 0.5 |
| HC (5×10^8) + CsA (150 mg/Kg) + LPS | 68.8 \pm 12.1 | 21.5 \pm 5.9 |

1. Lotes de 20 animales

La respuesta en anticuerpos IgM e IgG está condicionada, pues, por una serie de factores específicos y no específicos, que pueden modificarla en varios sentidos. Así, su especificidad y el cambio de IgM a IgG son función exclusiva del determinante antigénico y de la continuidad de su estímulo, determinante antigénico que es el factor primordial e imprescindible. Por el contrario, la intensidad de dichas respuestas, especialmente de la IgM, es potenciada o inhibida por otros factores, imbricados fundamentalmente con las células T, o por activadores policlonales, que pueden o no estar implicados en el complejo antigénico. Finalmente, si el estímulo antigénico persiste un tiempo prolongado induce un estado de no respuesta, es decir, de tolerancia inmunológica, que persiste mientras persiste dicha estimulación antigénica.

Si, como acabamos de señalar y hemos comprobado experimentalmente, la inmunización persistente conduce a un estado de no respuesta, independientemente de que inicialmente se induzca una respuesta intensa o débil, la acción de los citostáticos con acción preferente sobre la célula T, como la ciclosporina A, inhibiendo la pro-

ducción de interleuquinas, adquiere una importancia fundamental en el establecimiento y tolerancia permanente de órganos o tejidos transplantados. Con ella puede conseguirse un frenado importante de la respuesta inmunológica inicial frente a los antígenos orgánicos, que son fundamentalmente T dependientes, evitando el rechazo y permitiendo el establecimiento de un estado de tolerancia o de equilibrio inmunológico a un nivel bajo no patógeno(19).

Es también importante recordar que la acción de citotóxicos o citostáticos no específicos puede inducir, no una disminución de la respuesta inmunológica sino, por el contrario, un incremento de la misma por liberación de antígenos celulares o por una subsiguiente proliferación de células activadas (efecto rebote).

Como hemos visto, es fácil poner estos hechos de manifiesto en condiciones experimentales apropiadas y es muy interesante conocerlos para poder interpretar estas reacciones inmunológicas en condiciones biológicas normales o en procesos clínicos, que son mucho más complejos.

BIBLIOGRAFIA

1. Dintzis R. E., Okajima M., Middleton M. H., Dintzis H. M. Inhibition of antibody formation by receptor cross-linking: the molecular characteristics of inhibitory haptenated polymers. *Europ. J. Immunol.* 20: 229, 232-1990.
2. Dintzis R. Z., Okajima M., Middleton M. H., Greene G., Dintzis H. M., The immunogenicity of soluble haptenated polymers determined by molecular mass and hapten volumes. *J. Immunol.* 143: 1239,1244-1989.
3. Gras J., Roca M., Ayats R., Castro R., Durán F. Antibody formation during continual stimulation with a strong immunogen. *Immunol.* 26: 759,767-1974.
4. Gras J., Bolós C., García P. Conditions of antigenic stimulation necessary for the termination of the IgM response and the appearance of a single and persistent IgG response. The change from IgM to IgG is a biological expansion of the response. *Allergol. Immunopathol.* 9: 343,350-1981.
5. Gras J., Roca M. Inhibition of IgM formation during continual stimulation with a weak immunogen. *Allergol. Immunopathol.* 2: 399,404-1974.
6. García P., Gras J. La inmunización persistente con *Brucella abortus* solubilizada (exenta del lípido) induce el cambio de IgM a IgG sin apenas respuesta aparente. *Inmunología.* 9: 57,64-1990.
7. Tuset N., Gras J. Acción de la sustitución de la estimulación antigénica por la estimulación, con LPS, en el cambio de IgM a IgG. Trabajo en curso.
8. Tuset N., Gras J. Acción de los activadores policlonales, de los fármacos inductores de lupus, de los citostáticos y citotóxicos sobre los anticuerpos naturales anti-TNP. (I). Acción del LPS y de la procainamida. *Inmunología* 8: 29,37-1989.
9. Gras J., Miralbell R., Castro R., Miralbell C. Influence of neonatal thymectomy on IgM and IgG responses to sheep erythrocytes in the Swiss white mouse. *Allergol. Immunopathol.* 5: 561,568-1977.
10. Droz D. Papel de la patología en el diagnóstico diferencial de la disfunción del injerto renal. *Rev. R. Ac. Medicina Barcelona* 4:105,114-1989.
11. Frías J. Farmacología clínica de la ciclosporina. *Rev. Diag. Biol.* 39:33,36-1990.
12. Carreras E., Deulofeu R., Grañena A., Rozman C. Ciclosporina A en el trasplante de médula ósea. *Rev. Diag. Biol.* 38:239,243-1989.
13. Kosugi A., Sharrow S. O., Shearer G. H. Effect of cyclosporine A on lymphopoiesis. I.—Absence of mature cells in thymus and periphery of bone marrow transplanted mice treated with cyclosporin A. *J. Immunol.* 142 3026,3032-1989.
14. Heeg L., Wagner H. Cyclosporin A prevents the generation of single positive (Lyt.2 + L3T4 + Lyt 2-L3T4⁺) mature T cells, but not single positive (Lyt2⁺T3⁻) immature thymocytes, in newborn mice. *Scand. J. Immunol.* 30: 703,710-1989.
15. Tuset N., Gras J. Acción de los activadores policlonales, de los fármacos inductores de lupus, de los citotóxicos y citostáticos sobre los anticuerpos naturales anti-TNP. (II). Acción del HgCl₂ y de la ciclofosfamida. *Inmunología* 8:38,48-1989.
16. Underdown B. J., Eisen H. N. Cross-reactions between 2,4-dinitrophenyl and 5-acetouracil group. *J. Immunology* 106: 1431,1441-1971.
17. Gras J., Bolós C. Effect of cyclophosphamide on specific IgM and IgG responses and recovery during the various stages of the persistent immunization in the *Brucella*-rabbit model. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 134 D: 181,189-1983.
18. Tilló T., Gras J. Acción de la ciclosporina A sobre el priming para una respuesta secundaria. *Inmunología* 9: 20,25-1990.
19. Gras J. El "mito" de la diferenciación inmunológica entre lo "propio" y lo "no propio" y la existencia de un "equilibrio inmunológico u homeostasis inmunológica antígeno dependiente". *Inmunología* 5:100,109-1986.