

T.D.
13/30

ASPECTOS REGULADORES DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA
PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS EN CULTIVOS DE LINFOCI
TOS HUMANOS ESTIMULADOS CON PWM.



Trabajo realizado por JOSE ANTONIO BRIEVA ROMERO en el
Servicio de Inmunología del Centro Especial Ramón y Cajal.
de Madrid.

Director

Emilio Gomez

D. Emilio Gomez de la Concha
Jefe de Sección del Servicio
de Inmunología del Centro -
Especial Ramón y Cajal.

Ponente

R. Goberna

Profesor D. Raimundo Goberna
Ortiz.
Catedrático de Bioquímica de
la Facultad de Medicina de l
Universidad de Sevilla.

DON EMILIO GOMEZ DE LA CONCHA, Jefe de Sección del Servicio de Inmunología del Centro Especial "Ramón y Cajal".

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado "ASPECTOS REGULADORES DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS ESTIMULADOS CON PWM", ha sido realizado por Don JOSE ANTONIO BRIEVA ROMERO, bajo mi dirección, como Tesis de Doctorado.

Madrid junio de 1981.

Emilio Gómez

A Cándido y Esperanza

Este trabajo ha sido financiado en parte por la ayuda T.R. 10847 Exp. 75/80 del Fondo de Descuento Complementario.

Agradezco al Dr. Emilio Gómez de la Concha, Jefe de la Sección de Inmunología Clínica el haber dirigido el presente trabajo, y al Dr. Alfredo Bootello Gil, Jefe del Servicio de Inmunología del Centro Especial Ramón y Cajal, el haber hecho posible la realización del mismo.

Gracias también a Reyes Urbiola Litago, Francisca Jaime Fernandez, y Nieves Menendez Rodriguez, por su inestimable ayuda técnica y a Maria Victoria Martin Garcia por el trabajo de mecanografía.

Asimismo deseo expresar mi agradecimiento a Antonio Campos Manzano, Francine Doat Forgues, Adolfo Campos Ferrer, Dora Pascual-Salcedo Pascual y Julia Sequí Navarro, miembros de la Sección de Inmunología Clínica, y que de una u otra forma han colaborado en este trabajo.

Por último, deseo expresar mi gratitud al Profesor. D. Raimundo Goberna Ortiz, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, por haber aceptado la ponencia del presente trabajo.



INDICE

INTRODUCCION

	<u>Página</u>
1. Algunos conceptos basicos	1
2. Cooperación celular	3
3. Regulación de la producción de anticuerpos en ra- tón	4
4. Marcadores de linfocitos humanos	8
5. Regulación de la producción de anticuerpos especifi- cos por linfocitos humanos	10
6. Los mitogenos en el estudio de la función de los - linfocitos	11
7. El mitogeno PWM	17
8. Patología de la interacción celular	23
8.1. Alteraciones de la regulación en inmunodefi- encias	25
8.1.1. Hipogammaglobulinemias	25
8.1.2. Déficit aislado de IgA	26
8.1.3. Otras inmunodeficiencias primarias ...	27
8.1.4. Inmunodeficiencias secundarias	27
8.2. Alteraciones de la regulación en enfermedades autoinmunes	28
9. Glucocorticoides y respuesta inmune e inflamatoria	30
9.1. Algunas características de estos compuestos .	31
9.2. Modo de acción	33
9.3. Acción de los glucocorticoides sobre la fun- ción de las celulas que intervienen en la in- flamación y en la respuesta inmune	36
9.3.1. Acción de los glucocorticoides sobre - el trafico celular	36
9.3.1.1. Neutrofilos	38
9.3.1.2. Eosinófilos	39
9.3.1.3. Linfocitos y Monocitos	39

	<u>Pag.</u>
9.3.2. Acción de los glucocorticoides sobre la función celular	42
9.3.2.1. Neutrofilos y Eosinofilos ...	42
9.3.2.2. Monocitos y Macrofagos	43
9.3.2.3. Linfocitos	44
<u>OBJETIVOS</u>	48
 <u>MATERIAL Y METODOS</u>	
1. Obtención del material	50
2. Condiciones de esterilidad	50
3. Medio de cultivo	50
4. Obtención de linfocitos	50
4.1. Sangre	50
4.2. Amígdala	51
5. Mitógenos	51
6. Glucocorticoides	51
7. Proliferación de linfocitos en cultivo estimula dos con mitógeno	52
8. Marcadores celulares	53
8.1. Detección de linfocitos T por la formación de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero	53
8.1.1. Preparación de eritrocitos tratados con neuraminidasa	53
8.1.2. Absorción de anticuerpos heterófilos del suero de ternera fetal	53
8.1.3. Detección de linfocitos formadores - de rosetas con eritrocitos de carne- ro	53
8.2. Detección de linfocitos B por marcaje de - inmunoglobulinas de superficie (IgS).....	54

8.3. Detección de monocitos mediante tinción para esterasas no específicas	54
8.3.1. Reactivos	54
8.3.2. Tinción	55
9. Depleción de monocitos	55
10. Obtención de poblaciones enriquecidas de linfocitos B y T por técnica de rosetas.....	56
11. Precultivos	57
12. Irradiación de linfocitos T	57
13. Cocultivos	57
14. Producción de inmunoglobulinas por linfocitos en cultivos estimulados con PWM	58
14.1. Técnica de detección de células sintetizadoras de inmunoglobulinas	58
14.2. Medida de las inmunoglobulinas secretadas al sobrenadante por un RIA.....	59
14.2.1. Obtención de la proteína	59
14.2.2. Marcado de la proteína	60
14.2.3. Antiinmunoglobulinas	61
14.2.4. Obtención del suero de conejo	61
14.2.5. Aislamiento de gammaglobulina a partir del suero de conejo	61
14.2.6. Inmunización de la cabra y obtención del antisuero de conejo	62
14.2.7. Procedimientos	63
15. Medida de la viabilidad celular	64

RESULTADOS

1. Efecto de los glucocorticoides sobre la proliferación de linfocitos sanguíneos estimulados con mitógenos	65
---	----

2. Acción de los glucocorticoides sobre la producción de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos sanguíneos estimulados con PWM	69
3. Efecto de la hidrocortisona sobre la cantidad de células productoras de inmunoglobulinas	74
4. Cinética del efecto	76
5. Estudio del efecto de la hidrocortisona sobre la producción de inmunoglobulinas según el momento de adición de la misma al cultivo	78
6. Efecto de los glucocorticoides sobre cultivos de linfocitos de amígdala estimulados con PWM	78
7. Efecto de la hidrocortisona sobre la producción de inmunoglobulinas de cultivos de mezclas de poblaciones enriquecidas en linfocitos B y T de sangre y amígdala estimulados con PWM	83
8. Acción de la hidrocortisona sobre poblaciones linfocitarias enriquecidas	85
9. Regulación de la producción de inmunoglobulinas de una cantidad constante de linfocitos B mediante la adición de cantidades crecientes de linfocitos T en cultivos estimulados con PWM; efecto de la hidrocortisona	88
10. Comparación del efecto de la hidrocortisona y la irradiación de linfocitos T sobre la producción de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos estimulados con PWM	99
11. Efecto de los glucocorticoides sobre la actividad reguladora de linfocitos T pretratados con Con A en la producción de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos estimulados con PWM	101

12. Efecto de la disminución de células ENE positivas (monocitos) sobre la acción de los glucocorticoides sobre la producción de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos estimulados con PWM	104
<u>DISCUSION</u>	108
<u>CONCLUSIONES</u>	129
<u>RESUMEN</u>	131
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	133

ABREVIATURAS

BBS-BSA: Buffer borato salino-albúmina sérica bovina

Con A: Concanavalina A

HCO : Hidrocortisona

LPS: Lipopolisacarido de S. Tifosa

M : Moles

PHA: Fitohemaglutinina

POPOF: 2-2'-p-fenil bis (5-feniloxazol)

PPD : proteina purificada derivada de M. Tuberculosa

PPO: 2-5 difeniloxazol

PR: Prednisona

PWM: mitógeno pokeweed

Relación B/T: Relación entre linfocitos B y linfocitos T en un cultivo.

RIA: Radioinmunoanálisis

T-dependiente: dependiente de linfocitos T

T-independiente: independiente de linfocitos T

Timidina -³H: Timidina Tritiada

T_G : Linfocitos T con receptor para el fragmento Fc de la IgG

T_M : Linfocitos T con receptor para el fragmento Fc de la IgM

INTRODUCCION

1.- ALGUNOS CONCEPTOS BASICOS

La respuesta inmune puede definirse como la reacción que desarrolla un animal ante la entrada de sustancias - extrañas, y que tiene como fin la eliminación de estas últimas y por tanto, la preservación de la identidad del - animal.

Dos características inherentes a esta respuesta de defensiva del organismo son las de ser específica y la de - poseer memoria (ROITT, I. 1971).

La base anatómica de la respuesta inmune es el sistema inmune, y la base celular de la misma es el linfocito en sus diferentes subclases (GOWANS, J.L. y MCGREGOR, D.D. 1965).

El sistema inmune se organiza jerárquicamente en órganos primarios y secundarios, relacionados entre sí y - con los tejidos mediante la circulación sanguínea y linfática.

Los órganos primarios son el timo y la bursa u órgano bursa-equivalente de los mamíferos, que muy posiblemente se encuentre en la médula ósea. La misión de estos órganos es la de servir de lugar de maduración de los linfocitos - haciéndolos pasar de células precursoras a linfocitos - competentes en la respuesta inmune. Este efecto parece requerir por una parte un microambiente adecuado y por otra de sustancias inductoras (hormonas u hormonas-like). De - ambas cosas se surten los linfocitos precursores en estos órganos (GOLUB, E.S. 1977a). Los linfocitos así inducidos - se denominan T o B según hayan sido procesados en el timo o la bursa u órgano bursa-equivalente respectivamente (ROITT, I. GREAVES, M.F., TORRIGIANI, G., BROSTOFF, J., y PLAYFAIR, J.H.L., 1969).

En los órganos secundarios (bazo, ganglios y tejido linfoide asociado al tubo digestivo, vías respiratorias y vías genito-uritarias), los linfocitos ya competentes para la respuesta inmune, son almacenados, y tras el contacto con el antígeno adecuado sufren los cambios madurativos necesarios para ejercer sus funciones de defensa. En estos órganos, los linfocitos B y T se distribuyen en zonas precisas denominadas B-dependientes y T-dependientes respectivamente (GREAVES, M.F., OWEN, J.J.T., y RAFF, M.C. 1973b).

La respuesta inmune se ha clasificado en humoral y celular dependiendo de que los efectos de la misma sean transferibles del animal que los crea a otro animal virgen, por suero o por linfocitos respectivamente. Esta clasificación, aunque arbitraria en algunos aspectos, se corresponde con las dos clases fundamentales de linfocitos existentes. Así los linfocitos B se encargan de la producción de los agentes responsables de la respuesta humoral (los anticuerpos), mientras que los linfocitos T son las células que intervienen en los mecanismos que, agrupados, constituyen la respuesta celular (reacción de hipersensibilidad retardada, reacción de injerto contra huésped, reacción de cultivo mixto, reacciones citotóxicas) (GREAVES, M.F. OWEN, J.J.T, y RAFF, M.C. 1973a).

Aunque los linfocitos B y T son las células gestoras de la respuesta inmune, otra serie de células y de sustancias intervienen en la misma (macrófagos, polimorfonucleares, sistema del complemento, sistema de la coagulación, sistema de la kalicreína, etc.).

Esta intervención se da por un lado en la generación de las señales que son necesarias para la activación de los linfocitos efectoras, y por otro como células-diana y posteriormente efectoras de los mecanismos que los linfocitos engendran tras su activación.

La diferencia entre los linfocitos y el resto de las células que intervienen en la respuesta inmune, es que es - en aquellos, en los que reside la especificidad y la memoria de dicha respuesta, mientras que éstas cooperan de forma - inespecífica a la misma.

2.- COOPERACION CELULAR

Al estudiar los mecanismos íntimos de los distintos procesos efectoros de la respuesta inmune surge un nuevo concepto: el de la cooperación celular. Con este concepto se pretende englobar las interacciones celulares que se requieren para la elaboración de un efecto de los que componen la respuesta inmune. Se conoce hoy que al menos se requieren cuatro células para el funcionamiento de un sistema efector:

1º) Célula efectora: es un linfocito que es el encargado de ejercer la función final del sistema. Esta célula ha de tener un receptor específico para el antígeno.

2º) Célula cooperadora: es un linfocito T que ejerce una acción positiva sobre el linfocito efector. Sin la participación de esta célula el sistema no funciona en casi ningún caso. El linfocito T cooperador reconoce mediante un receptor específico al antígeno, aunque por un lugar diferente al que es reconocido por la célula efectora.

3º) Célula supresora: es un linfocito T que ejerce una acción negativa sobre el sistema, sirviendo así de freno del mismo. Su reconocimiento del antígeno es también específico.

4º) Macrófago: su función no está absolutamente aclarada, pero se sabe que participa en él como célula accesoria y de forma no específica.

Este esquema general es aplicable a gran cantidad, si no a todos, los sistemas efectoros (GOLUB, E.S. 1977a). Es

a este nivel, en donde se ejercen la mayor parte de los mecanismos reguladores de la respuesta inmune. Es por ello - que el estudio de estos fenómenos sea actualmente el centro de atención de gran cantidad de investigadores.

3.- REGULACION DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS EN RATON

La producción de anticuerpos es uno de los múltiples efectos de la respuesta inmune contra una sustancia extraña. Este efecto es de incuestionable importancia, y su utilidad en la eliminación de los antígenos es indudable. Los anticuerpos son producidos por la población de linfocitos B. Un - clon determinado de linfocitos B se caracteriza por poseer - en su membrana receptores capaces de acoplarse a un determinante antigénico. Es conocido desde hace tiempo que estos - linfocitos poseen inmunoglobulinas de superficie (MOLLER, G. 1961).

Aunque no hay una demostración directa, se acepta que esta inmunoglobulina es el receptor para el determinante - antigénico con el que reacciona cada clon.

Tras la activación, el linfocito B sufre una serie de transformaciones que dan lugar a la célula plasmática, célula terminal de la serie, absolutamente especializada en la producción de anticuerpos.

El conocimiento más exacto de los mecanismo que intervienen en la producción de anticuerpos, se ha obtenido en - animales de experimentación, y fundamentalmente en el ratón. En estos animales se ha comprobado que los linfocitos B, por si mismos, sólo pueden formar anticuerpos para una minoría - de antígenos (antígenos timo-independientes). Para la producción de anticuerpos contra la mayoría de los antígenos (antígenos timo-dependientes), se requiere la presencia de linfo

citos T (MILLER, J.F.A.P., y MITCHELL, G.F. 1968) y macrófagos (MOSIER., D.E. 1967) . Estos hechos indican que para que exista producción de anticuerpos, es necesaria la cooperación celular entre linfocitos B, T y macrófago.

Los linfocitos T que participan en este mecanismo, tienen que reconocer al antígeno mediante un receptor específico, pero por una zona (determinante carrier), que es distinta de la reconocida por el linfocito B (determinante - hapteno) (MITCHINSON, N.A. 1971), (RAFF, M.C. 1970). Este linfocito T se denomina cooperador y en el ratón puede ser fácilmente identificado por poseer una antígeno de membrana definido (L y 1) (CANTOR, H., y BOYSE, E.A. 1977).

Los mecanismos íntimos que actúan en la cooperación celular se encuentran aún en discusión. Para explicar como el linfocito T cooperador interactúa con el linfocito B existen dos teorías fundamentales. Según la primera de ellas, la señal cooperadora es transmitida por el linfocito T al B mediante el contacto celular. Esta teoría está basada en que en algunos sistemas experimentales es necesario que la célula efectora y la cooperadora sean singénicas en la región I del complejo H_2 . Se especula con que productos de la región I actúen como reguladores de la interacción celular, cuando se produzca el contacto celular obligado por el reconocimiento de porciones diferentes del antígeno que actuaría de puente (KATZ, D.H. DORF, M.E., y BENACERRAF, B. 1974).

La segunda teoría para explicar estos hechos es la del factor soluble. Según esta teoría la segunda señal requerida para que el linfocito B se active, proviene de un factor soluble formado por el linfocito T. Existen varios modelos que cumplen el enunciado de esta teoría. Cada uno de ellos se basa en el aislamiento de factores solubles, con características diferentes (Tabla I) de un modelo a otro, que pueden sustituir

la función del linfocito T cooperador de la activación del linfocitos B (TAUSSING, M. 1974), (ARMERDING, D., SACHS, D.H., y KATZ, D.H., 1974), (FELDMANN, M. 1972).

TABLA I

ALGUNAS CARACTERISTICAS DE FACTORES SOLUBLES QUE EJERCEN LA ACCION T- COOPERADORA.-

	AEF	IgT	Ia
Producido por linf. T	Si	Si	Si
Específico para Ag.	No	Si	Si
Naturaleza	H-2 (I)	Ig	H-2 (IA)
Se une a Ag	No	Si	Si

El papel del macrófago en estos mecanismos es indudable. Experimentos realizados in vivo e in vitro así lo sugieren (UNANUE, E. E. 1972). El mecanismo por el que estas células actúan es desconocido, aunque es posible que sea por uno o varios de los procesos siguientes: procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos, elaboración de factores solubles que intervienen en la activación, o proporcionamiento de factores nutricionales.

Simultáneamente a estos descubrimientos, se describe la existencia de linfocitos T capaces de ejercer un efecto supresor sobre el complejo Linfocito T cooperador -linfocito B, y por tanto sobre la producción de anticuerpos. Por ejercer esta función a estos linfocitos T se les denomina supresores (GERSHON, R.K. 1974). Estos linfocitos se distinguen por tener en su membrana los antígenos L y 2, 3 e Ia (CANTOR, H., y cols.1977). Los linfocitos T supresores parecen actuar sobre los linfocitos T cooperadores para realizar su función. La supresión se realiza de forma específica, y ha podido aislarse un factor soluble que ejerce la función (TAKEMORI, T., y TADA, T. 1975).

Por lo tanto el sistema de producción de anticuerpos consta de un célula efectora (linfocito B), una célula auxiliar (macrófago), y dos células reguladoras que ejercen funciones de estímulo y freno del sistema (linfocito T cooperador y T supresor respectivamente). Recientemente se han descrito circuitos de retroalimentación de estas células reguladoras con un linfocito T caracterizado por poseer los antígenos de membrana L y 1,2,3. Estas células pueden proveer señales para aumentar o disminuir una u otra rama de las células reguladoras (EARDLEY, D.D., HUGEMBERGER, J., McDAY-BOUDREAU, L., SHEM, F.W., GERSHON, R.K., y CANTOR, H., 1978), (CANTOR, H., McDAY-BOUDREAU, L., HUGEMBERGER, J., NAIDORF, N., SHEN, F.W. y GERSHON, R.K. 1978).

Todos estos hechos muestran que la producción de anticuerpos es una función sobre la que existe un control y regulación estrictos. Aunque algunos de estos mecanismos reguladores son ya conocidos, queda una gran parte de ellos por aclarar.

4.- MARCADORES DE LINFOCITOS HUMANOS

Los linfocitos humanos pueden diferenciarse por la presencia en su membrana de receptores, que pueden ser utilizados como marcadores de las diversas subpoblaciones (Tabla 2).

TABLA 2

MARCADORES DE LINFOCITOS Y MONOCITOS HUMANOS

	Receptor para eritrocito de carnero	Ig de superficie	Ig intracito plasmática	Fagocitosis
Linfocito T	+	-	-	-
Linfocito B	-	+	-	-
Cel. Plasmática	-	-	+	-
Monocito	-	-	-	+

Los linfocitos T tienen receptores para eritrocitos de carnero. Este hecho puede evidenciarse por una técnica de rosetas, y se ha demostrado como un método excelente para marcar a estos linfocitos en la especie humana (FROLAND, S.S. - 1972).

Los linfocitos B se caracterizan por poseer inmunoglobulinas en su superficie, que pueden ser detectadas, haciendo reaccionar a estos linfocitos con un suero antiinmunoglobulina al que se le adiciona algún marcador. Este hecho se ha demostrado en linfocitos B humanos, y de otras especies - (MOLLER, G., 1961).

Tras la activación los linfocitos B se transforman en células plasmáticas, las cuales, carecen de inmunoglobulinas en la membrana, pero la poseen en gran cantidad dentro del citoplasma, pudiendo ser detectadas en este compartimento por técnicas parecidas.

Los monocitos pueden diferenciarse de los linfocitos por su capacidad de fagocitar (DE VRIES, G., LA FEBER, J.M., VANDER WEIS, J.P., VAN BUIJSEN, A.G., LEIJH, P.C.J., y CATS, A. 1980), y su tinción para esterasas no específicas (KOSKI, I.R., POPLACK, D.G., y BLEASE, R.M., 1976).

Recientemente se han descrito marcadores capaces de delimitar subpoblaciones funcionales de linfocitos T humanos.

Una parte de los linfocitos T poseen receptores para la porción Fc de la IgM (Tm), y otros para la misma porción de la IgG, (TG). Se han presentado experimentos que apoyan el que los linfocitos Tm tengan función cooperadora, y los linfocitos TG supresora (MORETA, L., WEBB, S.R., GROSSI, C.E., LIDYARD, P., M., COOPER, M.D. 1977).

También por medio de anticuerpos monoclonales conseguidos en hibridomas, parecen distinguirse diferentes subpoblaciones funcionales (cooperadora y supresora) de linfocitos T humanos (THOMAS, Y., SOSMAN, J., IRIGOYEN, O., FRIEDMAN, F.M., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., y CHESS, D., 1980).

Sin embargo, es difícil en la actualidad poder admitir estos últimos hallazgos como absolutamente ciertos y comparables a lo que los antígenos L y 1, 2 y 3 significan en ratón.

5.- REGULACION DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS -
POR LINFOCITOS HUMANOS.

El estudio de la producción de anticuerpos por linfocitos humanos en respuesta específica a un antígeno, se ha encontrado con numerosos obstáculos.

Aparte de los problemas experimentales obvios, hay dificultad de encontrar sistemas in vitro que sirvan de ensayo de este mecanismo efector.

El ensayo de las placas hemolíticas, como medio de detectar linfocitos B productores de anticuerpos específicos en ratón y otras especies, ha supuesto un avance capital en este campo (JERNE, N, K., y NORDIN, A.A., 1963). Gracias a esta técnica, ha sido posible el desarrollo que se ha descrito hasta el momento, en el estudio de este mecanismo efector. La adaptación de esta técnica para la puesta de manifiesto de células humanas productoras de anticuerpos específicos, ha contado con gran número de intentos. Sin embargo, sólo algunos investigadores han conseguido resultados positivos (FAUCI, A. y PRATT, K., 1976a), (DOSCH, H.M, y GELFAND, E.W., 1976), (DEL FRAISSY, J.F., GALANAUD, P., DERMONT, J., y WALLON, C. 1977), (LUZZATI, A.L., TAUSSING, M.J., MED, T., y PERNIS, B. 1976). La inasequibilidad de este método, así como la cuestionada repetibilidad del mismo, pueden deberse a los requisitos técnicos del método (BALLIEUX, R.E., HEISNEN, C.J., VITDEHAAG, F., y ZEGERS, B.J.M. 1979).

En estos trabajos han podido comprobarse grandes similitudes entre lo descrito para otras especies y los hallazgos -

en ellos expuestos. Así se ha mostrado la absoluta necesidad de la cooperación con linfocitos T cooperadores para la producción de anticuerpos específicos para los antígenos estudiados (BALLIEUX, R.E. y cols. 1979), (GALANAUD, P., 1979), (DOSCH, H.M., y GELFAND, E., 1979), (GEHA, R.S., 1979). También y por iguales mecanismos a los descritos en ratón se encuentra esta respuesta regulada por linfocitos T supresores específicos (BALLIEUX, R.E. y cols. 1979), (DOSCH, H., M., y cols. 1979), (GEHA, R.S. 1979). Para ambos mecanismos se han podido encontrar factores solubles (BALLIEUX, R.E. y cols. 1979), (GALANAUD, P. 1979), (GEHA, R.S. 1979).

El uso de técnicas de detección de células productoras de anticuerpos específicos en humanos, así como métodos aseguibles de obtención de subpoblaciones funcionales de linfocitos T, permitirá el conocimiento más profundo de este proceso efector.

6.- LOS MITOGENOS EN EL ESTUDIO DE LA FUNCION DE LOS LINFOCITOS.

Desde hace unos veinte años se conoce la existencia de algunas sustancias, que añadidas en cultivos de linfocitos son capaces de producir fenómenos similares a los que normalmente ocurren en estas células, tras su activación por el antígeno.

Estas sustancias, cuyo efecto mas notorio sobre los linfocitos es el de provocar la mitosis y la transformación blástica, son denominadas por ello mitógenos.

Los mitógenos se diferencian de los antígenos en dos hechos sustanciales: por un lado provocan la activación de gran cantidad de clones de linfocitos, siendo por tanto de carácter inespecífico; en segundo lugar los linfocitos no adquieren memoria tras el contacto con los mitógenos. Dado estos hechos,

los mitógenos difieren básicamente en la respuesta que desarrollan, de la desencadenada por los antígenos. Por estos hechos los mitógenos son también denominados activadores policlonales.

No obstante estas diferencias, la estimulación por mitógenos es sensiblemente parecida a la producida por antígenos, y han sido usados por ello, como medios de estudio de la misma en gran cantidad de aspectos, tanto en animales como en el hombre.

En este sentido, los mitógenos tienen una ventaja sobre los antígenos, y es que al ser activadores policlonales, las respuestas por ellos desencadenada, son cuantitativamente mayores, ofreciendo esto facilidades obvias para los métodos de ensayo. Esto tiene especial relevancia en los estudios en linfocitos humanos, ya que facilitan enormemente los diseños experimentales que, de otra forma, no serían posibles.

La desventaja que ofrece el uso de los mitógenos, es que, necesariamente, las correlaciones entre respuesta específica y activación policlonal, han de hacerse con suma cautela.

A pesar de ello, el trabajo realizado en este tiempo con estas sustancias, ha creado un cuerpo de evidencias suficientes, como para adoptarlos como métodos válidos de investigación sobre las funciones de los linfocitos.

En líneas generales, los mitógenos más conocidos dan lugar a la activación de los linfocitos. la cual puede seguirse secuencialmente según el tiempo transcurrido por diferentes fenómenos. (Tabla 3)



TABLA 3

EVENTOS QUE OCURREN TRAS LA ACTIVACION DE LINFOCITOS POR MITOGENOS.

	0-36h.	36-96h.	96-108h.
Linfocitos T	Síntesis RNA, proteínas, linfoquinas	Transformación blástica, síntesis DNA	Células cit tóxicas
Linfocitos B		Producción de anticuer pos.	

En las primeras 24 horas puede detectarse síntesis de RNA y posteriormente de proteínas. Entre éstas, unas de interés especial son las linfoquinas.

Entre los días 3 y 4 puede observarse la aparición en el cultivo de gran cantidad de células blásticas, así como un pico de síntesis de DNA, hecho que puede revelarse añadiendo al cultivo timidina tritiada, y midiendo tras un cierto tiempo la incorporación de dicha sustancia en el DNA de las células. En los días 5-7 se comprueba el paso de linfocitos B a células plasmáticas, y la aparición de linfocitos T citotóxicos (OPPENHEIM, J. J., y ROSENSTREICH, D.L., 1976).

Los mitógenos aunque pueden unirse en igual cantidad a todos los linfocitos, no los activan de forma homogénea. De ahí, que se les pueda clasificar en relación a las subpoblaciones -

linfocitarias que activan en cada caso.

Una lista de los más importantes mitógenos se ofrece en la tabla 4.

TABLA 4

Mitógenos	Linfócitos T	Linfocitos B
Lectinas		
PHA	+	-
Con A	+	-
PWM	+	+
Productos bacterianos		
LPS	-	+
PPD	-	+

Estas sustancias se unen a la membrana de los linfocitos por receptores específicos. La unión de la fitohemaglutinina - (PHA) puede ser inhibida adicionando el medio N-acetil-D galactosamina, y la concanavalina A, con metil-D monósido o piranósido. Estas inhibiciones de la unión del mitógeno a las células se corresponden con una inhibición de la activación. Parece por tanto que estas moléculas compiten con el mitógeno por el receptor celular (FISHER, D.B., y MUELLER, G.C. 1969), (POWELL, A.E

y LEON, M., 1970)].

Aunque los linfocitos poseen gran número de sitios de unión para estas sustancias (MOLLER, G., ANDERSSON, J., POHLIT, H., y SJOBERG, O. 1973), no es necesaria la saturación de los mismos para una óptima activación. Así, el número de sitios de unión que necesitan reaccionar para la máxima activación de los linfocitos, se estima que es de un 3% para la PHA, y del 15% al 25% para la Con A (ALLAN, D., y CRUMPTON, M.J. 1973).

La saturación en los sitios de unión no lleva a más activación, sino que, por el contrario, puede observarse una disminución de la misma. Este hecho se relaciona a la existencia de diferentes receptores celulares, que serían activados por diversos grados de saturación del mitógeno. Hay evidencias de que, al menos para la PHA, ocurre así (ALLAND, D., y cols. 1973). El resto de los mitógenos también parecen actuar a través de la unión a receptores específicos existentes en la membrana de los linfocitos, aunque sus características son peor conocidas.

El tratamiento de la superficie celular con enzimas, ha sido un medio para analizar la interacción mitógeno-receptor. La tripsina inhibe la activación de linfocitos por Con A y PHA; no obstante, si el mitógeno era mantenido suficiente tiempo en el cultivo, se producía la activación, como expresión, probablemente, de la resintetización de los receptores (LIDHAL-KIESLING, K., y PETERSON., R.D.A. 1969), (PAULI, R.M., SALLE, L. DE, HIGGINS, P., HENDERSON, E., NOAIN, A., y STRAUSS, B., 1973). El tratamiento con nueraminidasa, el cual "pela" la superficie celular de ácido siálico, produce un aumento de la activación por Con A y PWM (HAN, T., 1973). Sustancias reductoras como la L-cisteína, glutatión, y tiosulfito, provocan un aumento de la respuesta a PHA. (FANGER, M.W., HART, D.A., WELLS, J.V., y NISONOFF, A., 1970):

Todo este conjunto de hechos parecen indicar, que la activación de los linfocitos por mitógenos, depende de la interacción en la superficie de estas células de las sustancias estimuladoras con receptores específicos. La demostración de que PHA y Con A unidas a bolas de sefarosa u a otras superficies inertes pueden activar a los linfocitos, vienen a confirmar esta hipótesis. (GREAVES, M.F., y BAUMINGER, S., 1972), (ANDERSSON, J., EDELMAN, G.M., MOLLER, G. y SOBERG, O., 1972).

Se ha podido determinar el tamaño de la población de linfocitos activados por algunos mitógenos: solo el 11%-26% lo son por PHA, y el 29%-46% por Con A. También ha podido verse que no son las mismas poblaciones las estimuladas por uno y otro activador. (JONES, G. 1973).

La PHA y la Con A, en estado soluble, no estimulan a poblaciones purificadas de linfocitos B, y si de linfocitos T. Esto parece sugerir que estas sustancias estimulan específicamente a los linfocitos T. Sin embargo, al final del cultivo de poblaciones mixtas, pueden observarse células de la serie B transformadas. Esta estimulación parece T-dependiente (ROSENSTREINCH, D.L., NOWOTNY, A., CHUSED, T., y MERGENHAGEN, S.E., 1973), (JANOSSY, G., GREAVES, M.F., DOENHOFF, M.J., y SNAJAR, J. 1973).

Otros mitógenos (LPS, PPD), se muestran ineficaces para activar poblaciones purificadas de linfocitos T, estimulando sin embargo poblaciones B. En este caso, el fenómeno activador parece ser claramente restrictivo, no encontrándose en cultivos de poblaciones mixtas estimuladas, células transformadas de la serie T. Por este motivo se denominan a estas sustancias como mitógenos B o T-independientes. La característica estructural común a todas ellas de poseer determinantes repetidos sobre una base rígida, ha hecho pensar, que este esquema molecular sea el requisito para la activación de los linfocitos B. Esto

vendría apoyado por el hecho de que, tanto la PHA como ConA, conocidos mitógenos T, pueden estimular a linfocitos B, - cuando se les une a sefarosa o plástico, que les hacen remedar la estructura descrita. La acción de estos mitógenos ha sido bien establecida para linfocitos B de animales, pero - se han encontrado mayores dificultades para demostrar efectos similares sobre linfocitos B humanos (ROSENSTREINCH, D.L. y cols. 1973), (JANOSSY, G. y cols. 1973), (PEAVY, D.L., - ADLER, W.H., y SMITH, R.T., 1970), (SULTZER, B.M., y NILSSON, B. 1972).

No hay dudas en cuanto la necesidad de la presencia de los monocitos para que se produzca la respuesta a los mitógenos T (LEVIS, W.R., y ROBBINS, J.H. 1970). Este mismo punto es difícil de aclarar para los mitógenos B, dada la difícildad de obtener poblaciones de linfocitos B sin contaminación de monocitos. No obstante, parece que la acción de estas sustancias son mas independientes de la presencia de monocitos (YOSHINAGA, M., YOSHINAGA, A., y WAKSMAN, B.H. 1972).

7.- EL MITOGENO PWM

Tiene especial interés el estudio de los efectos activadores del PWM. Este mitógeno se extrae de las raíces de Phytolacca Americana. Se ha comprobado en gran variedad de especies incluida la humana, que es capaz de estimular tanto a linfocitos B como T. Al final del cultivo puede apreciarse que el 25% de los linfocitos transformados poseen características B (células plasmocitoides) (GREAVES, M., JANOSSY, G. y DOENHOFF, M., 1974), (JANOSSY, G., y GREAVES, M.F., 1971).

Mediante una serie de experimentos, ha podido comprobase el efecto de PWM sobre poblaciones T purificadas (JANOSSY, G., SHOHAT, M., GREAVES, M.F., t DOURMASHKIN, R.R. 1973). Sin

embargo, más difícil es establecer si PWM puede estimular a poblaciones B purificadas. A este respecto, la mayoría de los autores apuntan la necesidad de, al menos, pequeñas cantidades de linfocitos T para que la activación se produzca. (WATSON, J., EPSTEIN, R., NAKOINZ, I., y RALPH, P. 1973).

En contraste con la PHA y Con A, poco es conocido acerca del receptor específico celular, y el mecanismo de activación del PWM. Recientemente se ha informado, que el PWM está integrado por 5 proteínas, 4 de las cuales son - mitógenos T, y 1 mitógeno B (WAXDAL, M.J. 1974).

Transcurrido un periodo de 4 días tras la estimulación de un cultivo de linfocitos con PWM mantenido en condiciones apropiadas, puede detectarse un pico de actividad de - síntesis de DNA en las células. Esto puede apreciarse por la toma por las células de Timidina-³H. A partir del 5º día de cultivo y con un máximo hacia el 7º - 8º día, se detecta la aparición de gran cantidad de linfocitos B transformados. - Esta última actividad puede medirse por una serie de técnicas encaminadas a detectar bien la presencia de fases celulares - maduras de la serie B (células plasmáticas o plasmocitoides), bien la cantidad de inmunoglobulinas producidas por las mismas. El primer objetivo puede ponerse de manifiesto, si al - final del cultivo se cuentan la cantidad de células que poseen características de células plasmáticas; es decir cuantificando las células que poseen gran cantidad de inmunoglobulinas en su citoplasma, hecho que puede detectarse por una variedad de técnicas, siendo la más común la tinción con suero antiinmuno - globulinas fluoresceinado. El segundo objetivo puede cubrirse con una serie de técnicas como la cuantificación de las inmuno globulinas liberadas al sobrenadante por radioinmunoensayo - (RIA), enzima inmuno análisis (ELISA), o por un sistema de pla - cas hemolíticas (MORETTA, L. y cols. 1977), (PLATTS -MILLS F.A E., e ISHIZAKA, K, 1975), (WASSERMAN, J., VON STEDINGK, L.V.,

BIBERFELD, G. y PERTINI, B. 1979), (ROITT, I. 1971), (FAUCI, A. y cols 1976a).

Por estas técnicas se ha podido ver la activación por PWM de una gran cantidad de clones diferentes de linfocitos B. (PLATTS-MILLS, T.A.E. y cols 1975).

Este sistema tiene un gran interés en la experimentación de la producción de anticuerpos en el ser humano. Esto se debe a que es un método adecuado para ensayar esta actividad efectora, en proporciones detectables.

La diferenciación de linfocitos B tras estímulo por PWM en el hombre, es claramente T-dependiente (KEIGHTLEY, R. G., COOPER, M.D., y LAWTON. A.R. 1976), (HIRANO, T., KURITANI, T., KISHIMOTO, T., y YAMAMURA, Y. 1977), (SAXON, A.R., STEVENS, H., y ASHMAN, R.F. 1977), (FAUCI, A.S. PRATT, K.R.K., y WHALEN, G., 1976). Esta acción cooperadora de los linfocitos T puede ser suplantada por factores solubles provenientes de estas células (HIRATO, T. y cols, 1977), (INSEL, R.A., y MERLER, E. - 1977), (FAUCI, A.S., y cols. 1976).

No hay acuerdo acerca de si este sistema requiere la presencia de monocitos. Una serie de trabajos parecen indicar la no existencia de este requerimiento para la producción de anticuerpos inducida por PWM (SAXON, A.R., y cols. 1977), (FAUCI, A. S., y cols. 1976), (JANOSSY, G., GREAVES, M., 1975). Sin embargo en estos trabajos se usan técnicas que no consiguen una depleción total de estas células. Por lo tanto, los resultados obtenidos pueden estar mediados por pequeñas contaminaciones de monocitos que permanecen en las preparaciones celulares. Con técnicas más perfeccionadas que consiguen suspensiones celulares en las que restan tan solo 0'2% de monocitos, se ha detectado el requerimiento de estas células para el funcionamiento del sistema (BLEASE, R.M., LAWRENCE, E.C., y POPLACK, D.G. 1977), (KNAPP, W., y BAUMGARTEN, G. 1978).

Recientemente usando técnicas de depleción de monocitos,

y al mismo tiempo condiciones de cultivo de baja densidad celular como medio de obstaculizar la actividad de la población monocítica restante, se han obtenido resultados, que indican también que estas células son requeridas en el sistema. Esto era comprobado además, adicionando poblaciones enriquecidas en monocitos, a poblaciones de linfocitos previamente deplecionados de los mismos. Se observa que sin la adición no hay producción de anticuerpos, que sí se produce tras la adición de monocitos al cultivo (DE VRIES, G., y cols. 1980), (ROSEMBEAG, G.A., y LIPSKY, P.E. 1979). No se conoce por qué mecanismo actuarían los monocitos en el sistema.

Para observar la interacción T-B en este sistema se han tenido que obtener poblaciones enriquecidas en cada una de estas series celulares, y co-cultivar diferentes mezclas de las mismas, bien sea variando las proporciones de cada serie manteniendo la concentración celular constante, o añadiendo cantidades crecientes de una de las series, generalmente la T, a una cantidad fija de la otra serie. De esta forma se pueden obtener curvas de producción de anticuerpo, y analizar cómo varía la producción de diferentes mezclas celulares. En estos trabajos se obtiene una curva en campana, en la que el punto más bajo es la producción de la población enriquecida en linfocitos B. Cuando se van adicionando cantidades crecientes de linfocitos T, va aumentando paralelamente la producción de anticuerpos, hasta alcanzar una meseta cuando las proporciones de linfocitos B y T son similares. Esta fase de la curva es interpretada como de predominio del estímulo cooperador de los linfocitos T sobre los B. Posteriormente a esto, cuando se agregan mayor número de linfocitos T la producción de inmunoglobulinas desciende. Esto se interpreta como un predominio del estímulo negativo o supresor de los linfocitos T en el sistema (SAXON, A. R., y cols, 1977), (ASHMAN, R.S., SAXON, R., y STEVENS, R.H. 1980) (DE LA CONCHA, E.G., OLDHAM, G., WEBSTER, A.D.B., ASHERSON, G.I., y PLATTS-MILLS, T.A.E., 1977), (PLATTS-MILLS, T.A.E., OLDHAM, G., CASSIDY, J.T., WEBSTER, A.D.B., y DE LA CONCHA, E.G., 1979).

En este sistema se ha demostrado la no existencia de restricciones debidas al sistema mayor de histocompatibilidad. (ASHMAN, R.S., y cols. 1980), (LIPSKY, P.E., GINSBURG, W.W., FINKELMAN, F.D. y ZIFF, M., 1978), (DE LA CONCHA, E. G., y cols. 1977), (BROOM, P.D., DE LA CONCHA, E.G., WEBSTER, A.D.B., JANOSSY, G. y ANDERSON, G.L., 1976), (SIEGAL, F.P., SIEGAL, M. y GOOD, R.A., 1978).

Este hecho facilita grandemente la posible investigación de la interacción celular de pacientes, puesto que pueden realizarse mezclas de poblaciones linfocitarias de pacientes y sujetos sanos, sin que existan problemas debidos a la mezcla alógena. En este sistema, por tanto, se han realizado mezclas de poblaciones funcionales, con las que ha podido evaluarse en alguna extensión los defectos detectables en algunos estados patológicos.

Sobre este esquema operativo básico, se han introducido una serie de modificaciones con objeto de analizar más detenidamente los mecanismos de interacción T-B. Con estas manipulaciones experimentales, se ha pretendido fundamentalmente, conseguir poblaciones de linfocitos T portando una función específica: bien poblaciones T que transmitan a los linfocitos B señales positivas, o sea linfocitos T cooperadores, o por el contrario, poblaciones T con una actividad negativa exclusivamente, es decir linfocitos T supresores. Con esto se pretende llegar a una situación, como la ya asequible en algunos animales de experimentación, en la cual poder disponer de poblaciones puras desde el punto de vista funcional. Sin lugar a dudas, el tener esto ayudaría de forma decisiva al análisis de los fenómenos que acontecen en este sistema, y, en consecuencia, a la aplicación para el conocimiento de ciertos estados patológicos de la respuesta inmune.

Así se ha demostrado, que linfocitos T precultivados de uno a tres días con dosis mitogénicas de Con A, tienen una mayor actividad supresora, que linfocitos T mantenidos en las

mismas condiciones a excepción de la exposición a la Con A. Este efecto se pone de manifiesto en aquellas dosis de linfocitos T añadidos sobre linfocitos B, en las que se obtienen mayor producción de anticuerpos. Tras el estímulo con PWM en estas dosis, los linfocitos T tratados con Con A provocan una profunda depresión de dicha producción (SCHWARTZ, S.A. SHOU, L., GOOD, R.A. y CHOI, Y.S. 1977), (SHOU, L., - SHWARTZ, S.L., y GOOD, R.A. 1976), (GUPTA, S., SHWARTZ, S.L., y GOOD, R.A., 1979), (KRAKAUER, R.S., GLOUGH, J.D., FRANK, S.y SUNDEEN, J.T. 1979), (MORIMOTO, C., 1978). Este efecto, que ya había sido descrito en ratón (EKSTEDT, R.D., WATERFIELD, J.D., NESPOLI, L., y MOLLER, G. 1977), (DUTTON, R. W., 1973), (RICH, R.R., y PIERCE, C.W. 1973a), (RICH, R.R., y PIERCE, C.W. 1973b), es dependiente de la dosis de Con A usada; se consigue el efecto a dosis mitogénicas de Con A, y a dosis submitogénicas puede conseguirse el efecto contrario (DUTTON, R.W. 1973), (DUTTON, R.W., 1972), (DUTTON, R.W. 1976). Asimismo para que ocurra el fenomeno, han de añadirse los linfocitos pretratados al inicio del cultivo (RICH, R.R., y cols. 1973), (DUTTON, R.W., 1972). Aunque no son conocidos los mecanismos por los que actúan los linfocitos T tratados con Con A, se especula con la posibilidad de que esta población ejerza una actividad supresora, de igual manera a como esta se realiza en situaciones fisiológicas.

Por otro lado, ciertos tratamientos realizados sobre poblaciones T, conducen a estas células a tener actividades cooperadoras superiores a las ejercidas por linfocitos T normales añadidos en la misma cantidad. Tanto irradiación, como la incubación previa de estas células con mitomicina o ciclofosfamida, generan linfocitos T, que añadidos a linfocitos B y PWM, desarrollan una mayor producción de anticuerpos que la inducida por un mismo número de linfocitos T sin tratar (MORIYA, N., NAGAOKIT, T., OKUDA, N., y TANIGUCHI, N., 1979), (MORI

TO, T., BANKHURST, A.D., y WILLIAMS, R.C. 1980), (SIEGAL, F.P., y SIEGAL, M., 1977), (KISHIMOTO, S., TOMINO, S., MITSUYA, H., y FUJIWARA, H., 1979), (SAXON, A., STEVENS, R.H., y GOLDE, D., W., 1979). (LYDYARD, P.M., y HAYWARD, A.R., - 1979), (DOSCH, H., SCHUURMANA, R.K.B., y GELFAND, E.W. 1980), (FAUCI, A.S., 1979). Se piensa que estos tratamientos, considerados generalmente como lesivos, tienden a disminuir a las poblaciones supresoras en mayor extensión que a las cooperadoras, siendo ésta la explicación del fenómeno (FAUCI, A.S. 1979).

Estas manipulaciones se están usando profusamente para investigar en éste, y en otros sistemas los mecanismos de la interacción celular tanto normal como patológica. Así se han usado estas técnicas para analizar las alteraciones existentes en inmunodeficiencias (MORITO, T. y cols. 1980), (ASHMAN, R.S., y cols. 1980), (DE LA CONCHA, E.G., y cols 1977), (BROOM, P.D. y cols. 1976), (REINHERZ, E.L., RUBERNSTEIN, A., GEHA, R.S., 1979), enfermedades autoinmunes (MILLER, K.B., y SHWARTZ, R.S., 1979), (STRELKAUSKAS, A.J., CALLERY, R.T., McDOWELL, J., BOREL, Y., y SCHLOSSMAN, S.F. 1978), (KRAKAUER, R.S., y cols. 1979), - (MARIMOTO, C., 1978), y procesos linfoproliferativos (BRODER, S., EDELSON, R.L., LUTZNER, M.A., NELSON, D.L., McDERMONT, R.P., DURM, M.E., GOLDMAN, C.K., MEADE, B.D., y WALDMANN, T.A., 1976), (HOPPER, J.E., y cols. 1980), (REINHERZ, E.L., y cols. 1979), - (BRODER, S., y cols. 1978), siendo de gran utilidad en disecar el defecto existente en la respuesta humoral de estos pacientes (ASHMAN, R.S., y cols. 1980), (DE LA CONCHA, E., y cols. 1977), (BROOM, P.D., y cols 1976), (MORITO, T., y cols. 1980), (BRODER, S., y cols. 1978).

8.- PATOLOGIA DE LA INTERACCION CELULAR.

La base fisiopatológica de una extensa gama de enfermedades reside en anomalías en la respuesta inmune. Tanto en las - inmunodeficiencias como en los procesos autoinmunes se detectan profundos defectos en la respuesta de los linfocitos de estos -

pacientes a antígenos, ya sea por disminución o por exceso de la misma. Estos defectos eran entendidos como meras alteraciones cuantitativas de las funciones efectoras alteradas.

Al conocer ahora los fenómenos de interacción celular que sirven de base de la regulación de la respuesta inmune, algunos de estos conceptos pueden ser mejor entendidos como anomalías de la regulación, que como meros fallos cuantitativos. De ahí que pueda hablarse en estos procesos de la existencia de una patología de la interacción celular. En este sentido habrá que analizar si el defecto funcional, ya sea de los linfocitos B o T, que caracteriza los estados de inmunodeficiencia, es debido a un fallo de la célula efectora, o si por el contrario reside en un erróneo comportamiento de los linfocitos reguladores, bien por un exceso de su presión, o por un defecto de cooperación.

De forma parecida debe estudiarse si las exageradas respuestas apreciables en los fenómenos autoinmunes, se deben a una excesiva función de la célula efectora, o más bien a una alterada regulación de la misma, entre las que cabría invocar a un aumento de la cooperación o un descenso de la su presión.

En los últimos años se han venido detectando alteraciones de la regulación de la respuesta inmune, tanto en enfermedades autoinmunes como en inmunodeficiencias. (WALDMANN, T.A, BLAESE, R.M., BRODER, S., y KRAKAUER, R., 1978). La participación de las alteraciones de la regulación en la patogenia de estos procesos, explicaría además la frecuente coincidencia de ambos tipos de patología en un mismo enfermo, ya que en principio resulta llamativa la aparición de fenómenos autoinmunes en enfermos con déficits inmunológicos manifiestos (AMMANN, A., 1977). Por otra parte la gran frecuencia con que los enfermos mencionados desarrollan procesos linfoproliferativos, podría residir en los mismos trastornos de la regulación (TALAL, N., 1977).

Aunque el papel regulador de los linfocitos T se ejerce tanto en la respuesta humoral como en la celular, la presente revisión se va a enfocar sobre la primera de estas respuestas. La mayor parte de estos estudios sobre regulación se han realizado con el sistema de estimulación de la producción de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos a los que se añade PWM (DE LA CONCHA, E., y cols.1977), (MOLLER, G., 1979), (FAUCI, A.S., y BALLIEUX, R.E., 1979).

Entre las inmunodeficiencias, y aunque se clasifican en humorales, celulares y combinadas, es raro encontrar un caso en el que se conserve totalmente la respuesta humoral.

La clasificación en humorales o celulares, según el mecanismo patogénico predominante en cada caso, de los procesos autoinmunes, es mucho menos definida. A pesar de la intensa búsqueda experimental, no se han conseguido conclusiones terminantes, en este aspecto. Ello es debido en gran manera al hecho de que frecuentemente se asocian ambos tipos de mecanismos. Así parece que en la mayoría de las enfermedades autoinmunes hay alteraciones en la regulación de la respuesta humoral (ALLISON, A.C., 1977).

8-1 ALTERACIONES DE LA REGULACION EN INMUNODEFICIENCIAS.

8-1-1- Hipogammaglobulinemias.

La mayoría de los enfermos con hipogammaglobulinemia congénita ligada al sexo (enfermedad de Bruton) carecen de linfocitos B circulantes. En este caso, para la mayoría de los autores, parece claro que el trastorno depende de un defecto intrínseco en la maduración de las células progenitoras de la médula ósea a linfocitos B (DE LA CONCHA, E.G., y cols.1977). Sin embargo, Dosh y Gelfand en estudios recientes sostienen haber encontrado en estos enfermos linfocitos T con actividad

supresora que podrían ser responsables de este bloqueo en la diferenciación de linfocitos B (DOSH, H.M., y cols. 1979).

En las hipogammaglobulinemias primarias adquiridas, la población de linfocitos B aparece casi siempre bien conservada. Aquí por tanto, se plantea de forma mucho más clara el problema de si la falta de producción de anticuerpos es causada por un trastorno intrínseco de estos linfocitos o por alteraciones extrañas a ellos, fundamentalmente, en la regulación producida por linfocitos T.

Diversos trabajos han demostrado que en algunos enfermos existe un aumento de la capacidad supresora de estos linfocitos (WALDMANN, T.A. BRODER, S., BLAESE, R.M., DURM, M., BLACKMAN, M., y STROBER, W., 1974), (BROOM, P.D. y cols. 1976), aunque es más constante la presencia de un defecto intrínseco en los linfocitos B (DE LA CONCHA, E.G., y cols. 1977), - (WALDMANN, T.A., y BRODER, S., 1977), (SIEGAL, F.P. y cols. 1978), que indudablemente es la base del trastorno en la mayoría de los casos. En ellos las alteraciones en la función reguladora de los linfocitos T pueden ser secundarias a la presentación de la hipogammaglobulinemia como sugiere el hecho de que también se observan en la enfermedad de Bruton (SIEGAL, F.P., SIEGAL, M., y GOOD, R.A., 1976). Esto no descarta la posibilidad de que casos aislados de hipogammaglobulinemias adquiridas puedan deberse a déficit de función cooperadora de los linfocitos T o a un exceso de supresión (REINHERZ, E.L., RUBENSTEIN, A., GEHA, R.S., 1979).

8-1-2 Déficit aislado de IgA.

Esta es la inmunodeficiencia primaria más frecuente y junto con las hipogammaglobulinemias, la más estudiada. Los resultados han sido paralelos a los observados en las hipogammaglobulinemias adquiridas primarias. Poseen linfocitos B con -

IgA de superficie, no producen IgA en cultivos "in vitro" y algunos suprimen la producción de IgA por linfocitos normales. Dado que existen linfocitos T supresores que pueden actuar sobre la producción de una sola clase de inmunoglobulinas se pensó que un aumento de actividad supresora podía ser responsable de algunos de los casos (WALDMAN, T.A., y cols. 1978). Sin embargo, se ha visto que en la gran mayoría de ellos el trastorno primario parece radicar en un defecto intrínseco de los linfocitos B encargados de diferenciarse en células productoras de IgA (PLATTS-MILLS, T.A.E. y cols. 1979).

8-1-3 Otras inmunodeficiencias primarias.

Las interacciones T-B en las inmunodeficiencias celulares y combinadas han sido mucho menos estudiadas hasta la fecha. Sin embargo, parece que en un cierto número de ellos las alteraciones presentes de la respuesta humoral son consecuencia de desequilibrios en la regulación de linfocitos T.

Se han descrito casos de inmunodeficiencia combinada severa con linfocitos B presentes y capaces de producir anticuerpos "in vitro" en mezclas con linfocitos T normales. (GELFAND, E.W., y DOSH, H.M., 1979).

8-1-4 Inmunodeficiencias secundarias.

El número de procesos no inmunológicos donde secundariamente se presenta un déficit en la respuesta humoral o celular es muy amplio. Los mecanismos por los cuales esto ocurre son, en general, mal conocidos. Estudios muy recientes han demostrado, sin embargo, que en uno de ellos, la leucemia linfóide crónica, los linfocitos no son capaces de cooperar "in vitro" con linfocitos B autólogos o de sujetos normales en la producción de inmunoglobulinas (CHIORAZZI, N., FU, S.M.,

MONTAZERI, G., KUNKEL, H.E., RAJ, K., y GEE, T., 1979). Este defecto en la cooperación que por ahora sólo se ha descrito en este proceso, podría contribuir al déficit inmunológico de estos enfermos e incluso intervenir en la patogenia del proceso. (CHIORAZZI, N., FU, S.M., KUNKEL, H.G., 1979).

En otros procesos tumorales, por el contrario, parece que sería un exceso de función supresora (mediada por linfocitos T o por otro tipo de células) la responsable del déficit inmunológico secundario (WALDMAN, T.A., y cols.1978).

8-2 ALTERACIONES DE LA REGULACION EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Los trabajos sobre la patogenia de enfermedades autoinmunes son muy numerosos y apuntan como posibles causas factores genéticos, virales e inmunológicos. Posiblemente, todos estos factores pueden intervenir en mayor o menor grado según el proceso e incluso el enfermo del que se trate.

Es indudable que las alteraciones inmunológicas juegan un papel importante. El proceso donde se ha realizado estudios más completos, es el modelo experimental de autoinmunidad que aparece en híbridos de ratones negros y blancos de Nueva Zelanda (NZB/W). Estos animales desarrollan, espontáneamente una enfermedad muy similar al lupus eritematoso diseminado - con aumento de los niveles séricos de inmunoglobulinas, anticuerpos antinucleares y antilinfocitos, anemia hemolítica - Coombs positiva y glomerulonefritis por inmunocomplejos. Los estudios realizados han demostrado que estos animales pierden con la edad la capacidad supresora de los linfocitos T y como consecuencia aparecen en ellos clones de células con especificidad para autoantígenos. (WALDMAN, T.A. y cols.1978), (TALAL N., 1977). La inyección de células de animales más jóvenes, retrasa este proceso (WALDMAN, T.A. y cols.1978). También la inyección de factores solubles producidos por la estimulación de linfocitos T supresores, produce una disminución en los niveles de inmunoglobulinas séricas y en el número de autoanti

cuerpos presentes y aumenta la supervivencia de los animales (TALAL, N., 1977). Esto podría, en el futuro, orientar en el desarrollo de nuevos tratamientos de las enfermedades autoinmunes en humanos.

De los procesos observados en patología humana, el lupus eritematoso diseminado es sin duda el que ha sido motivo de estudios más exhaustivos. Se ha visto que existen alteraciones en la función tanto de linfocitos B como T. Los linfocitos B aparecen hiperactivos proliferando excesivamente y produciendo inmunoglobulinas en cultivos no estimulados (KRAKAUER, R.S., y cols. 1979). Los linfocitos T aparecen disminuidos en número, posiblemente, como consecuencia de la presencia de autoanticuerpos antilinfocitos en suero, estando afectada sobre todo la función supresora de los mismos. (KRAKAUER, R.S., y cols. 1979). Sin embargo, también se detecta en ocasiones, una disminución de la función cooperadora y de la producción de inmunoglobulinas "in vitro" en respuesta a mitógenos, tal vez, como consecuencia de la activación policlonal presente "in vivo" (FAUCI, A., STEINBERG, A.D., HAYNES, B.F., y WHALEN, G., 1978).

Las alteraciones de las interacciones entre linfocitos B y T son también evidentes. Se sabe que los linfocitos T de individuos normales proliferan "in vitro" en respuesta a células no-T autólogas. Esto es lo que ha sido llamado reacción de cultivo mixto autólogo. Esta capacidad desaparece en enfermos con lupus eritematoso diseminado (SAKANE, T., STEINBERG, A.D., y GREEN, I., 1978).

En este conjunto de alteraciones resulta muy difícil averiguar cuales son el origen y cuales consecuencia del proceso. Además, no todas están presentes en todos los enfermos e incluso en un mismo enfermo el patrón se modifica según el grado de actividad del proceso. En cualquier caso, es eviden

te una hiperactividad de los linfocitos B con fallo de la función reguladora de los linfocitos T.

Las interacciones entre linfocitos B y T juegan un papel fundamental regulando la respuesta inmunológica. Alteraciones en esta regulación aparecen, tanto en enfermos con inmunodeficiencias como con enfermedades autoinmunes. Dado que parece que las funciones cooperadora y supresora dependen de subpoblaciones distintas de linfocitos T y que ejercen su acción probablemente, mediante factores solubles producidos por esas subpoblaciones, cabe la esperanza de poder actuar sobre ellas de forma independiente. De hecho, un primer ejemplo es la mejoría clínica y la prolongación de la vida obtenida en ratones NZB/W con productos solubles obtenidos a partir de células T supresoras activadas. Este y otros trabajos permiten albergar esperanzas de poder actuar selectivamente sobre la regulación de la respuesta inmunológica, corrigiendo alteraciones que, cada día con mayor certeza, sabemos intervienen en la producción de numerosas enfermedades.

9.- GLUCOCORTICOIDES Y RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA.

El uso farmacológico de las hormonas glucocorticoideas que fisiológicamente se producen en la corteza adrenal, es hoy en día muy extendido. Tienen especial utilidad estos agentes en afecciones en las que la fisiopatología se halla relacionada con fenómenos inflamatorios o con trastornos de la respuesta inmune. Los mecanismos por los cuales estos fármacos ejercen su acción son mal conocidos a pesar del intenso trabajo clínico y experimental dedicado a ello. El conocimiento preciso de los mismos, se hace cada vez más necesario para una utilización correcta que permite aprovechar los efectos deseados y evitar terapias lesivas e impropiedades.

El desarrollo del conocimiento en el complejo campo de la inflamación y de la respuesta inmune, abre nuevas vías a

la exploración de las acciones que los glucocorticoides -
ejercen, tanto en situaciones fisiológicas como farmaco
lógicas.

9.1. ALGUNAS CARACTERISTICAS DE ESTOS COMPUESTOS:

Las características químicas de los glucocorticoides
que más intensamente afecta a los tejidos linfoides son: un
anillo A no saturado; un grupo cetona en posición 3; un O u
OH en posición 11; y un grupo C=O CH₂OH en las posiciones
29 y 21 (DOUCHERTY T.F., BERLINER, M.L., y SCHNERBELI, G.L.
1964).

Esta familia de compuestas esta integrada por sustan-
cias naturales y sintéticas. (tabla 5), que no difieren en
cuanto a su acción biológica sobre el sistema linfoide, y
solo se diferencian en su potencia relativa (SAYERS.G, y
TRAVIS, R.H., 1970).

La hidrocortisona o cortisol es la principal hormona
glucocorticosteroidea en el hombre. El nivel de cortisol en
plasma varía diariamente oscilando entre 0,04-0,2 gr/ml.
Esto equivale a una concentración de alrededor de 10⁻⁷ M.
Con dosis farmacológicas exógenas se obtienen concentracion
es del fármaco de 10⁻⁵M a 10⁻⁶M (CLAMAN, H. N., (1972).

TABLA 5

COMPARACION ENTRE GLUCOCORTICOIDES USUALES

Compuesto	Potencia equivalente mg	T1/2 Plasma min.
Cortisona	25	30
Cortisol	20	90
Prednisona	5	60
Prednisolona	5	200
Metilprednisolona	4	180
Triamcinolona	4	300
Dexametasona	0.75	200

9.2. - MODO DE ACCION

La forma como los glucocorticoides ejercen su acción es algo aún no totalmente claro.

Se admite generalmente que la respuesta tisular y celular a los glucocorticoides está mediada por la unión de la hormona a un receptor específico intracitoplasmático. El modelo propuesto para este mecanismo sería brevemente como sigue: la hormona se une a su receptor específico dentro del citoplasma formando un complejo hormona-receptor; el complejo emigraría, pudiéndose encontrar más tarde asociado al núcleo celular; esto serviría de señal para la síntesis de RNA mensajero, que sería el encargado de dirigir la síntesis de proteína como determinante último de la respuesta a la hormona. (O'MALLEY, B., W. 1971), (THOMPSON, E.B., y LIPPMAN, M.E., 1974). Este proceso puede ser, potencialmente, la forma de modulación del efecto de la hormona sobre una serie de funciones celulares, que determinarían su actividad antiinflamatoria e inmunosupresora (BAXTER, J.D., y HARRIS, A.W. 1975).

Se conoce desde hace algún tiempo la diferente sensibilidad que los linfocitos de diversas especies tienen a estos agentes. Estas diferencias se basan en la mayor o menor facilidad con la que estas hormonas provocan depleción de los órganos linfoides primarios y secundarios, así como efectos líticos sobre las células linfoides. Según estos hechos se han clasificado las especies en córtico-sensibles y córtico-resistentes (Tabla 6).

TABLA 6

SENSIBILIDAD EN VARIAS ESPECIES A LOS GLUCOCORTICOIDES

Sensibles	Resistentes
RATON	HURON
HAMSTER	COBAYA
RATA	MONO
CONEJO	HOMBRE

Así linfocitos T de rata, en los que se ha demostrado la existencia de receptores específicos, que actúan según el modelo descrito, son inhibidos y lisados por los glucocorticoides a dosis de 10^{-7} M (HALLAHAN, C., YOUNG, D.A., y MUNCK, A., 1968). Dosis superiores (10^{-5} M - 10^{-4} M) no consiguen un efecto similar sobre linfocitos humanos (CLAMAN, H. N., 1972). Estos hechos plantean problemas importantes a las extrapolaciones de hallazgos en especies de diversa sensibilidad a los glucocorticoides. No obstante es bastante posible que la reacción hormona-receptor medie muchas de las actividades de estas hormonas sobre linfocitos, y otras células de la reacción inflamatoria, en seres humanos.

La existencia de estos receptores específicos en linfocitos humanos es un hecho demostrado (NEIFELD, J.P., LIPPMAN, M.E., y TORNEY, D.C. 1977). Este hecho no explica la diferente sensibilidad de diversas subclases de linfocitos humanos, ya que los linfocitos T son más sensibles a estos agen

tes que los linfocitos B, aunque ambas series celulares - poseen el mismo número de receptores de similar afinidad y especificidad (LIPPMAN, M., y BARR, R., 1977).

Por otro lado es un hecho admitido que los nucleóti_ dos cíclicos están involucrados en una variedad de capacida- des funcionales de los linfocitos (BRAUN, W., 1974).

Es desconocida hasta el momento la relación entre glu cocorticoides y nucleotidos cíclicos, particularmente AMP - cíclico. Sin embargo, llama la atención que algunos efectos - de estas dos sustancias son similares (BAXTER, J.D., y FOR - SHAM, P. H., 1972). Los glucocorticoides además aumentan el nivel de AMP cíclico de los linfocitos (PARKER, C.W., HUBER, M.G., y BAUMANN, M.L., 1973), (MENDELSON, J., MUTLER, M. M., BOONE, R.F., 1973), y potencian esa misma actividad cuando - es producida por prostaglandinas E, o beta adrenérgicos (LEE, T.P., y REDD, C.E., 1977). Se ha demostrado también que la - biosíntesis de macromoléculas no es requerida en esta última actividad descrita, para los glucocorticoides, y el efecto - parece, parcialmente al menos, debido a una inhibición sobre la nucleotidofosfodiesterasa (LEE, T.P., y REDD, G.E. 1977).

La forma y medida en que cada uno de estos mecanismos actúan modulando las diversas funciones que conocemos en cada una de las series celulares participantes en la inflamación y en la respuesta inmune, son en la mayoría de sus aspectos des- conocidas.

9.3. ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA FUNCION DE LAS
CELULAS QUE INTERVIENEN EN LA INFLAMACION Y EN LA RES-
PUESTA INMUNE.

Quando se analizan los efectos de los glucocorticoides sobre las células de la inflamación y de la respuesta inmune, surgen dos aspectos fundamentales a destacar aunque íntimamente ligados: acción sobre el tráfico celular y sobre las funciones que ejercen estas células.

9.3.1. ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE EL
TRAFICO CELULAR.

Quizá el efecto de los glucocorticoides conocido desde hace más tiempo, es el que ejercen sobre la circulación de las células de la serie blanca entre los diversos tejidos y órganos.

Estos efectos se encuentran esquematizados en la tabla 7.

TABLA 7

EFFECTO DE LOS CORTICOIDES SOBRE EL TRAFICO DE LEUCOCITOS HUMANOS.

NEUTROFILO (neutrofilia)

- a) Salida de células de las reservas de la médula ósea.
- b) Prolongación de la vida media.
- c) Bloqueo de la migración al lugar de la inflamación

EOSINOFILOS (eosinopenia)

- a) Depleción de células de la circulación.
- b) Probablemente redistribución a otros compartimentos.

MONOCITOS (monocitopenia)

- a) Depleción de células de la circulación
- b) Probablemente redistribución a otros compartimentos.
- c) Bloqueo de la respuesta migratoria a linfoquinas

LINFOCITOS (linfopenia)

- a) Depleción de células de la circulación
- b) Depleción selectiva. Linfocitos T son más deplecionados que linfocitos no T.
- c) Redistribución a otros compartimentos, en especial a la médula ósea.

9.3.1.1 NEUTROFILOS

Tras la administración de glucocorticoides in vivo a seres humanos se ha podido observar la entrada en la circulación de neutrófilos procedentes de las reservas medulares (DALE, D.C. FAUCI, A.S., GLERRY, N.D., Y WOLF, S.M., 1975), así como la prolongación de la vida media de los mismos (ATHENS, J.W., HAAB, D.P. RAAB, S.O., MAVER, A.M., 1961). Estos hechos son los causantes de la granulocitosis si bien, no existe aún una explicación precisa para estos fenómenos.

Pero quizá el efecto más trascendente que estos fármacos ejercen sobre los neutrófilos es el de impedirles la migración al foco inflamatorio (BOGGS, D.R. ATHENS, J.W, CARTWRIGHT, G.E. y WINTROBE, M.M., 1964), (DALE, D.C., FAUCI, A.S., y WOLF, S.M., 1974).

Este fenómeno parece poder explicarse por los cambios que el fármaco produce en la capacidad de adherencia que poseen estos leucocitos. Así es conocido que en los primeros momentos de una inflamación puede observarse a los neutrófilos adheridos a la pared interna del endotelio de los capilares de la zona envuelta. (GRANT, L. 1974). Los glucocorticoides provocan un bloqueo de esta capacidad (EBERT, R.H. y BARCLAY, W.R., 1952), hecho que ha podido comprobarse al mostrar que neutrófilos provenientes de pacientes tratados con glucocorticoides, son incapaces in vitro de adherirse a la lana de nylon en columnas (MACGREGOR, R.R., SPAGNUOLO, P.J., LENTNEK, A.L., 1974).

Por otro lado se ha comprobado que neutrófilos tratados con glucocorticoides in vitro sufren una inhibición de la quimiotaxis. Este efecto parece deberse a que la droga interfiere en la interacción factor quimiotáctico-neutrófilo (WARD, P.A. 1966).

Así mismo se ha confirmado que los glucocorticoides inhiben la producción del activador del plasminógeno por parte de neutrófilos humanos. La importancia de este hecho reside en que la secreción de este enzima se relaciona con la migración celular al foco inflamatorio (GRANELLI-PIPERNO, A., VASALLI, J.D., y REICH, E., 1977).

Si se comprueba la realidad de estos efectos in vivo, serían otros mecanismos a contribuir en el bloqueo del paso de estas células al foco inflamatorio.

El bloqueo de estas células es posiblemente el mayor mecanismo antiinflamatorio de los glucocorticoides, así como el mayor obstáculo para la defensa del huésped. (O'MALLEY, B.W. 1971).

9.3.1.2. EOSINOFILOS

Los glucocorticoides actúan deplecionando el componente de eosinófilos de la circulación (THORN, G.W., 1973). Este efecto parece ser el resultado de una redistribución de las células desde la sangre a otros compartimentos (ANDERSEN, V., 1969). Se ha mostrado también que la migración de estos leucocitos al lugar donde se realiza una prueba cutánea para producir una reacción de tipo inmediato, se halla bloqueada por los glucocorticoides (ZWEIMAN, B., SLOTT, R.I., y ATKINS, P.C., 1976).

9.3.1.3 LINFOCITOS Y MONOCITOS

La administración de glucocorticoides a seres humanos produce una drástica caída del número de células mononucleares sanguíneas. Este efecto es máximo 4 a 6 horas después de la administración y revierte tras 24 horas, siendo similar en monocitos y linfocitos (FAUCI, A.S., DALE, D.C., y BALOW J.E., 1976).

Este efecto no es cuantitativamente similar para todos los linfocitos. Los linfocitos B aunque son disminuidos, lo son en un grado mucho menor que los linfocitos T. (FAUCI, A. S, y DALE, D.C., 1974), (YU, D.T.Y., CLEMENTS, P.J., PAULUS, H.E., PETER, J.B., LEVY, J. y BARNETT, E.V., 1974).

Más interesante aún es la observación de que no todas las subpoblaciones que componen la serie T en la sangre, son afectadas de la misma forma; son los linfocitos T_M más afectados que los linfocitos T_G (HAYNES, B.F., y FAUCI, A.S.1978)

Estos hallazgos in vivo pueden confirmarse por tests funcionales de los linfocitos in vitro. Tomando poblaciones celulares en el tiempo en el que se observa el máximo efecto depleccionador y probando para diversas capacidades de estas células, se encuentran los resultados que teóricamente cabría esperar por las modificaciones proporcionales que surgen en las diferentes subpoblaciones afectadas. Así funciones como la síntesis de DNA tras la adición a linfocitos de mitógenos se encuentra disminuida en poblaciones ensayadas 4 horas después de la administración de glucocorticoides. Esta función se restablece tras añadir al cultivo monocitos, disminuidos en la población tratada (FAUCI y cols.1974). También puede apreciarse el caso contrario: en poblaciones celulares 4 horas después del tratamiento se aprecia un aumento de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos; esto no es más que la expresión del aumento relativo de la población celular con receptores para el Fc de la IgG, que es la que ejerce dicha función (PARRILLO, J.E., y FAUCI, A.S.1980).

Esta bien establecido que la linfopenia inducida por los glucocorticoides no se debe a lisis o muerte celular- (CLAMAN, H.N., 1972). Mas bien parece deberse este efecto a una distribución de estas células, desde la sangre a otros órganos (FAUCI, A.S., y DALE, D.C. 1975), (FAUCI, A.S., 1975) Los linfocitos sanguíneos se distribuyen entre un compartimen

41

to celular recirculante y otro no recirculante. (YU, D.T.Y, y cols. 1974). En circunstancias normales el compartimento recirculante se encuentra libre de pasar al espacio extravascular y viceversa, de forma que se establece un equilibrio entre estos espacios uno de cuyos reflejos es el número de linfocitos existentes en sangre en cada momento. Es probablemente a expensas de este compartimento sobre el que gravitan las modificaciones transitorias que ejercen los glucocorticoides. (YU, D.T.Y. y cols 1974), (FAUCI, A.S. y DALE, D.C. 1975).

El mecanismo por el que se produce esta redistribución no está bien aclarado, pero es probable que el efecto de los glucocorticoides se produzca sobre la interacción - endotelio de la microcirculación-linfocito, hecho que parece inicial en el tráfico de estas células (FAUCI, A.S. y cols 1976). Esto puede apoyarse en que los glucocorticoides pueden alterar la función de la membrana celular (THOMPSON, E.B. y LIPPMAN, M.E. 1974), y en experimentos en animales - en los que produciendo in vitro parecidas alteraciones en la membrana celular e introduciendo estas células modificadas en animales reproducían patrones de tráfico celular. similares a los inducidos por glucocorticoides (SCHLESINGER, M., e ISRAEL E., 1974).

Se desconoce aún si el mecanismo de la redistribución se debe a un aumento de la salida o a un bloqueo de la entrada de linfocitos. Sin embargo, el hallazgo de que los glucocorticoides suprimen la linfocitosis fisiológica inducida por el - ejercicio, puede hablar en favor de la última hipótesis (YU, D.T., CLEMENST, P.J., y PEARSON, C.M., 1977).

9.3.2. ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA FUNCION CELULAR

Este aspecto de la acción de los glucocorticoides es indudablemente mas difícil de analizar. Esto se debe en parte a la difícil trasposición de modelos animales al modelo humano, y dentro de los trabajos realizados en humanos a la cautelosa interpretación que es necesario hacer de los experimentos, que obviamente se han realizado en su mayoría in vitro.

9.3.2.1. NEUTROFILOS Y EOSINOFILOS

Existen una gran cantidad de trabajos sobre el efecto que los glucocorticoides ejercen sobre la función de los neutrófilos (revisado por FAUCI, A.S. y cols. 1976). Muchas de las observaciones aportadas son conflictivas por las causas antes dichas. En general se ha reportado que tanto la fagocitosis como la capacidad bactericida se inhiben in vitro en presencia de altas dosis de glucocorticoides. El problema para aceptar estos efectos es el de asumir que estas dosis pueden ser conseguidas in vivo. Esta duda proviene de experimentos en los que en neutrófilos provenientes de donantes sanos y pacientes en el curso de tratamientos muy intensos con estas drogas, no se observaban alteraciones de la fagocitosis o de la capacidad bactericida (WEBEL, M.L. RITTS, R.E. TASWELL, A.F., DONADIO, J.V. y WOODS, J.E., 1974), (CLARKE, J.R., GAGNON, R.F., GOTCH, F.M., HEYWORTH, M.R., MACLENNAN, I. C.M., TRVELORE, S.C., y WALLER, C.A., 1977).

Los glucocorticoides in vitro parecen modular la liberación de los enzimas lisosomales de los neutrófilos, estabilizando la membrana de estos órganos (WEISSMANN, G., y THOMAS, L. 1963), e inhibiendo este mecanismo tanto en la fagocitosis

(WRIGHT, D.G., y MALAVISTA, S.E., 1973), como en la liberación de enzimas lisosomales no fagocíticas (IGNARRO, L.J., 1977). Este hecho puede tener gran importancia para explicar los efectos antiinflamatorios de estos fármacos.

Las funciones de los eosinófilos son peor conocidas que las de los neutrófilos. Esto se debe fundamentalmente a la dificultad de obtener estas células en las cantidades requeridas para estudiarlas. Esto unido a que los glucocorticoides producen eosinopenia, hace muy difícil el analizar la acción de aquellos sobre este tipo de leucocitos.

9.3.2.2. MONOCITOS Y MACROFAGOS

Las investigaciones llevadas a cabo en animales para dilucidar la acción de los glucocorticoides sobre las funciones de la serie monocito-macrófágica, arrojan resultados contradictorios en muchos aspectos. Ciertos estudios muestran que el tratamiento con glucocorticoides provoca una anormal persistencia de microorganismos fagocitados (WIENER, E., MARMARY, Y., y CURELARU, Z., 1972); trabajos realizados in vitro en ratón hablan a favor de que los glucocorticoides no influyen en la interacción fagosoma-lisosoma (VAN FURTH, R. y JONES, T.C. 1975), o sobre la fagocitosis y actividad microbicida intracelular (VAN ZWET, T.L., THOMPSON, J., VAN FURTH, R., 1975).

No existen muchos estudios sobre la acción de los glucocorticoides sobre monocitos humanos. Esto se debe en gran parte a la relativa dificultad de conseguir estas células en la cantidad deseable. No obstante parece que dosis de glucocorticoides que no afectan sensiblemente las funciones de los neutrófilos, suprimen ciertas funciones monocitarias.

tales como la actividad microbici~~da~~ (RINEHART, J.J., SAGONE, A.L., BALCERZAK, S.P., ACKERMAN, G.A., y LOBUGLIO, A. F., 1975). La respuesta a factores quimiotácticos por los macrófagos es inhibida por estos agentes por un mecanismo posiblemente similar al expuesto para el mismo efecto en neutrófilos (GALLIN, E.K., y GALLIN, J.L., 1977). Estos hechos podrian explicar la dificultad para formar granulomas, observable en enfermos en tratamiento con glucocorticoides.

En relación a la capacidad citotóxica de estas células, se ha demostrado, que macrófagos de cobaya tratados con glucocorticoides poseen una actividad disminuida en un sistema de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (HUNNINGHAKE, C.W., y FAUCI, A.S. 1977). Esto no parece deberse a una disminución de la capacidad citotóxica de estas células, sino a un bloqueo del contacto entre la célula efectora y la célula diana ejercido a nivel del receptor para el Fc de los anticuerpos que han reaccionado con esta última (ATKINSON, J.P., y FRANK, M.M., 1974).

Los corticoides suprimen la respuesta de los macrófagos a las linfoquinas (BALOW, J.E., y ROSENTHAL, A.J, 1973). Este puede ser el factor mas importante que, junto con otros, determine la dificultad para hacer respuestas de hipersensibilidad retardada durante los tratamientos glucocorticoides (CUMMINS, M.M., y HUDGINS, P.C. 1952).

9.3.2.3. LINFOCITOS

El desarrollo de la literatura sobre la acción de los glucocorticoides sobre las funciones linfocitarias es enorme, y ha sido revisada en múltiples ocasiones (CLAMAN, H.N 1972), (BAXTER, J. D., y HARRIS, A.W. 1975), (FAUCI, A.S., 1976). Se puede afirmar sin lugar a dudas que practicamente cada fase

de la función linfocitaria incluyendo la activación celular, proliferación, diferenciación, producción y liberación de mediadores, respuesta a mediadores, reconocimiento del antígeno, efecto citotóxico, receptores de membranas y algunas otras, son moduladas en mayor o menor grado por los glucocorticoides, y esto a pesar de la relativa resistencia de los linfocitos humanos a estos agentes.

Está bien establecido que in vitro se produce una inhibición de la blastogénesis en presencia de glucocorticoides (FAUCI, A.S. y cols. 1976), (YU, D.T.Y. 1977), Surge el problema de valorar este hecho en su real sentido in vivo, ya que de ocurrir como sugieren estos experimentos, la inhibición de la blastogénesis podría invocarse como un mecanismo importante para explicar los efectos supresores de los glucocorticoides . En este sentido es de sumo interés el descubrimiento de que dosis fisiológicas de glucocorticoides inhiben la reacción del cultivo mixto autólogo, sin afectar la reacción del cultivo mixto alogénico (HAHN, B.H., MACDERMONT, R.P., BURKHOLDE JACOBS, S., PLETSCHER, S., y BEALE, M. G., 1980). Esta reacción en la que linfocitos T se estimulan en presencia de linfocitos B autólogos, parece de importancia en mecanismos de autoregulación de linfocitos T, y también se relaciona con la generación de linfocitos T supresores. Parece por tanto que los glucocorticoides tendrían un papel fisiológico en estos importantes mecanismos reguladores.

Los linfocitos T citotóxicos son afectados en una serie de aspectos por los glucocorticoides, según se desprende de la investigación en animales y en el hombre.

Los linfocitos de ratones tratados con glucocorticoides, sufren una disminución del número y/o la actividad de linfocitos T citotóxicos contra células diana de tumores alogénicos (FERNANDES. G., YUNIS, E.J., GOOD, R.A., 1975).

Efectos más complejos se han reportado en estudios con linfocitos de rata; mientras que los glucocorticoides aumentaban la activación primaria de estas células en la sensibilización antigénica (STAVY, L., COHEN, I.R., y FELDMAN, M. 1974), producían una marcada supresión de la subsecuente actividad citotóxica, posiblemente gracias a un bloqueo de la activación de los mecanismos citolíticos (STAVY, L., COHEN, I.R., y FELDMAN, M., 1973).

En modelos humanos también se ha comprobado inducción de diversos efectos sobre la actividad citotóxica de linfocitos T, debidas a corticoides, Estas incluyen supresión de la liberación de linfoquinas (WILLIAMS, T.W., y GRANGER, G.A., 1969), de la citotoxicidad contra células diana infectadas por virus, (THONG, Y.H., HENSEN, S.A., VINCENT, M.M., ROLA-PLESZCZYNSKY, M., WALSER, J.B., y BELLANTI, J.A., 1975), y disminución cuantitativa del número de linfocitos citotóxicos generados contra antígenos, sin disminución de la actividad efectora de los mismo (BALOW, J.E., HUNNINGHAKE, G.W., y FAUCI, A.S., 1977). Solo muy altas dosis de glucocorticoides in vitro son capaces de inhibir la citotoxicidad creada por el receptor de un injerto de piel contra fibroblastos del donante (LUNDGREN, G., 1970).

La actividad citotóxica dependiente de anticuerpo parece bastante resistente al tratamiento con glucocorticoides en animales y en el hombre (PARRILLO, J.E. y FAUCI, A.S., 1980), (CHEDID, L., JUY, D., y BONA, C., 1974). Sin embargo la actividad citotóxica natural es suprimida por un tratamiento similar tanto in vivo como in vitro (PARRILLO, J.E., y FAUCI, A.S., 1980).

No existe acuerdo en torno a la acción de estos fármacos sobre la producción de linfoquinas por los linfocitos. Mientras algunos estudios demuestran que glucocorticoides in

vitro no afectan esta actividad tras el estímulo antigénico (BALOW, J.E., y ROSENTHAL, A.S., 1973), (WESTON, W. L., CLAMAN, H., N., y KRUEGER, G.G., 1973), otros observan una supresión de la generación de estos importantes mediadores (WAHL, S.M., ALTMAN, L.C., y ROSENSTREINCH, D.L., 1975).

Los niveles de inmunoglobulinas en suero sólo pueden afectarse con administración de altas dosis de hormona (FAUCI, A.S., y cols. 1976), (McMILLAN, R., LONGMIRE, R., y YELENOSKY, R., 1976). Sin embargo, no se puede apreciar disminución de la formación de anticuerpos.

Como se deduce de todo lo anterior, los glucocorticoides, debido a su extenso uso farmacológico, y marcados efectos sobre la respuesta inmune, constituyen un interesante campo para la investigación. Al mismo tiempo, la función productora de inmunoglobulinas de linfocitos en cultivo estimulados con PWM se muestra como un nuevo sistema de análisis de la respuesta humoral en seres humanos, de especial interés dado su parecido con la función y capacidad de regulación de dicha respuesta in vivo. Los efectos de los glucocorticoides sobre la producción de inmunoglobulinas estimulada por el PWM, puede acercarse al conocimiento de los mecanismos de dicha función y su regulación.



OBJETIVOS

Se pretende en el presente trabajo ahondar en el conocimiento de los efectos que los glucocorticoides ejercen sobre la función de los linfocitos. La oportunidad de este estudio reside en el extenso uso que de estos fármacos se está haciendo en la actualidad, fundamentalmente en aquellas afecciones cuya fisiopatología se basa en trastornos de la respuesta inmune.

Para ello se quieren ver los efectos causados por estos agentes, cuando son incorporados a dosis fisiológicas o farmacológicas, en sistemas de cultivo in vitro de linfocitos humanos, en los que pueden detectarse las funciones linfocitarias. Resumidamente se cubrirán los siguientes aspectos:

1°) Se estudiará el efecto de los glucocorticoides (hidrocortisona y prednisolona) sobre la capacidad de proliferación de linfocitos sanguíneos en cultivo, estimulados con mitógenos (PHA, Con A, PWM), mediante la medida de la captación de timidina tritiada por las células en división.

2°) Se observará la acción de las mismas sustancias sobre la producción de inmunoglobulinas por cultivos de linfocitos estimulados con PWM, midiendo la respuesta mediante un RIA.

3°) Se analizará la cinética y requisitos de los efectos encontrados.

4°) Se compararán los efectos producidos por los glucocorticoides sobre la producción de inmunoglobulinas de poblaciones totales de linfocitos de sangre y amígdala.

5°) Se verán estos efectos sobre poblaciones enriquecidas en linfocitos B y linfocitos T, así como en diferentes mezclas de estas poblaciones provenientes tanto de sangre como de amígdala.

6°) Se relacionarán los efectos hallados con los producidos por las poblaciones reguladoras de linfocitos T irradiados o pretratados con Con A.

7°) Se evaluará la modulación que sobre las actividades encontradas efectúen los monocitos, usando poblaciones deplecionadas de estas células por técnicas de adherencia.

Con todo esto se pretende abordar la actuación de los glucocorticoides a dosis alcanzables in vivo, sobre los mecanismos de interacción celular puestos en juego en la producción de inmunoglobulinas estimuladas por PWM, sistema este para el que se han descrito gran cantidad de similitudes con los eventos que ocurren en la respuesta inmune normal.

MATERIAL Y METODOS

1.- OBTENCION DEL MATERIAL:

La sangre fué obtenida de donantes sanos.

Las amígdalas fueron remitidas desde el Servicio de ORL.

2.- CONDICIONES DE ESTERILIDAD:

Todos los materiales usados estaban en condiciones esteriles. Las manipulaciones se efectuaron también en condiciones de esterilidad, en una cámara de flujo laminar (Slee, London, G.B.).

3.- MEDIO DE CULTIVO:

Como medio de cultivo se usó de forma constante el medio RPMI 1640 (Flow Laboratories, E.G.).

Este medio se suplementaba con 10% de suero de ternera fetal (Gibco-Bio-Cult, Scotland, G.B.), L-glutamina (Flow - Cultek, Scotland, G.B.) a una concentración de 200 mM, y una mezcla de penicilina estreptomocina (Difco Laboratories, Michigan, USA) a 100U/ml y 100 µg/ml respectivamente.

4.- OBTENCION DE LINFOCITOS

4.1. Sangre: La sangre extraída se depositó en un tubo que contenía 30U/ml de heparina (Heparina Analema). Dos volúmenes de sangre heparinizada se mezclaron con un volúmen de solución de Hanks (Gibco), y se depositaron sobre un volúmen de Lymfoprep (Nyegaard Co) cuidando de no alterar la interfase.

La purificación de linfocitos se obtuvo tras centrifugación en gradiente de densidad a 600 g durante 30 minutos, tomándolos al cabo de este tiempo de la interfase entre el suero y el medio. La población celular así obtenida contiene de un 85 a un 95% de linfocitos. Trás lavar tres veces en el mismo medio centrifugando a 400 g, 5 minutos, se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustaron a la concentración deseada en medio de cultivo.

4.2. Amígdala: Las amígdalas se trocearon repetidamente con bisturí dentro de una placa Petri en la que había solución de Hanks. De esta forma los linfocitos se desprenden de la cápsula, suspendiéndose en el medio. Las células así aisladas se dejaron depositar en un tubo en posición vertical durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido en el que se encontraban las células en suspensión se centrifugó a 400 g durante 5 minutos. A partir de aquí las células se lavaron y se ajustaron como en el punto anterior.

5.- MITOGENOS:

Se usaron PHA (Wellcome Research Laboratories, G.B.), - Con A (Pharmacia Fine Chemical, Sweden) y PWM (Grand Island Biological Co. USA). Se diluyeron en medio de cultivo y se agregaron a las células en las cantidades indicadas.

6.- GLUCOCORTICOIDES:

Se utilizaron hemisuccinato-21 hidrocortisona (Sigma) y hemisuccinato-21 prednisolona (Sigma). Ambos se diluyeron en medio de cultivo y se agregaron a las células en las concentraciones indicadas.

7.- PROLIFERACION DE LINFOCITOS EN CULTIVO ESTIMULADOS CON MITOGENO:

Los linfocitos una vez ajustados a la concentración deseada se dispusieron en una microplaca con 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Inter Med, Denmark) en un volumen final de 250 μ l. A estos pocillos se le agregó al mismo tiempo que las células 1-2 μ l. de medio. (pocillos control), o las sustancias bajo estudio (mitógenos, glucocorticoides) disueltos en 1-2 μ l de medio. Cada punto se hizo al menos por triplicado. Las microplacas fueron incubadas en estufa (Forma Scientific, Ohio, USA) a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad. La dosis a la que se usó cada mitógeno fue: 4 μ gr/ml. para la PHA, 10 μ gr/ml para la Con A y 4 μ l/ml para el PWM. Los cultivos se incubaron durante 3 días cuando eran estimulados con PHA y Con A y 4 días cuando lo fueron con PWM. Estas condiciones fueron fijadas en trabajos previos (Campos, A. 1980). 16 horas antes de sacar los cultivos se les adicionaba 2 μ l de timidina ³H (Amershan) conteniendo 1 μ Ci con una actividad específica de 200 μ Ci/mmol, a todos los pocillos. Tras este periodo las células fueron recogidas mediante un harvester (Flow Laboratories, G.B.) sobre papel (GF/A, Wathman Ltd., G. B.) y lavadas exhaustivamente, secadas y posteriormente dispuestas en viales con 3ml. de líquido de centelleo (4gr de PPO y 0.05 gr de POPOF en un litro de tolueno). Tras ello se midieron las c.p.m. existentes en cada muestra en un contador de partículas betas (Intertechnique PG4000, Francia). Los resultados de cada punto se obtuvieron como media de al menos triplicados.

8.- MARCADORES CELULARES:

8.1. Detección de linfocitos T por la formación de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero:

8.1.1. Preparación de eritrocitos tratados con neuraminidasa: Una suspensión de eritrocitos de carnero (Llorente) se lavó tres veces con solución de Hanks centrifugando a 600 g durante 5 minutos. A una solución de eritrocitos al 5% se le añadieron 5U/ml de neuraminidasa (Behring), incubando la mezcla en un baño a 37°C durante 30 minutos. Tras ello se lavaron tres veces y se resuspendieron al 2% en el mismo medio.

8.1.2. Absorción de anticuerpos heterófilos del suero de Ternera Fetal: A cuatro volúmenes de Suero de Ternera Fetal (Flow Laboratories) se añadió un volumen de eritrocitos de carnero lavados. Esta mezcla se incubó 2 horas a 4°C. Tras esto se centrifugó a 600 g y se tomó el sobrenadante.

8.1.3. Detección de linfocitos formadores de rosetas con eritrocitos de carnero: Se mezclaron 100 µl de la suspensión de linfocitos (10 millones/ml) con 200 µl de la suspensión de eritrocitos tratados con neuraminidasa y 100 µl de Suero de Ternera Fetal absorbido. Tras centrifugar a 100 g - durante 5 minutos, se incubaron sin agitar el pellet 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se resuspendió el pellet cuidadosamente y se contó en Cámara de Neubauer la cantidad de linfocitos que formaban roseta (linfocitos rodeados por más de tres eritrocitos), refiriéndolo como porcentaje de la cantidad de linfocitos totales. En todos los casos se leyeron al menos 200 linfocitos.

8.2. Detección de linfocitos B por marcaje de inmunoglobulinas de superficie (IgS).

A diferentes tubos conteniendo 100 μ l de la suspensión de linfocitos (10 millones/ml) se agregaron 25 μ l de los siguientes antisueros fluoresceinados: antiinmunoglobulinas totales, anticadena δ , anticadena μ , anticadena γ , anticadena α , anticadena κ , y anticadena λ (Meloy). Esta mezcla se incubó a 4°C durante 30 minutos. A continuación los linfocitos se lavaron tres veces con solución de Hanks a 4°C, centrifugando a 400 g 5 minutos. Tras esto, los linfocitos depositados entre porta y cubre, se leyeron en un microscopio de fluorescencia (Ortho lux, Leitz). Se cuantificaron como porcentaje de linfocitos fluorescentes con un antisuero determinado con respecto a los linfocitos totales contados en campo claro.

8.3. Detección de monocitos mediante tinción para estas rasas no específicas:

Se hacen extensiones sobre portas de las suspensiones de células que se desean analizar, a una concentración de 2×10^6 /ml y se realiza sobre ellos la técnica de tinción (KOSKI, I.R. POPLA CK, D.G., y BLEASE, R.M., 1976).

8.3.1. Reactivos:

- Fijador: se mezclan 20 ml de buffer fosfato (PO_4HNa_2 20 mgr, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 100 mgr en 20 ml de agua), 20 ml de acetona y 25 ml de formaldehído (30%). Esta solución se ajusta a un pH 6.6.

- Solución de pararosanilina: 1 mgr de pararosanilina (SIGMA) se disuelve en 20 ml de $\text{C}_1\text{H}_2\text{N}$.

10.- OBTENCION DE POBLACIONES ENRIQUECIDAS DE LINFOCITOS B y T POR TECNICA DE ROSETAS:

Se mezclan 1 volúmen de linfocitos a una concentración 10×10^6 /ml, con 1 volúmen de suero de ternera fetal absorbido y esterilizado por filtración (Millipore $0,2 \mu$), y con 2 volúmenes de eritrocitos de carnero tratados con neuraminidasa. Una vez preparada la mezcla se centrifuga a 150 g por 7 minutos, se incuban 15' a temperatura ambiente y posteriormente se agita suavemente para resuspender el pellet volviéndose a repetir la centrifugación e incubación. Al final se resuspende de nuevo el pellet muy suavemente. Con esto se ha conseguido formar una suspensión de linfocitos en la que los linfocitos T se encuentran formando rosetas con los eritrocitos de carnero. Ahora esta suspensión se coloca lentamente sobre Lymphoprep en la proporción 2/3 de suspensión celular por 1/3 de Lymphoprep, y se centrifuga a 600 g durante 30 minutos. En estas condiciones eritrocitos aislados y linfocitos formando rosetas atraviesan el limphoprep y pueden recogerse en el pellet, mientras que linfocitos aislados permanecen en la interfase. Posteriormente pueden recogerse por separado estas dos fracciones. La fracción de la interfase es muy rica en linfocitos B. La fracción de pellet lo es en linfocitos T. A esta última fracción se le agrega 4 ml de una solución de C1NH_4 (0.91%), para un pellet de unos 15 ml de suspensión de rosetas. Esta mezcla se incubaba a 37°C en un baño durante 5 minutos agitando frecuentemente. Con ello se consigue lisar los eritrocitos sin afectar a los linfocitos. Posteriormente tanto la fracción rica en linfocitos T como la rica en linfocitos B se lavan 3 veces con Hanks, se cuentan y se colocan a la concentración deseada en medio de cultivo.

La población enriquecida en linfocitos T poseía un 95% de linfocitos formadores de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero y menos de 1% de linfocitos con inmunoglobulinas de superficie y de células positivas para la tinción de esterasas no específicas.

La población enriquecida con linfocitos B tenía menos del 2% de linfocitos formadores de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero y una cantidad variable de células positivas para la tinción de esterasas no específicas: 32.7 ± 5.2 cuando eran provenientes de poblaciones sanguíneas, y 7.6 ± 2.1 cuando provenían de amígdala.

11.- PRECULTIVOS:

Pobalciones celulares totales fueron cultivadas a 2×10^6 células/ml en medio de cultivo en placas petri de plástico (Nunc, Inter, Med. Denmark) en estufa en condiciones de cultivo. A estos cultivos se le agregaba Con A $10 \mu\text{g/ml}$ o nada (en cultivos control). En estas condiciones se mantenían durante 48 horas pasadas las cuales se tomaban las células con pipeta pasteur, se lavaban exhaustivamente, y se resuspendían a la concentración deseada en medio de cultivo.

12.- IRRADIACION DE LINFOCITOS T:

Una suspensión a 2×10^6 linfocitos T/ml fué irradiada a 2000 rads en una unidad de irradiación Theratron 780 con una fuente de ^{60}Co de 1.75 cm. de diametro y una actividad de 9.913 ci. el 15 de noviembre de 1977.

13.- COCULTIVOS:

Se construían cocultivos como los descritos en el punto 6 con una mezcla de diferentes poblaciones enriquecidas B y T - frescas o precultivadas, en concentraciones variables, en un volumen final de 250 μl por pocillo. Estos cocultivos eran ensayados como se describe en el punto 14.



14.- PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS POR LINFOCITOS EN CULTIVOS ESTIMULADOS CON PWM.

Se cultivaron poblaciones de linfocitos totales o mezclas de subpoblaciones frescas o precultivadas, resuspendidas a las concentraciones indicadas en medio de cultivo, en microplacas de cultivo (Nunc, Inter. Med. Denmark), en un volumen final de 250 μ l por pocillo. A estos cultivos se le añadian los reactivos bajo analisis en 1-2 μ l (PWM, glucocorticoides) o 1-2 μ l de medio de cultivo (cultivos control). Cada punto era ensayado al menos por triplicado. Las placas de cultivo fueron incubadas en una estufa en las condiciones descritas en el punto 6. Tras 8 días de cultivo se analizaba la síntesis y la secreción de inmunoglobulinas.

14.1. Técnica de detección de células sintetizadoras de inmunoglobulinas.

Al final del periodo de incubación de los cultivos descritos, se tomaron las células despegándolas del fondo de cada pocillo mediante una pipeta pasteur, y se unió cada triplicado en un tubo. Estos se centrifugaron a 300 g y ulteriormente se analizaron por separado el sobrenadante y las células. El pellet de estas fué resuspendido en el mismo volumen y las células contadas en una cámara de Neubauer. Tanto la viabilidad (punto 15) como la recuperación de células era similar en los diferentes cultivos. Se obtuvieron preparaciones de citocentrífuga de una suspensión de linfocitos sujetos a estudios ajustados a 1-2 millones/ml. Las preparaciones se fijaron en ácido acético al 5% en alcohol etílico durante 10 minutos. A continuación se lavaron tres veces con solución de Hanks y se incubaron con una gota de los antisueros fluoresceinados del punto -

8-2 a una dilución 1;10 durante 30 minutos en cámara húmeda. Tras ello se lavaron de nuevo tres veces, se cubrieron y se leyeron de la misma forma que en el punto 8-2. Con esta técnica se tiñe el citoplasma de las células plasmáticas generadas en el cultivo. Los resultados se expresan como cantidad de estas células en cada punto.

14.2. Medida de las Inmunoglobulinas secretadas al sobrenadante por un RIA.

Los sobrenadantes obtenidos como se ha descrito en el punto 14, son congelados a -70°C (Ultra Low, Revco Inc.) hasta su ensayo. Este se realizó mediante un RIA de doble anticuerpo en el que la muestra compete con un antígeno marcado con ^{125}I , por una cantidad constante de anticuerpo.

La cantidad de anticuerpo debe ser la necesaria para unir alrededor del 75% de antígeno marcado de modo que haya un exceso de muestra de antígeno marcado en relación a los lugares de unión en el anticuerpo, de forma que se establezca una competencia entre la muestra y el antígeno marcado.

El RIA por nosotros utilizado es de doble anticuerpo - utilizándose para precipitar el complejo inmunoglobulina-anti-inmunoglobulina un segundo complejo presente en mayor concentración de γ globulina de conejo - suero-anti- γ -globulina de conejo.

14.2.1. Obtención de la proteína: Las gammaglobulinas utilizadas son IgM, IgG e IgA purificadas, que fueron cedidas por el Dr. Pedro González Porqué del Servicio de Inmunología del Centro de la Seguridad Social "Ramón y Cajal", Madrid.

14.2.2. Marcado de la proteína: Colocamos en un tubo 50-100 μ grs de la proteína a la concentración de 2,5 μ gr/ml. en tampón fosfato 0,05 M pH 7,5.

Ponemos 10 μ l de ^{125}I -Na (1 mCi, Amershan, England) en 40 μ l de tampón fosfato 0,05 M pH 7,5 y lo añadimos a la proteína.

A continuación se añade 20 μ l de Cloramina T a la concentración de 1 μ gr/ml en tampón fosfato 0,05 M pH 7,5. Se espera 1 minuto.

La Cloramina T es una sal sódica del N-monocloro-p-toluen sulfonamida que neutraliza los agentes reductores del I-NA y oxida el I^- a I^+ (Cación-iodino). Los restos de aminoácidos que se iodina son los Tyr.

Añadimos 100 μ l de metabisulfito sódico a la concentración de 0,5 μ gr/ml en tampón fosfato 0,05 M pH 7,5 para detener la reacción.

Esperamos 2 minutos y añadimos 2ml. de tampón salino fisiológico que contiene albúmina bovina 0,3% (BBS-BSA) pH 8.0 y esto se pone a dializar contra tampón salino fisiológico para eliminar el ^{125}I libre. Cambiamos el líquido de dialisis a las 4, 16, 24 y 48 horas midiendo siempre la concentración del ^{125}I libre en este líquido. Cuando esta es prácticamente nula se extrae el contenido del saco de diálisis, calculandose el ^{125}I incorporado a la proteína.

De ahí obtenemos el porcentaje de ^{125}I unido y la actividad específica. Consideramos válido el marcaje si la proporción de ^{125}I incorporado a la proteína es mayor del 70%.

14.2.3. Antiinmunoglobulinas; Utilizamos anti-inmunoglobulinas comerciales, que son sueros humanos valorados de la casa Operón (IgG, IgM lote 143 y IgA lote 152). Las concentraciones óptimas de inmunoglobulina-anti-inmunoglobulina las valoramos mediante RIA.

Para ello hicimos diluciones seriadas del anticuerpo - desde 1/50 a 1/819.200 más blanco por triplicado.

Se añadió suero de conejo a dilución adecuada, previamente establecida, y γ -globulina marcada a dilución adecuada, previamente establecida. Se dejó incubar 2 horas. Se añadió antisuero de conejo a dilución adecuada previamente establecida. Se dejó incubar 16 horas. Se lavó por tres veces con BBS + BSA 0,3%, centrifugando a 1.600x g durante 30 minutos, contándose las c.p.m. del precipitado en un contador γ (Intertechnique PG 4.000). Se toma como dilución óptima la dilución que une algo más del 75% de la unión máxima.

14.2.4. Obtención del suero de conejo:

Sacamos sangre de un conejo, la dejamos coagular, la centrifugamos a 1.700 x g durante 10 minutos y obtuvimos el suero del conejo.

14.2.5. Asilamiento de gammaglobulina a partir - del suero de conejo.

Se precipita la γ -globulina del suero de conejo con $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ al 50%. Se lava 3 veces con tampón salino fisiológico. Una vez obtenida la γ -globulina se diluye en tampón -

salino fisiológico a un volumen aproximadamente la mitad del que tenía inicialmente el suero.

Se elimina el $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ dializando contra tampón salino fisiológico a 4°C durante 2-3 días, hasta que se comprueba la eliminación total del SO_4^- de la γ globulina.

Se calcula la cantidad de γ -globulina por precipitación con antisuero y se lleva a la concentración de 2 mgr/ml.

14.2.6. Inmunización de la cabra y obtención del antisuero de conejo.

Para formar agregados de γ -globulina, tomamos 6 ml. de γ -globulina de conejo a la concentración de 2mgr/ml. y la calentamos a $69^\circ\text{C} \pm 0,5$ y los centrifugamos durante 30 minutos a 1.700 x g desechando el precipitado.

Luego emulsionamos por ultrasonido los 6 ml de γ -globulina agregada con 12 ml. de adyuvante completo de Freund.

Inyectamos 4,5 ml en cada una de las patas de la cabra. A las 6 semanas realizamos la segunda inmunización.

A las 2 semanas siguientes a la segunda inmunización, sacamos suero de cabra, que habrá creado anticuerpos contra el suero de conejo.

Vemos si existe alguna reacción cruzada con las γ -globulinas humanas pasando el suero de cabra anticonejo por una columna de Sefarosa-BrCN a la que se ha pegado la inmunoglobulina.

La valoración del suero de cabra anticonejo se realizó por precipitación en tubo, observando las concentraciones de suero de conejo-suero de cabra anticonejo, adecuadas para obtener un precipitado visible.

14.2.7. Procedimiento:

A) Curva patrón: Se ponen 13 tubos por duplicado, con 100 μ l de diluciones seriadas de la inmunoglobulina valorada (suero humano de referencia), en concentraciones decrecientes desde 2.000 a 1 ngr/ml más 1 blanco

B) Sobrenadante problema: Se hacen por duplicado, colocándose en cada tubo 100 μ l del sobrenadante a la dilución convenida.

C) Contaje: Terminada la incubación, se efectúa la separación de la radioactividad libre en el medio y la actividad ligada, lavando por tres veces con 3 ml de BBS-BSA 0,3% pH 8,0 mediante centrifugación a 1.600 x g durante 30 minutos y despreciando el sobrenadante.

Contamos en el contador γ , la radioactividad presente en el precipitado.

Una vez contada la radioactividad se traza la curva de referencia y de ella por extrapolación, se obtienen los valores de los problemas.

15.- MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR:

Se mezclan 90 μ l de la suspensión de células a testar con 10 μ l de solución de azul de tripán 0,2%. Se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente y se cuentan en una cámara de Neubauer. Las células muertas se tiñen de azul. Los resultados se expresan como porcentaje de células no teñidas por cada 100 células.

RESULTADOS



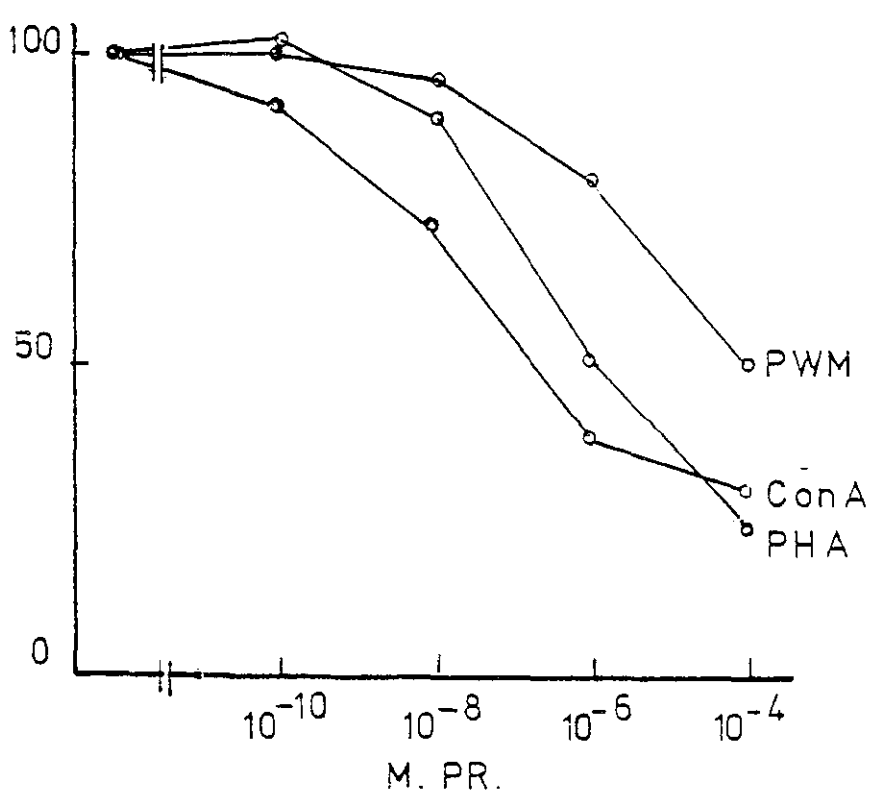
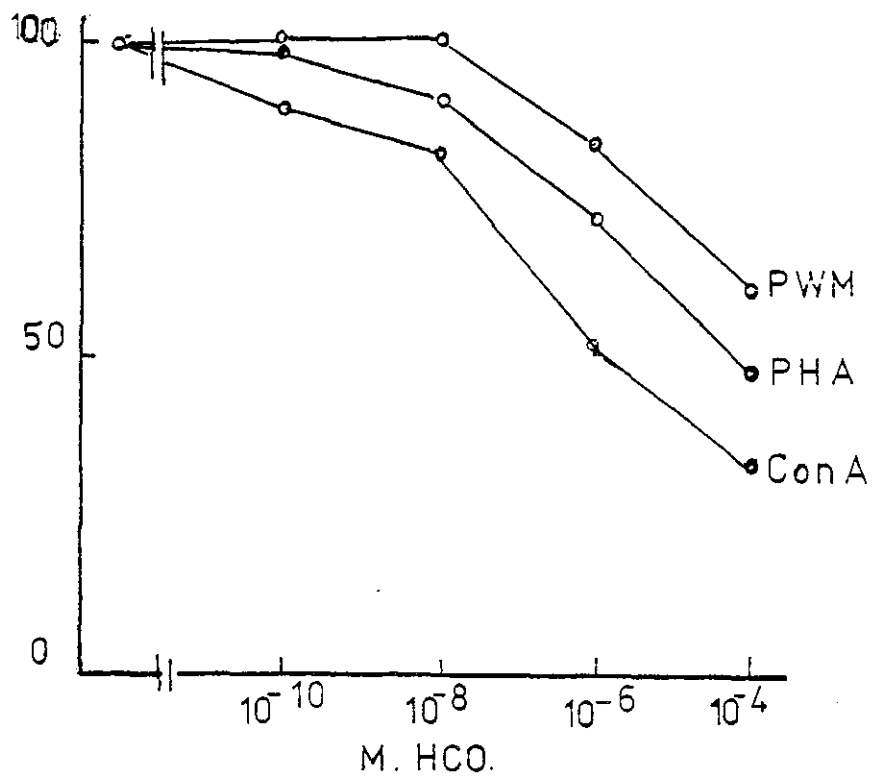
1.- EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA PROLIFERACION
DE LINFOCITOS SANGUINEOS ESTIMULADOS CON MITOGENOS

Se cultivaron linfocitos de sangre de donantes sanos, para medir su capacidad de transformación blástica, tras la estimulación con mitógenos (PHA, Con A, PWM). A cultivos paralelos a estos se les añadió, al inicio de los mismos, glucocorticoides (hidrocortisona y pednisolona) en un amplio rango de concentraciones molares (10^{-10} M a 10^{-4} M), y se vio el efecto que producian estas sustancias sobre la toma de timidina ^3H de los linfocitos proliferantes. Los resultados obtenidos en varios experimentos pueden observarse en la tabla 8. Estos resultados se expresan como media de las c.p.m. obtenidas en, al menos, tres cultivos por cada punto. También se expresan como porcentajes de los cultivos controles, es decir sin glucocorticoides, en cada experimento. Las medias y errores standard de estos porcentajes pueden verse en la grafica 1.

La adición de hidrocortisona y pednisolona actúa globalmente inhibiendo la proliferación. Este efecto es dosis-dependiente, aumentando paralelamente al incremento de la cantidad del agente.

Así este efecto se suave a dosis fisiológicas (10^{-8} M), con porcentajes medios de inhibición de 0% para la estimulación por PWM, 8,8% para la PHA y 15,4% para la Con A, en el caso de la hidrocortisona, y de 3% para el PWM, 14% para la PHA, 29,7% para la Con A, cuando es la prednisolona el agente incorporado a los cultivos.

A dosis farmacológicas (10^{-6} M), el efecto inhibitor es más notorio, siendo de 19,5% para el PWM, 27,8% para la PHA y 48,7% para la Con A, en el caso de la hidrocortisona, y de un 18,5% para el PWM, 49,4% para la PHA y 61,7% para la Con A, cuando se añade prednisolona.



GRAFICA 1: Efecto de hidrocortisona (HCO) y prednisolona (P_P) sobre la proliferación de linfocitos sanguíneos (1x10⁶ linf/m. por mitógenos.

ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA RESPUESTA A MITOGENOS

CONCENTRACION DE HCO

<u>PHA</u>	<u>0</u>	<u>10⁻⁴</u>	<u>10⁻⁶</u>	<u>10⁻⁸</u>	<u>10⁻¹⁰</u>
	6540	-	4374 (66)	5843 (83)	6291 (96)
	22312 (100)	10594 (47)	14327 (93)	20921 (93)	21765 (97)
	28127 (100)	13195 (47)	23572 (83)	25728 (91)	29022 (103)
	19513 (100)	-	15867 (81)	19320 (99)	-
	15224 (100)	4812 (31)	8527 (56)	12178 (80)	15010 (98)
	12100 (100)	8177 (67)	10023 (82)	12349 (102)	-
Media error standard	100	48 [±] 7,3	72,2 [±] 4.3	91,2 [±] 3.5	99.2 [±] 1.1
<u>Con A</u>	7843 (100)	2280 (29)	2294 (29)	51111 (65)	5972 (76)
	14170 (100)	2950 (19)	5896 (41)	13491 (95)	13993 (98)
	16326 (100)	10375 (66)	13721 (84)	15507 (94)	15917 (97)
Media error standard	100	35.6 [±] 16.1	51.3 [±] (21.4)	84.6 [±] 9.9	90,3 [±] 7.2
<u>PWM</u>	8600 (100)	5470 (63)	6602 (76)	8351 (97)	--
	13750 (100)	--	10573 (64)	12468 (90)	13520 (98)
	6130 (100)	4050 (66)	5271 (85)	6930 (113)	--
	7312 (100)	5092 (69)	7129 (97)	7544 (103)	--
Media error standard	100	66 [±] 1.7	80.5 [±] 6.7	100.75 [±] 4.8	

ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA RESPUESTA A MITOGENOS

CONCENTRACION DE PR.

<u>PHA</u>	<u>10⁻⁴</u>	<u>10⁻⁶</u>	<u>10⁻⁸</u>	<u>10⁻¹⁰</u>
	1783 (27)	4387 (67)	5390 (82)	7114 (108)
	4875 (22)	8930 (40)	19977 (90)	25512 (114)
	--	--	--	--
	--	--	--	--
	3327 (22)	6955 (45)	13226 (87)	14285 (94)
	--	--	--	--
Media error standard	23.6 [±] 2.1	50.6 [±] 6.4	86.3 [±] 2.9	105.3 [±] 7.6
<u>Con A</u>	1560 (20)	1720 (22)	3525 (46)	7009 (89)
	2641 (19)	4828 (34)	11543 (81)	13512 (95)
	8452 (51)	9780 (59)	13725 (84)	14417 (88)
Media error standard	30 [±] 10.6	38.3 [±] 11	70.3 [±] 12.3	90.6 [±] 2.2
<u>PWM</u>	4426 (52)	6322 (73)	7517 (87)	8873 (103)
	--	11329 (87)	14589 (106)	--
	2776 (45)	4818 (78)	5989 (97)	--
	3927 (53)	6864 (93)	7217 (98)	--
Media error standard	50 [±] 2.5	81.5 [±] 4.2	97 [±] 3.8	--

Como se deduce en estos datos, la estimulación inducida por Con A es la más sensible a estos agentes, y la por PWM la menos, siendo la por PHA intermedia.

Ambos agentes usados, hidrocortisona y prednisolona, muestran una acción sensiblemente parecida, si bien el segundo parece, en algunos puntos, algo más activo.

El efecto inhibitor de la proliferación presente en los cultivos, no se debía a actividad citotóxica de los agentes ensayados, puesto que el índice de viabilidad, estimado por la coloración vital con azul de tripán, era similar en todos los cultivos.

2.- ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS SANGUINEOS ESTIMULADOS CON PWM .

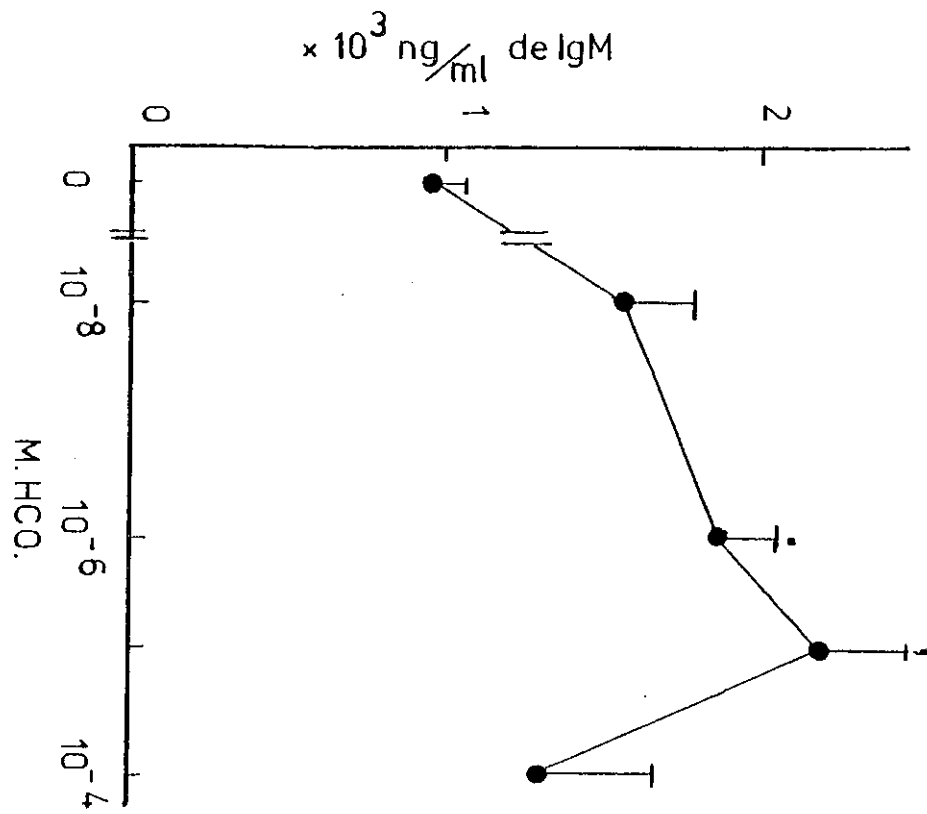
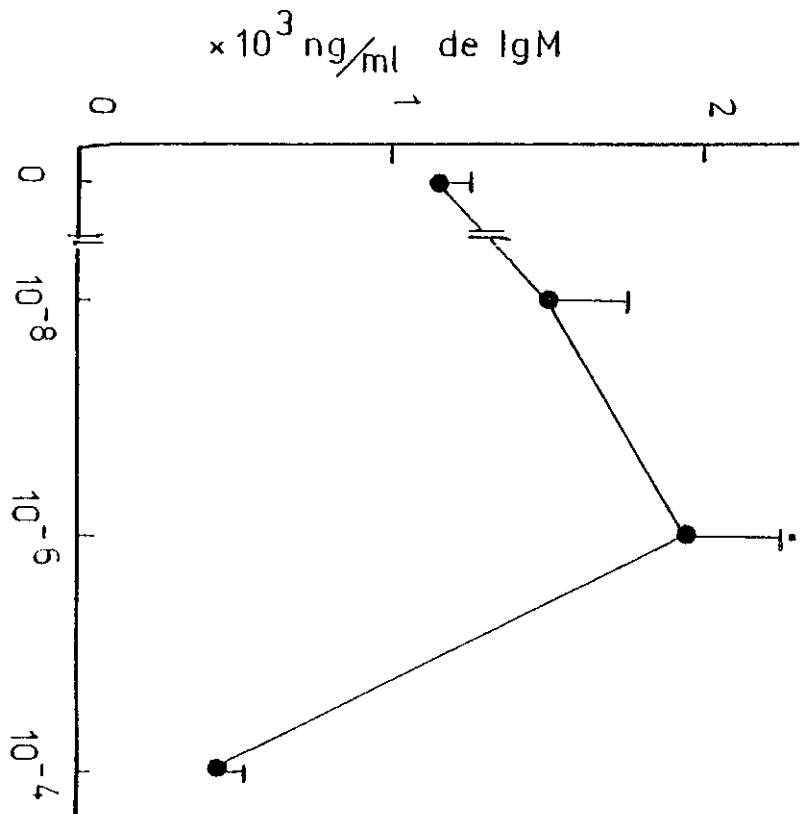
Los linfocitos sanguíneos fueron cultivados con PWM para observar la capacidad productora de inmunoglobulinas, en ausencia o presencia de los agentes ya mencionados en un amplio rango de concentraciones ($10^{-8}M$ a 10^{-4}). Transcurridos 8 días de cultivo, se analizó el contenido de inmunoglobulinas en los sobrenadantes de los mismos, mediante RIA.

En la gráfica 2 puede observarse las medias y errores standard de los resultados obtenidos al analizar el contenido de IgM de cultivos de linfocitos sanguíneos de 17 sujetos. De forma contraria a lo que ocurre en la proliferación, la capacidad de producir inmunoglobulinas estimulada por el PWM es aumentada en presencia de glucocorticoides. El efecto es muy suave a dosis fisiológicas, pero es claramente detectable a dosis farmacológicas, siendo estadísticamente significativo para la hidrocortisona a las concentraciones de $10^{-6}M$ y $10^{-5}M$, con unas $p < 0,01$ y $0,005$ respectivamente, y para $10^{-6}M$ prednisolona con una $p < 0,01$.

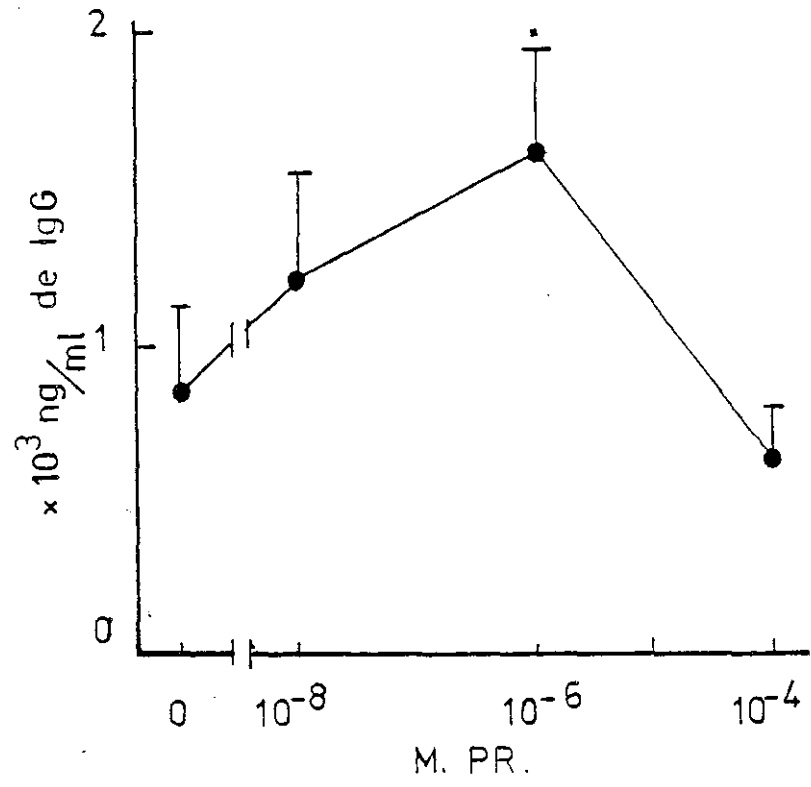
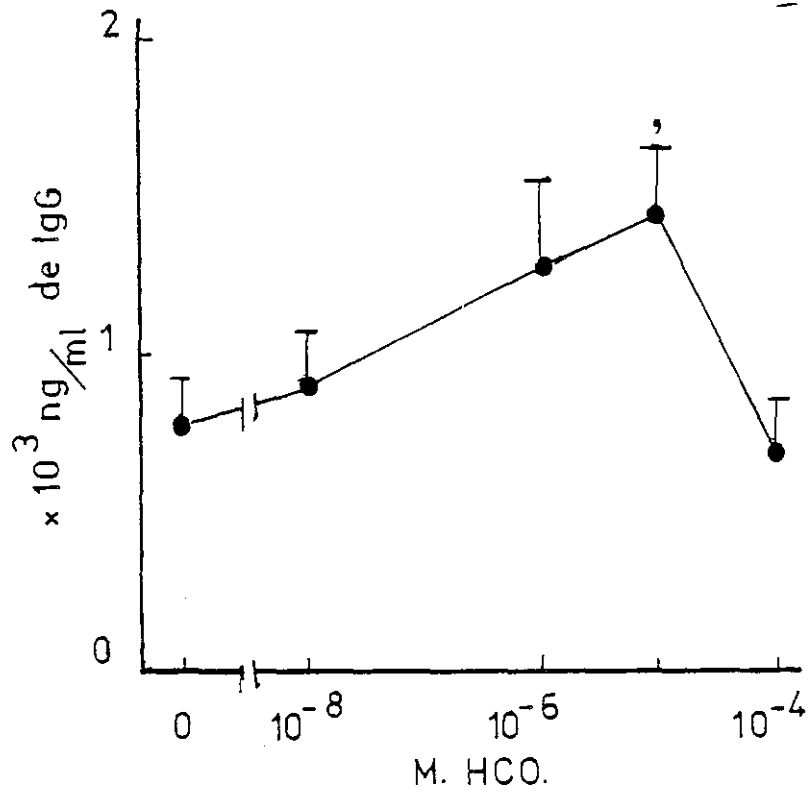
Concentraciones mayores de ambas sustancias conducen de nuevo a un descenso de la producción de inmunoglobulinas a la línea de base, o incluso a valores por debajo de esta.

El efecto producido por ambos agentes es similar.

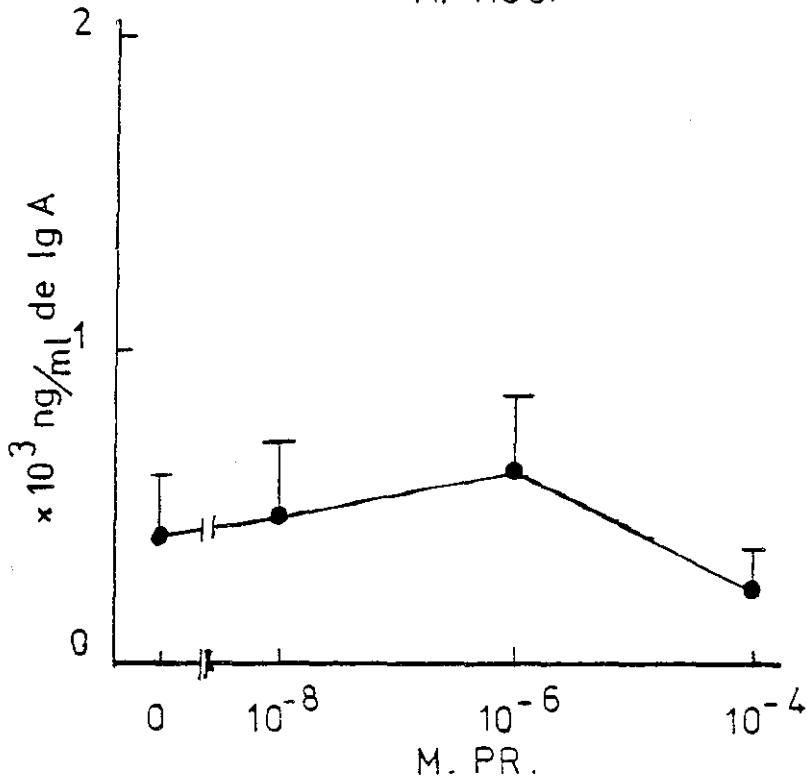
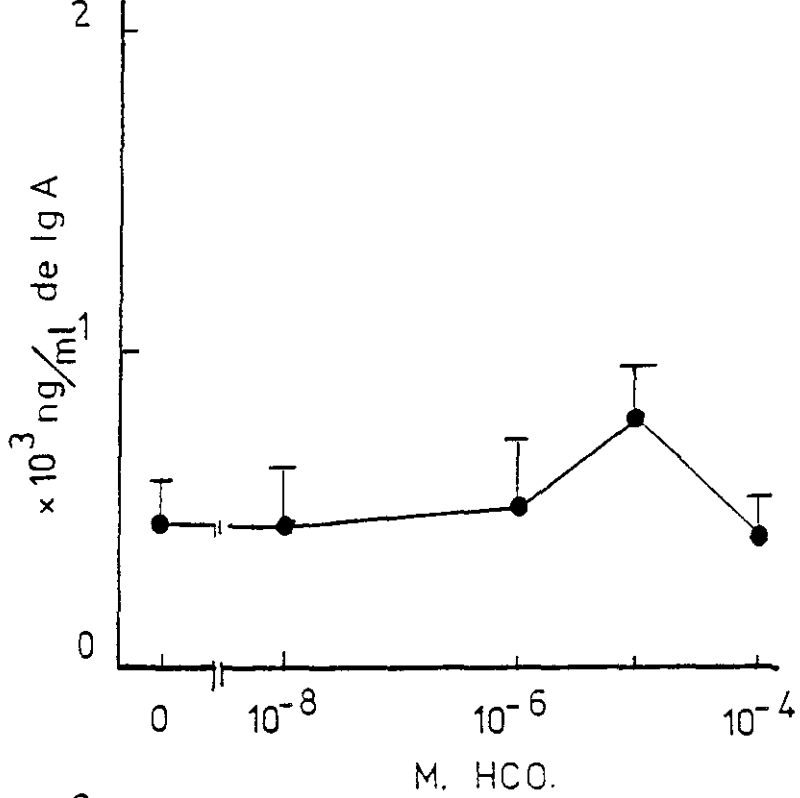
En la gráfica 3 se muestran las medias y errores standard de los resultados obtenidos de analizar el contenido en IgG de los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos sanguíneos de 6 sujetos por RIA.



GRAFICA 2: Efecto de hidrocortisona (HCO) y prednisolona (P_R) sobre la producción de IgM por linfocitos sanguíneos (1x10⁶ linf./ml) estimulados por PWM.. p < 0.01, p < 0.005.



GRAFICA 3: Efecto de hidrocortisona (HCO) y prednisolona (P_R) sobre la producción de IgG por linfocitos sanguíneos (1x10⁶ linf./ml) estimulada por PWM . p < 0.05 , p < 0.01



GRAFICA 4: Efecto de hidrocortisona (HCO) y prednisolona (P_R) sobre la producción de IgA por linfocitos sanguíneos (1x10⁶ linf/ml) estimulados por PWM.

Como puede verse se pueden hacer similares deducciones a las realizadas para la IgM. El efecto de incremento significativo es apreciado a 10^{-5} M hidrocortisona ($p < 0.01$) y prednisolona ($p < 0,05$).

En la grafica 4 se exponen las medias y errores standard de los resultados obtenidos de analizar el contenido de IgA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos sanguineos de 5 sujetos por RIA.

En ella se aprecia, que la produccion basal de IgA es aproximadamente la mitad de la de la IgM e IgG. El efecto de aumento es detectable a las mismas dosis de los agentes, si bien no de forma estadisticamente significativa. Ello se debe posiblemente al escaso número de experimentos.

En resúmen puede decirse que tanto la hidrocortisona - como la prednisolona aumentan a dosis farmacológicas, la producción inducida por PWM de las tres clase principales de - inmunoglobulinas de forma similar. El porcentaje medio de aumento producido por estos agentes es de 127,7% para la IgM, 84,6% para la IgG y 63,2% para la IgA.

Tras estos experimentos y en el resto del presente trabajo se presentan solo los datos relativos a IgM como los mas significativos aunque paralelos a los de las otras inmunoglobulinas. Asi mismo se eligió la hidrocortisona para el resto de los experimentos, salvo en aquellos en que se indique otra cosa.

3.- EFECTO DE LA HIDROCORTISONA SOBRE LA CANTIDAD DE CELULAS PRODUCTORAS DE INMUNOGLOBULINAS.

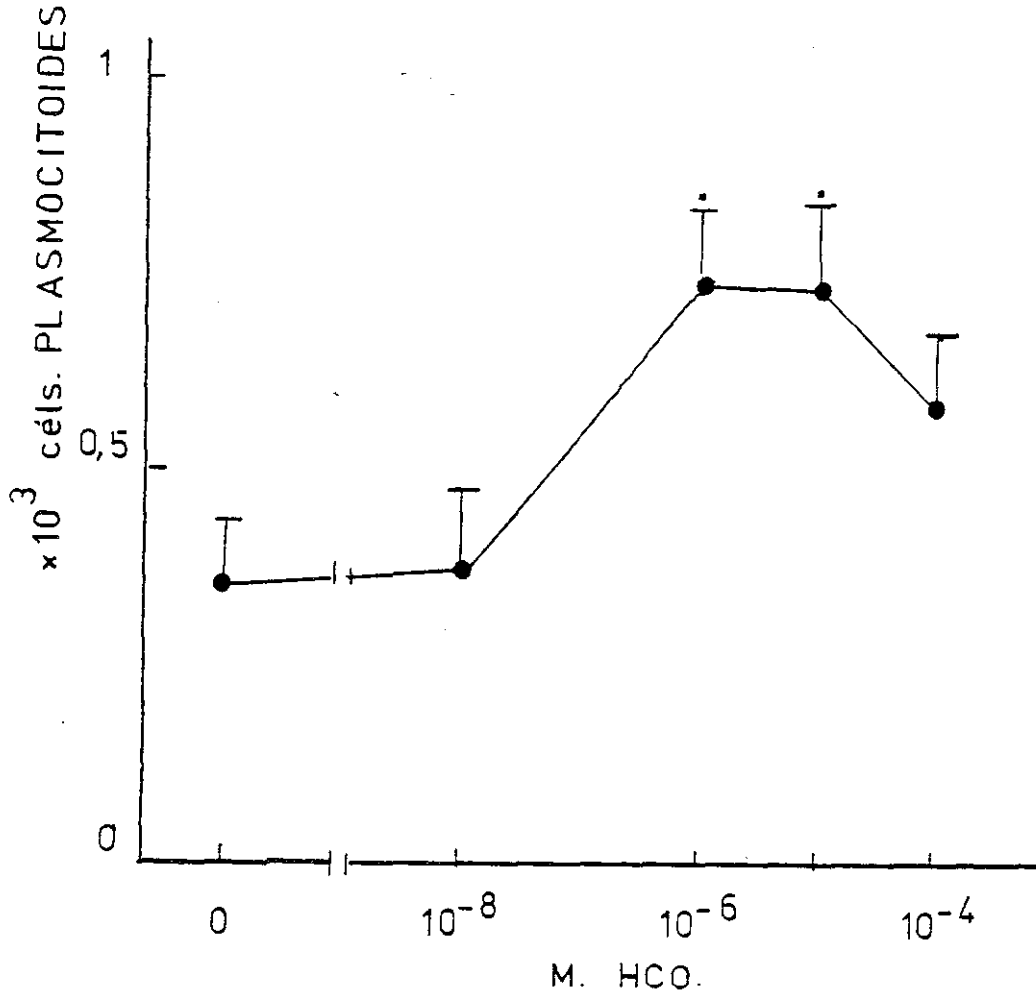
Cabe hacerse la pregunta de si el efecto demostrado se debe a un aumento de la capacidad productora individual de cada célula, capaz de esta actividad, presente en el cultivo o si se relaciona a un aumento del número de estas células; es decir si el efecto se produce sobre la secreción de inmunoglobulinas o sobre la generación de células productoras. Estas células son denominadas células plasmacitoides, y son fácilmente detectables en preparaciones de citocentrífuga fijadas, por la tinción intensa del citoplasma mediante sueros antiinmoglobulinas fluorescinados. Dichas células se encuentran en muy bajo número en cultivos controles, aumentando sensiblemente la cantidad de las mismas, tras 8 días de estímulo con PWM, estando ello íntimamente relacionado a la secreción de inmunoglobulinas al medio detectables por RIA u otras técnicas.

En la grafica 5 se observa el efecto provocado por el PWM y por el PWM mas varias concentraciones de hidrocortisona. Cada punto expresa la media y el error standard de 6 experimentos.

Como puede apreciarse, la hidrocortisona provoca un aumento del número de células plasmacitoides en los cultivos. Este aumento es significativo para dosis de 10^{-5} M, 10^{-6} M ($p < 0.05$), siendo el porcentaje medio de incremento para esas dosis de un 111.4% .

Estos resultados son parecidos a los presentados en las gráficas 2,3 y 4, y parecen indicar que el efecto descrito se debe a un estímulo de la generación de células productoras de inmunoglobulinas, y no a un aumento de la capacidad secretora individual de las mismas.

Por otro lado y puesto que el paso a célula plasmocitoide requiere proliferación de linfocitos pequeños B, puede decirse



GRAFICA 5: Efecto de hidrocortisona (HCO) sobre el número de células plasmacitoides en cultivos de linfocitos sanguíneos (1×10^6 linf/ml) estimulados por PWM. . $p < 0.05$

que el efecto inhibidor sobre la proliferación demostrado en el punto 1, no se ejerce sobre los linfocitos B, que - por el contrario son estimulados a proliferar en mayor cantidad.

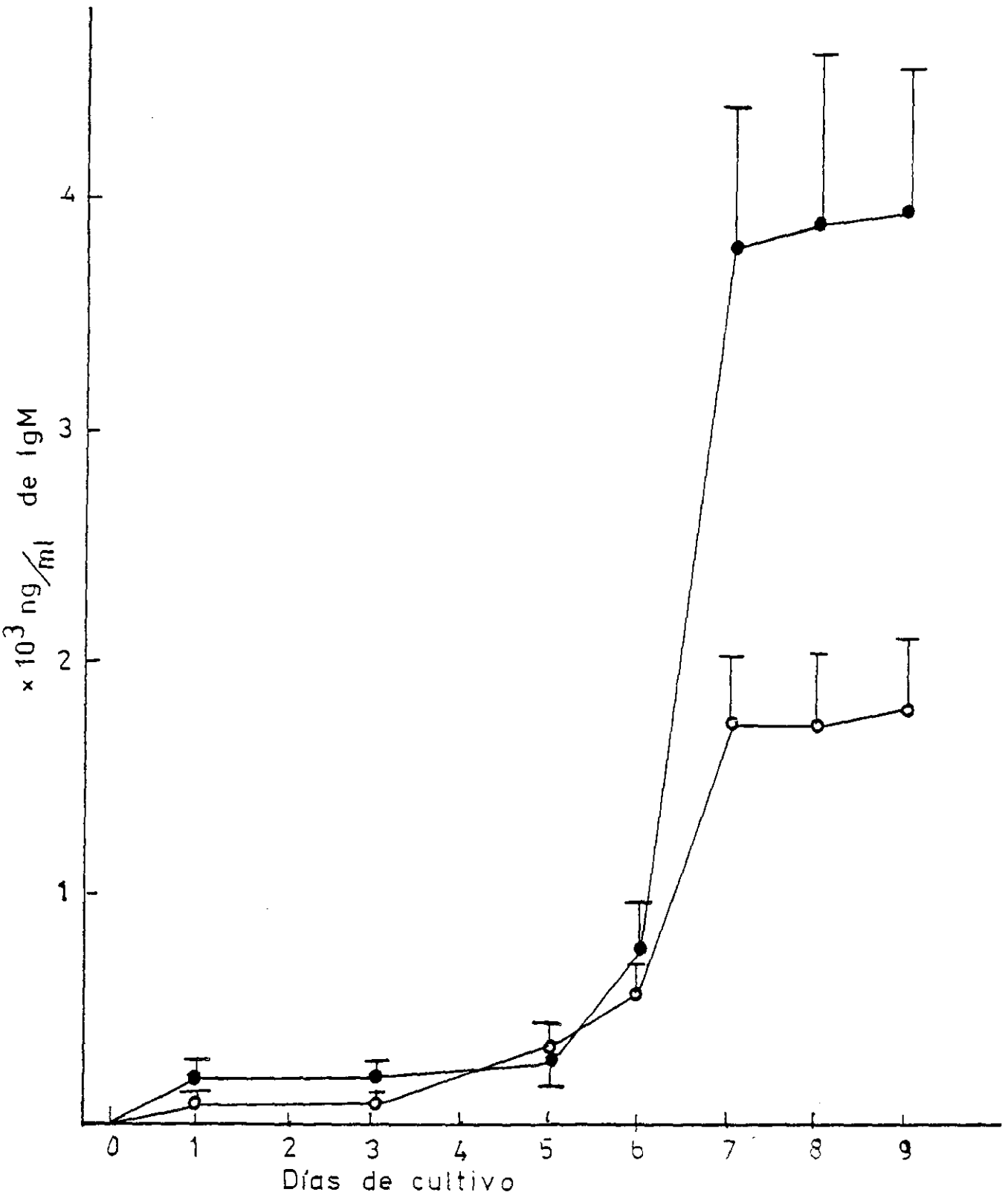
4.- CINETICA DEL EFECTO.

Se hicieron cultivos de linfocitos sanguíneos con PWM, a los que se les adicionó o no una concentración de 10^{-5} M de hidrocortisona. En tiempos sucesivos desde el día de inicio hasta el día noveno, se fué extrayendo sobrenadantes de cultivos triplicados, que habían permanecido con o sin el agente.

En la gráfica 6 constan las medias y errores standard de las cantidades de IgM obtenidas en 6 experimentos.

Como puede observarse la producción es similar en ambos ensayos hasta el día 5, siendo muy baja la cantidad de IgM producida. A partir de este día, se observa un rápido aumento de la producción, que se estabiliza a partir del día 7, como expresión de una caída en el ritmo de dicha actividad. El aumento generado a partir del día 6 es claramente superior en aquellos cultivos en los que había hidrocortisona, si bien la cinética es idéntica a la de los cultivos controles.

Por tanto, el efecto ejercido por la hidrocortisona no altera el tipo de cinética de producción, aunque a partir del día sexto esta es evidentemente mayor en los cultivos que cuentan con la presencia de dicho agente. Este agente parece actuar facilitando o amplificando los mecanismos generados en la estimulación por el PWM, mas que creando, por si mismo, mecanismos diferentes de estimulación.



GRAFICA 6: Cinética de la producción de IgM en cultivos de linfocitos sanguíneos estimulados por PWM (círculos blancos). Efecto de 10^{-5} M de hidrocortisona (círculos negros).

5.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIDROCORTISONA SOBRE LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS SEGUN EL MOMENTO DE ADICION DE LA MISMA AL CULTIVO.

Se pretende ver cuando es necesario añadir la hidrocortisona a los cultivos para que el efecto descrito se realice. Ya que en el punto anterior se ha visto que el incremento de producción de inmunoglobulinas por la hidrocortisona, se manifiesta a partir del 6º día, cabría pensar que la presencia de esta hormona es solo requerida en los últimos momentos del cultivo.

Para ello se hicieron diferentes cultivos de linfocitos sanguíneos en presencia del PWM a los que se les añadió hidrocortisona (10^{-5} M) en días sucesivos.

Los resultados obtenidos de producción de IgM en cuatro experimentos, son presentados en la figura 1. Como puede observarse la hidrocortisona ha de ser añadida desde el inicio del cultivo, puesto que en los cultivos en los que la adición se realizó en días sucesivos, no se apreció el efecto de incremento de la producción de inmunoglobulinas ya descrito.

Estos datos indican que este efecto es ejercido en los primeros momentos de la estimulación de las células por el PWM.

6.- EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE CULTIVOS DE LINFOCITOS DE AMIGDALA ESTIMULADOS CON PWM.

Se pretende observar si el efecto mencionado es también detectable sobre linfocitos provenientes de otros territorios del sistema inmune. Por su facilidad de obtención se eligió la amígdala. Con linfocitos de este órgano se hacen cultivos como los ya mostrados en el punto 2.

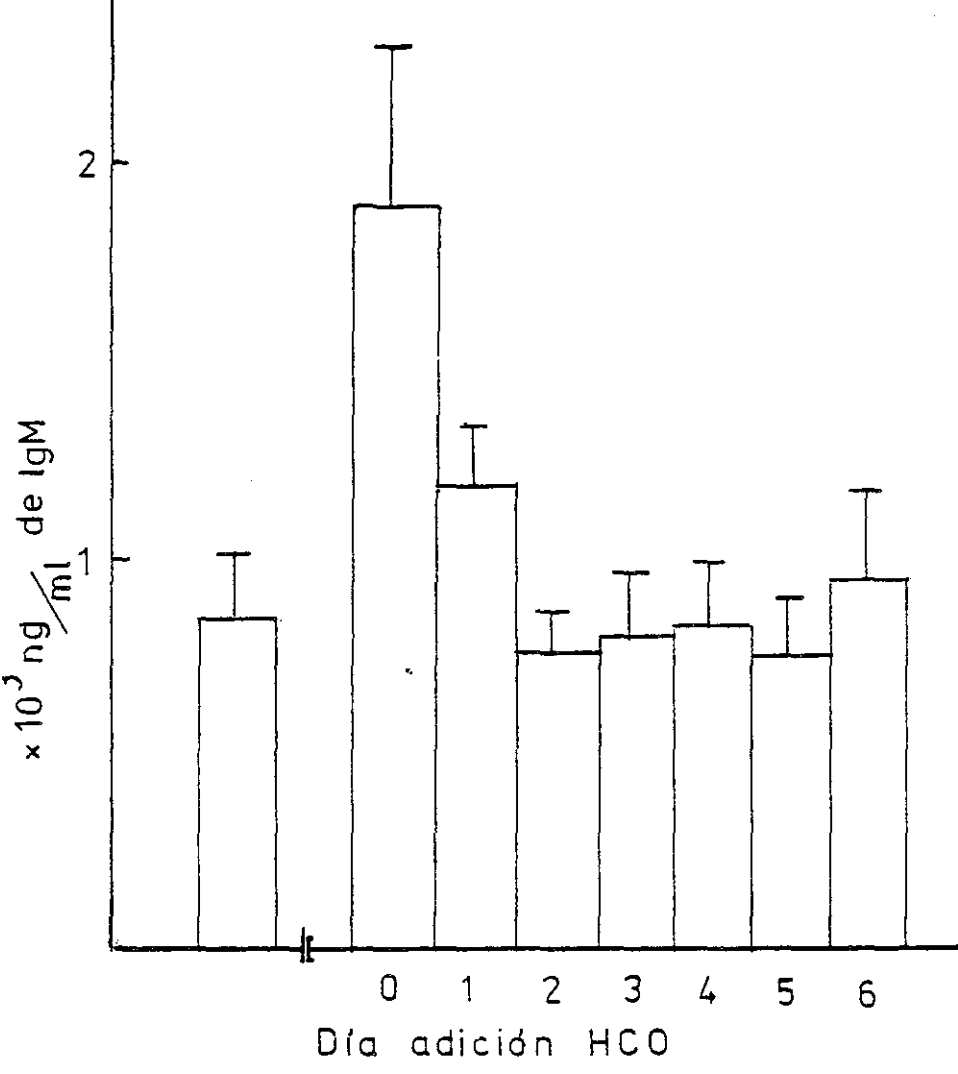
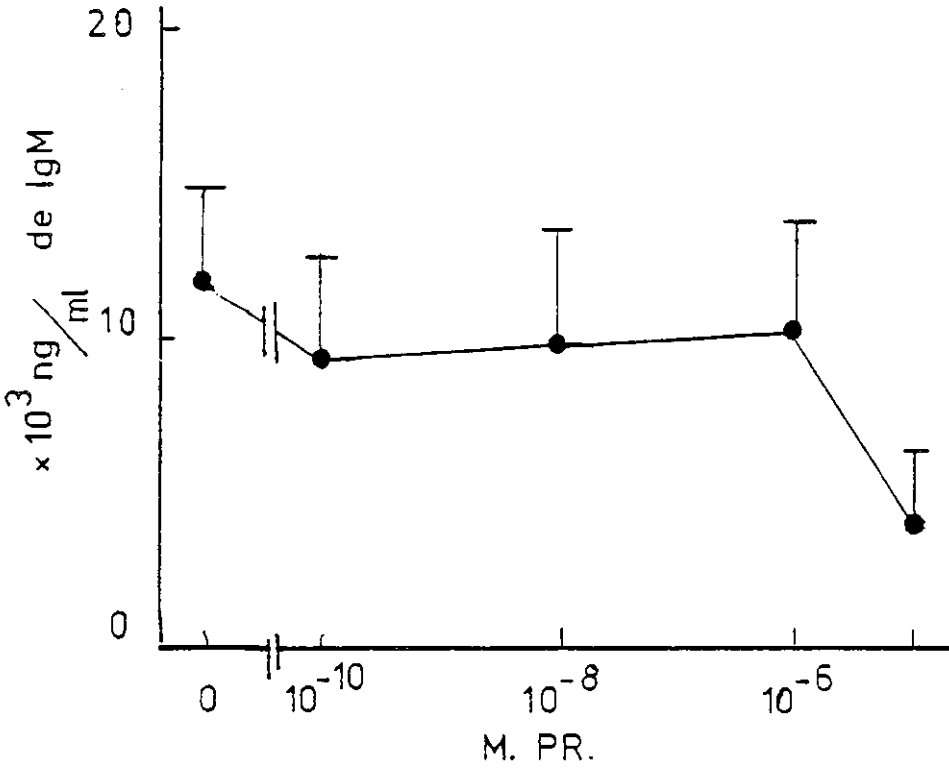
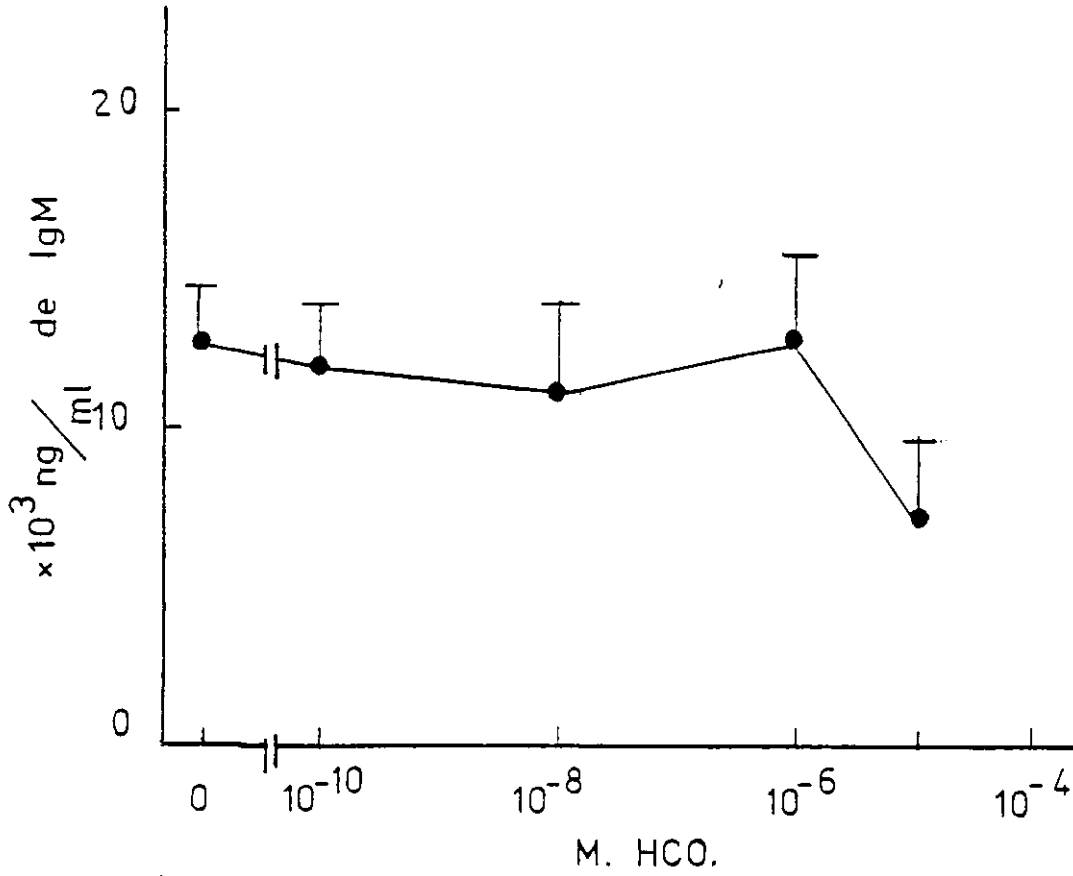


FIGURA 1: Efecto de la adición de 10^{-5} M de hidrocortisona en días sucesivos sobre la producción de IgM por los linfocitos sanguíneos estimulada por PWM.



GRAFICA 7: Efecto de hidrocortisona (HCO) y prednisolona (P_R) sobre la producción de IgM por linfocitos de amígdala (1x10⁶ linf. ml) estimulada por PWM.

Las medias y errores standard de las cantidades de IgM obtenidas en 12 experimentos pueden apreciarse en la grafica 7.

Como puede verse, la producción de inmunoglobulinas de los linfocitos obtenidos de amígdala es sensiblemente superior a la de sangre, lo que sugiere la existencia de diferencias entre los linfocitos de ambos territorios. No obstante a ninguna de las dosis de hidrocortisona y prednisolona usadas, se obtiene un efecto de aumento de la producción de inmunoglobulinas como el apreciado en cultivos de linfocitos sanguíneos. Los glucocorticoides no parecen producir, en este caso: ningún cambio significativo, si bien cabe destacar un discreto descenso observable a la dosis de 10^{-5} M.

Una de las posibles explicaciones de la diferencia observada entre el efecto de los glucocorticoides sobre la función de linfocitos de sangre y de amígdala, puede residir en las diferentes proporciones de subpoblaciones linfocitarias detectables entre estos órganos.

En este sentido, se pasó a cuantificar las distintas subpoblaciones en suspensiones celulares de sangre y amígdala. Se usó para ello el receptor para eritrocitos de carnero como marcador de linfocitos T, la inmunoglobulina de superficie para marcar linfocitos B y la tinción para esterases no específicas para identificar a la serie monocito-macrofágica. Se cuantificaron por tanto estos marcadores en 17 muestras de sangre y 9 de amígdala.

Las medias y errores standard de estas determinaciones se muestran en la tabla 9.

Como puede observarse existen notorias diferencias en el contenido de cada una de las subpoblaciones estudiadas, entre ambos territorios linfoides. Los Linfocitos T son mas numerosos en sangre (62%) que en amígdala (41%). Lo mismo ocurre con la cantidad de monocitos: 25% en sangre, 7% en amígdala.

MARCADORES CELULARES EN SANGRE Y AMIGDALA

	Linfocitos T	Linfocitos B	Monocitos
SANGRE	62 (± 14)	9 (± 5)	25 (± 3)
AMIGDALA	41 (± 7)	53 (± 9)	7 (± 2)

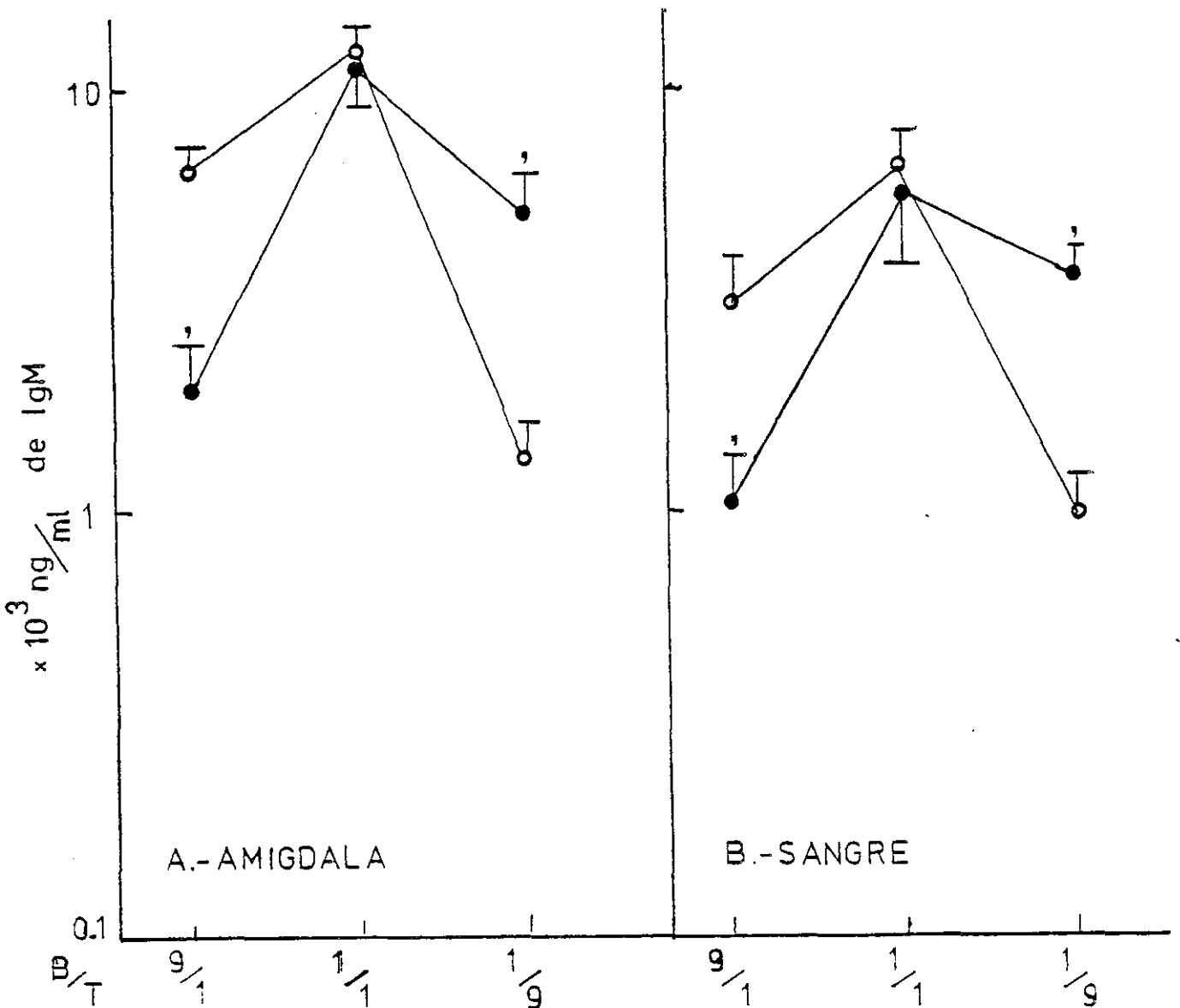
Por el contrario, la proporción de linfocitos B es mayor en amígdala (53%), que en sangre (9%). Por tanto la relación B/T en sangre es de 1/8 y en amígdala es cercana a 1/1

Se puede pensar, consecuentemente, que pueda residir en estas diferencias la explicación del diverso efecto encontrado entre ambos territorios.

7.- EFECTO DE LA HIDROCORTISONA SOBRE LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS DE CULTIVOS DE MEZCLAS DE POBLACIONES ENRIQUECIDAS EN LINFOCITOS B Y T DE SANGRE Y AMIGDALA ESTIMULADOS CON PWM.

Para ver la importancia que pudiera tener la diferente composición celular de la población linfocitaria objeto de estudio sobre la acción de la hidrocortisona en la producción de inmunoglobulinas, se obtuvieron poblaciones enriquecidas en linfocitos B y T y se mezclaron en diversas proporciones, manteniendo la concentración celular constante a 1×10^6 células/ml. Estos cultivos se estimularon con PWM y se les añadió o no hidrocortisona a $10^{-5}M$.

En la grafica 8A se exponen los resultados, expresados como medias y errores standard, de 9 experimentos realizados con linfocitos de amígdala. Cuando la relación B/T era de 9/1 los cultivos con glucocorticoide mostraban un notable descenso de la producción de inmunoglobulinas ($p < 0.01$). En cultivos con una relación B/T de 1/1 no se observaban cambios significativos al añadir hidrocortisona. En los cultivos con una relación B/T de 1/9 la adición de hidrocortisona conduce un aumento significativo ($p < 0.01$) de la producción de inmunoglobulinas.



GRAFICA 8: Efecto de 10^{-5} M de hidrocortisona en la producción de IgM de diversas mezclas de poblaciones B y T estimuladas con PWM. Sin hidrocortisona (círculos blancos) con 10^{-5} M hidrocortisona (círculos negros) , $p < 0.01$

En la gráfica 8B se muestran idénticos experimentos con poblaciones enriquecidas en linfocitos B y T de sangre. Los resultados son expresados como media y error standard de 7 experimentos. Como puede verse, con linfocitos sanguíneos se obtienen similares resultados a los ya mostrados para amígdala, siendo también el efecto de descenso en la relación B/T de 9/1 y el de aumento en la relación 1/9 producidos por la hidrocortisona a $10^{-5}M$, significativos ($p < 0.01$).

Estos experimentos indican que los efectos provocados por los glucocorticoides sobre linfocitos de ambos territorios linfoides son similares cuando se usan proporciones celulares parecidas.

Estos datos explican las diferencias encontrados para dicho efecto, entre poblaciones totales de linfocitos de sangre y amígdala. En aquellos, en los que la relación B/T es cercana a 1/9 se observa un marcado aumento; en estos, cuya relación B/T es próxima a 1/1, no se observa ninguna variación. Estos hechos son superponibles a los experimentos mostrados en este punto.

8.- ACCION DE LA HIDROCORTISONA SOBRE POBLACIONES LINFOCITARIAS ENRIQUECIDAS.

Se pretende estudiar si el efecto modulador de los glucocorticoides, se ejerce exclusivamente sobre los linfocitos B aportando a la activación de los mismos las señales cooperadoras necesarias, y suplantando de esta forma la función de los linfocitos T.

Se hicieron pues, cultivos de poblaciones enriquecidas en linfocitos B y T, y de mezclas de ambas poblaciones en una relación B/T de 1/3. Estas poblaciones se obtuvieron de sangre y de amígdala y se cultivaron a una concentración celular de

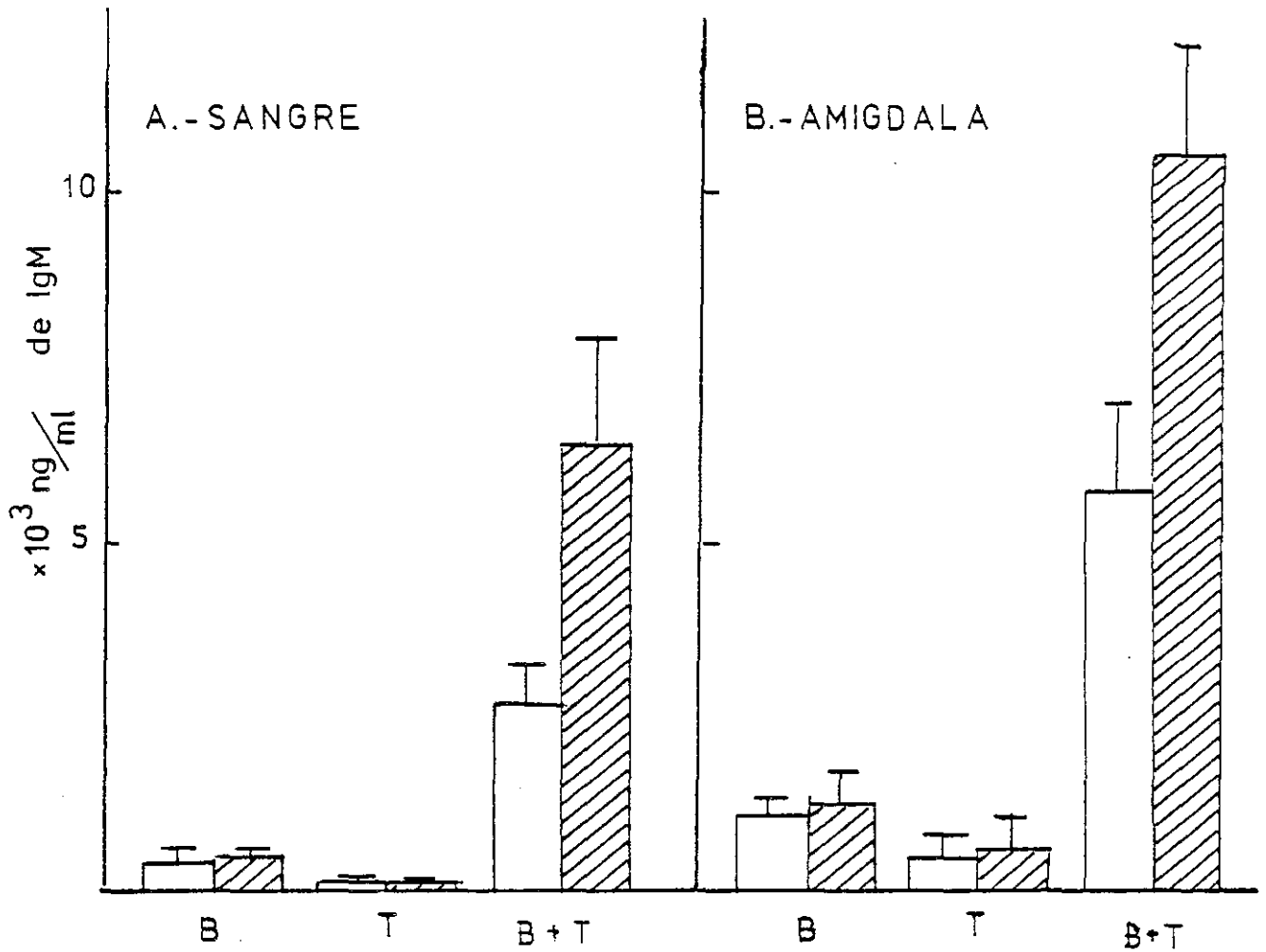


FIGURA 2:

El efecto de 10^{-5} M de hidrocortisona en la producción de IgM de poblaciones B y T, y mezcla B₁ + T₃ estimulada por PWM. Sin hidrocortisona (barras blancas) con 10^{-5} M hidrocortisona (barras rayadas).

1×10^6 células/ m^3 . Se estimularon con PWM y con PWM mas hidrocortisona a 10^{-5} M .

En la figura 2A se muestran las medias y errores de las cantidades de IgM producidas en 5 experimentos realizados con poblaciones sanguíneas.

En la figura 2B constan los mismos parámetros analizados en 6 experimentos con linfocitos de amígdala.

Como puede verse las poblaciones enriquecidas B y T de ambos territorios son incapaces de producir cantidades importantes de inmunoglobulinas cuando son estimulados con PWM. Esto se puede explicar porque en el caso de los linfocitos B carecen del requisito de la cooperación T y en el caso de los linfocitos T estos no pueden, obviamente, producir inmunoglobulinas. La producción, sin embargo es fácilmente conseguible en los cultivos de mezclas de ambas poblaciones celulares tras el estímulo con PWM.

Al añadir hidrocortisona se observa un marcado aumento de la producción de inmunoglobulinas en los cultivos de mezclas de ambas poblaciones, tanto si provenían de sangre como de amígdala. Sin embargo este efecto de aumento no es observado sobre la producción de inmunoglobulinas de poblaciones B o T aisladas.

Estos datos llevan a asumir, que el efecto de la hidrocortisona no se realiza por medio de un aporte a los linfocitos B, de señales cooperadoras similares a las generadas por los linfocitos T. Dicho efecto debe ejercerse por tanto sobre los tempranos mecanismos de interacción linfocitoB - linfocito T- monocito, engendrados en los cultivos tras el estímulo con PWM.

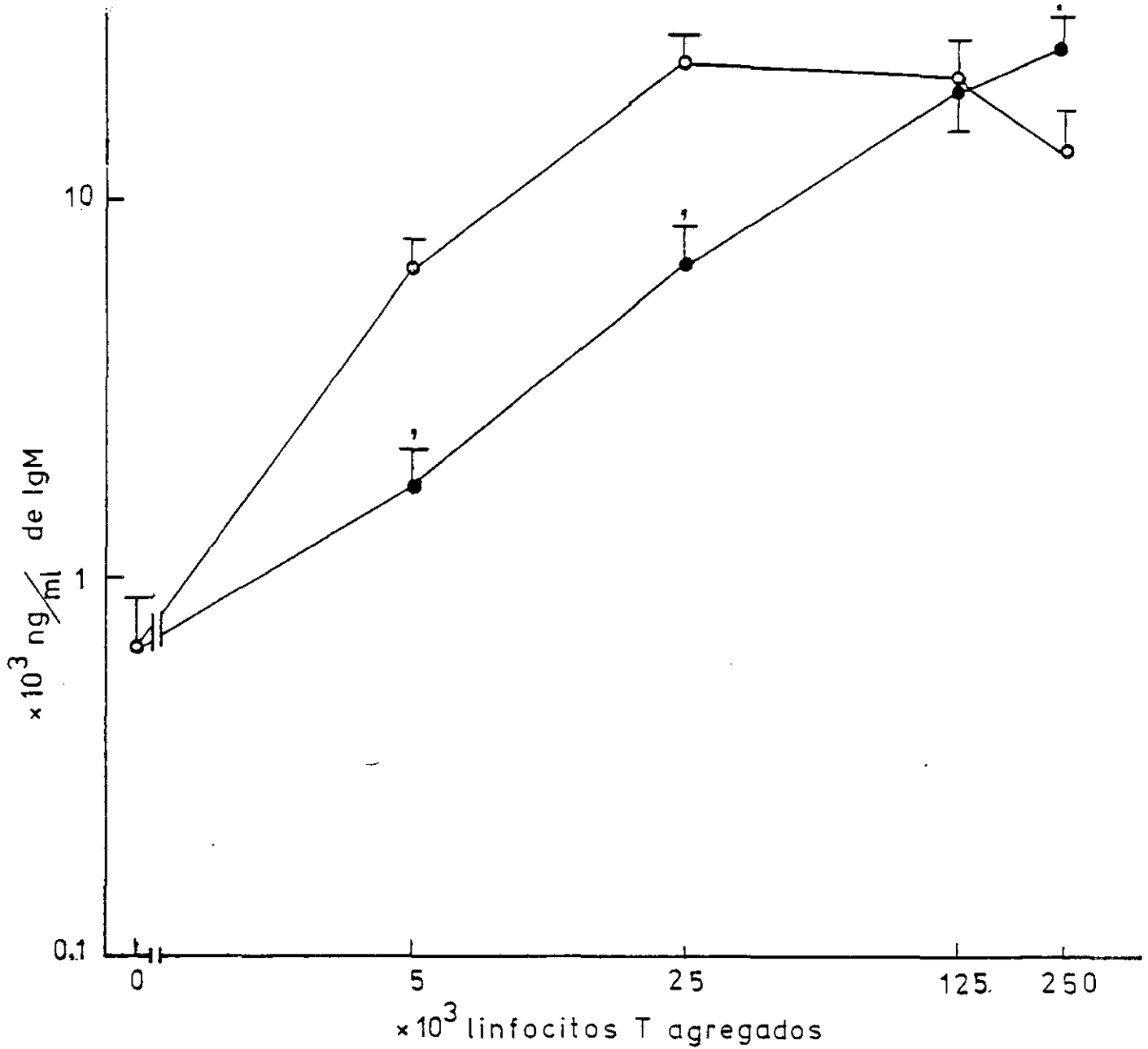
9.- REGULACION DE LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS DE UNA CANTIDAD CONSTANTE DE LINFOCITOS B MEDIANTE LA ADICION DE CANTIDADES CRECIENTES DE LINFOCITOS T EN CULTIVOS - ESTIMULADOS CON PWM; EFECTO DE LA HIDROCORTISONA.

Se hicieron cultivos con poblaciones enriquecidas B y T de amígdala en los que se añadían cantidades crecientes de linfocitos T (5000, 25.000, 125.000 y 250.000) a un número fijo de linfocitos B (250.000), en presencia de PWM. Con este tipo de cultivos se pretendía analizar fenómenos de regulación de los linfocitos T sobre los linfocitos B.

En la gráfica 9 se presentan las medias y errores standard de las cantidades de IgM obtenidas en 13 experimentos.

Como se observa en los cultivos que contenían exclusivamente PWM (curva de círculos blancos) a medida que se agregan linfocitos T, se va obteniendo un aumento de la producción de inmunoglobulinas, llegándose al máximo de producción en la relación B/T de 10/1. A partir de este punto, la adición de mayores cantidades de linfocitos T, conduce a un descenso de la producción de inmunoglobulinas, como resultado de un predominio de las señales reguladoras negativas sobre las positivas, predominantes en la fase anterior.

Los cultivos similares a estos, a los que se les añadió hidrocortisona a la concentración de $10^{-5}M$ (círculos negros) se comportan de manera diferente; la producción de inmunoglobulinas aumenta a medida que se agregan cantidades mayores de linfocitos T, pero se mantiene significativamente por debajo ($p < 0.005$) de los valores obtenidos en los cultivos que habían cursado en la ausencia de glucocorticoides; cuando la cantidad de linfocitos T aumenta hasta llegar a una relación B/T de 3/1, la producción de inmunoglobulinas tiende a igualarse o incluso a hacerse significativamente superior ($p < 0.05$) en aquellos cultivos en los que la relación B/T era de

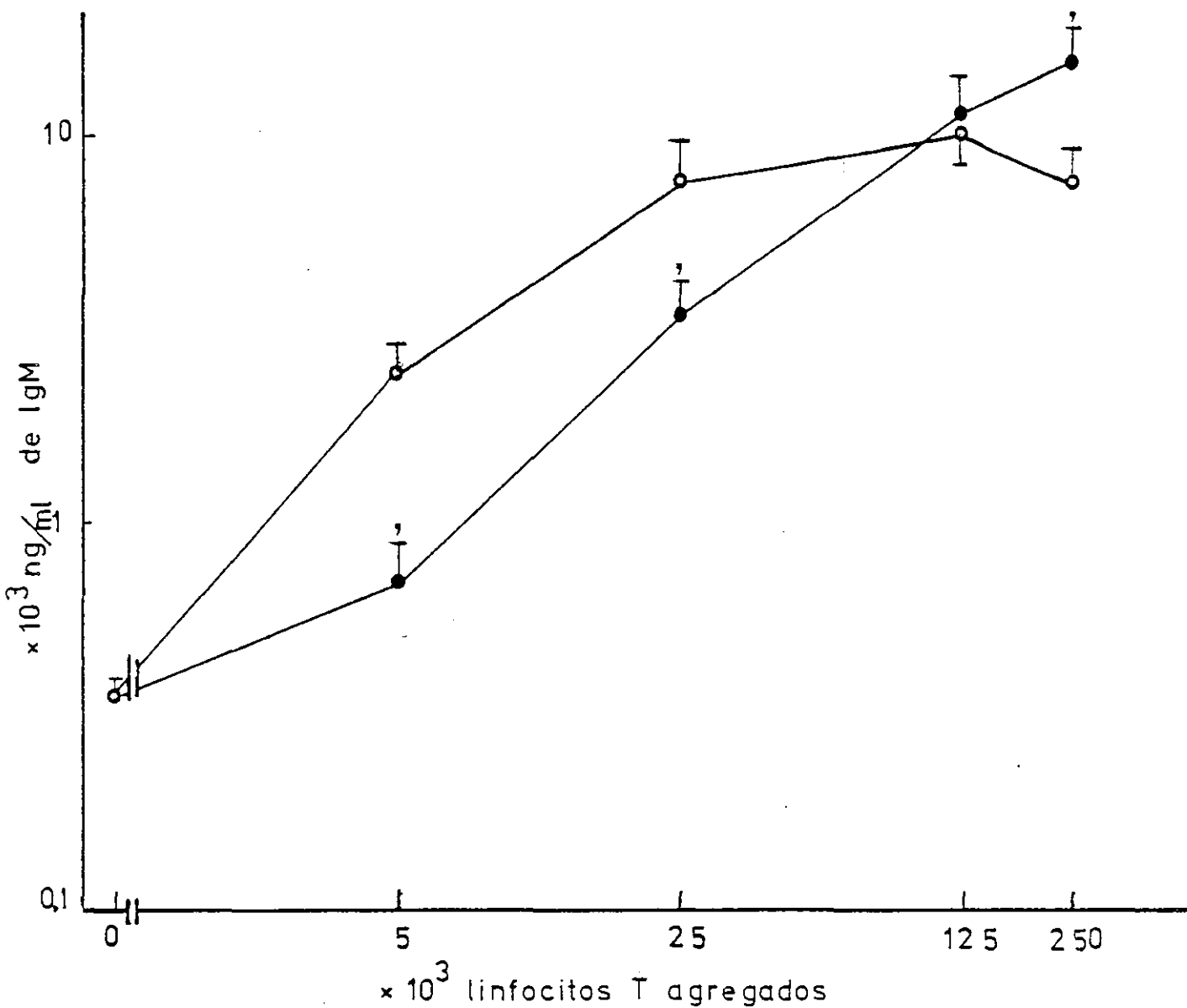


GRAFICA 9: Producción de IgM de cultivos estimulados por PWM en los que a 250×10^3 linfocitos B de amígdala se le agregan cantidades crecientes de linfocitos T de amígdala (círculos blancos). Efecto de $10^{-5}M$ de hidrocortisona (círculos negros), $p < 0.005$. $p < 0.05$

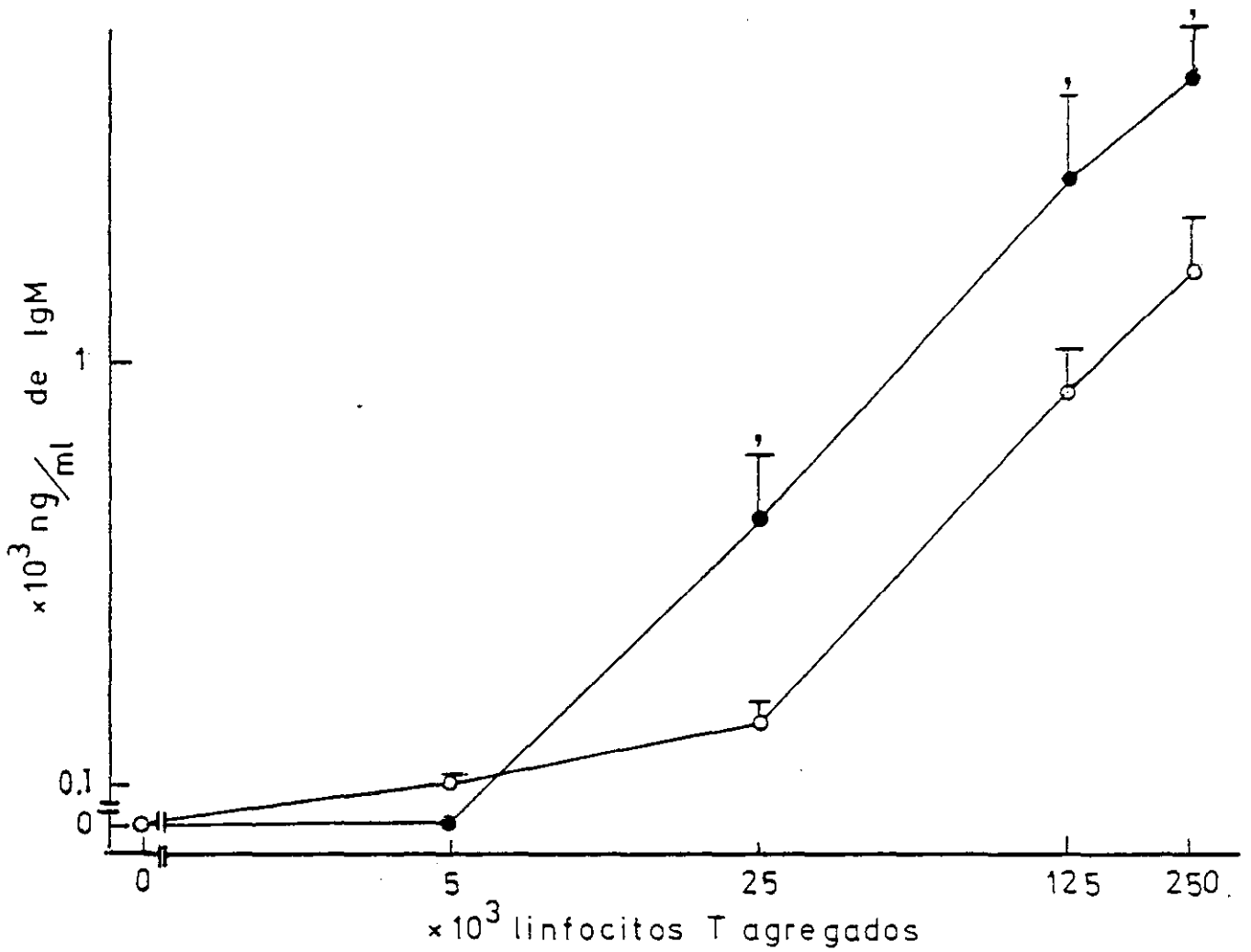
1/1 . El máximo conseguido en cultivos con glucocorticoides es superior al obtenido en los cultivos que no contenían este fármaco, y se obtuvo en una relación B/T de 1/1. Esto es, con glucocorticoides se necesita un número diez veces mayor de linfocitos T para conseguir el máximo de producción, y este es superior.

Parecidas conclusiones pueden extraerse de un experimento similar en el que se disminuyeron a la mitad el número de linfocitos B (125.000), como se desprende de la observación de la gráfica 10 (8 experimentos), la curva de producción de inmunoglobulina conseguida en los cultivos control (círculos blancos) es similar a la anterior, (la producción es menor puesto que hay la mitad de linfocitos B), salvo el hecho de que el máximo es conseguido cuando existía una relación B/T de 1/1. La curva de los valores obtenidos en cultivos en presencia de hidrocortisona (círculos negros), muestra parecido aspecto a la de la gráfica 9. Así, hay una primera fase en la que hay una relación entre linfocitos B y T, positiva para los primeros, en la que la curva de producción es significativamente inferior ($p < 0.01$) a la curva control. Ambas curvas se igualan en torno a una relación B/T de 1/1 y posteriormente la curva se hace significativamente superior ($p < 0.01$) a la curva control. El máximo obtenido en los cultivos a los que se les añadió glucocorticoides es también superior al de la curva control, y son requeridos asimismo mayor cantidad de linfocitos T para conseguirlo.

En la gráfica 11 se observan los resultados obtenidos en seis experimentos similares, cuando cantidades de linfocitos T iguales a las ya descritas se añaden sobre un bajo número de linfocitos B (72.500). La producción de inmunoglobulinas en los cultivos control va aumentando al agregar cantidades crecientes de linfocitos T (círculos blancos).



GRAFICA 10: Producción de IgM de cultivos estimulados con PWM en los que a 125×10^3 linfocitos B de amígdala se agregan cantidades crecientes de linfocitos T de amígdala (círculos blancos). Efecto de 10^{-5} M de hidro-cortisona (círculos negros), $p < 0.01$



GRAFICA 11: Producción de IgM de cultivos estimulados con PWM en los que a 62.5×10^3 linfocitos B de amígdala se agregan cantidades crecientes de linfocitos T de amígdala (círculos blancos). Efecto de 10^{-5} M de hidrocortisona (círculos negros) . $p < 0.05$

En los cultivos a los se añadió hidrocortisona (círculos ne_gros) producen menos inmunoglobulinas que los controles en relaciones B/T mayor de 1. Cuando la relación B/T es de 1 ó menos, la producción es superior ($p < 0.05$) en los cultivos con glucocorticoide.

Se hicieron cultivos similares a los descritos para la gráfica 9, con poblaciones linfocitarias enriquecidas B y T de sangre. Los resultados de 6 experimentos pueden observarse en la gráfica 12.

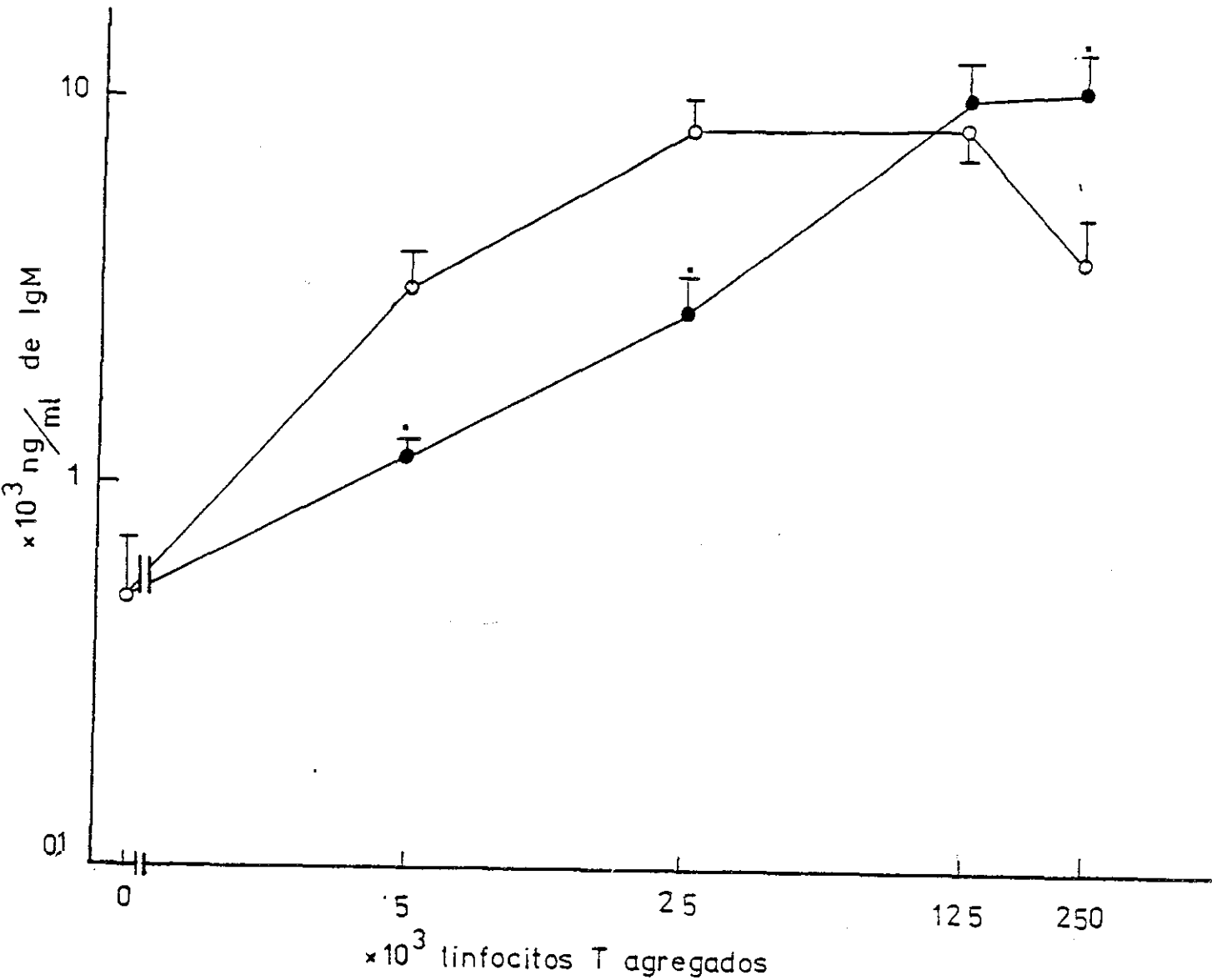
Como se ve el efecto ejercido por la hidrocortisona, es similar al descrito en la gráfica 9. Cuando la relación B/T era mayor de 1, dicho agente provoca una sensible disminución de la producción ($p < 0.05$). En la relación B/T de 2/1 no se ejerce efecto alguno. Cuando se agregaban mas cantidad de linfocitos T, la hidrocortisona aumentaba la producción de inmunoglobulinas ($p < 0.05$).

En la gráfica 13 se muestran los resultados de 3 experimentos, similares a los descritos en la gráfica 10, realizados con poblaciones de sangre.

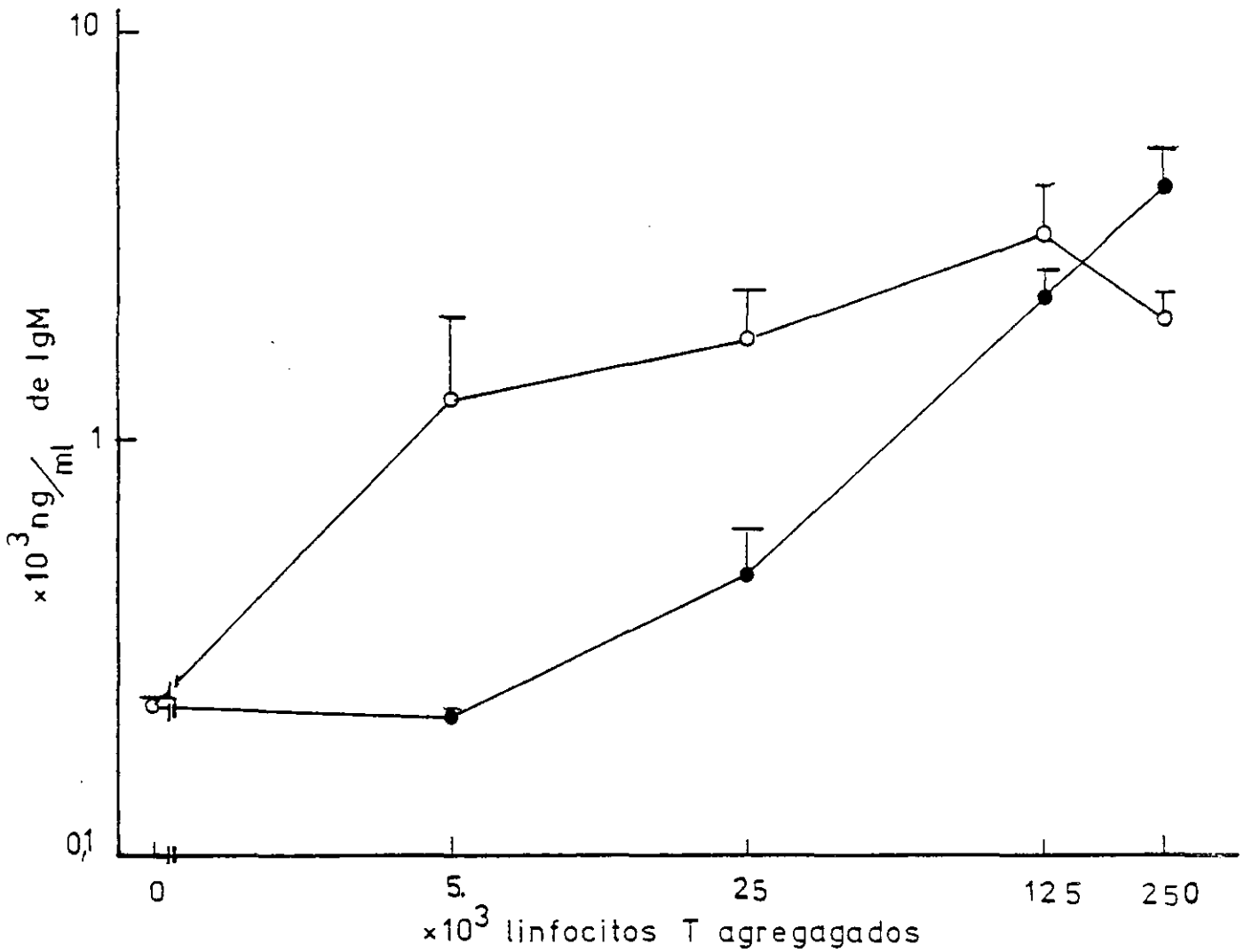
Como puede verse los efectos encontrados son idénticos a los ya comentados.

Estos experimentos demuestran que el efecto producido por la hidrocortisona, es similar en las poblaciones de sangre y amígdala, como era ya apuntado en los puntos anteriores.

Se han realizado experimentos con el mismo esquema operativo, para determinar cual es la dosis más activa de hidrocortisona (Tabla 10). Como puede verse no existen grandes diferencias entre usar concentraciones de hidrocortisona de 10^{-5} M ó 10^{-6} M (dosis farmacológicas). A dosis fisiológicas (10^{-8} M) sin embargo, no se observan los efectos descritos, obteniéndose valores no diferenciables de los cultivos sin hidrocortisona.



GRAFICA 12: Producción de IgM de cultivos estimulados con PWM en los que a 250×10^3 linfocitos B de sangre se agregan cantidades crecientes de linfocitos T de sangre (círculos blancos). Efecto de 10^{-5} M de hidrocortisona (círculos negros). $p < 0.05$



GRAFICA 13: Producción de IgM de cultivos estimulados por PWM en los que a 125×10^3 linfocitos B de sangre se le agregan cantidades crecientes de linfocitos T de sangre (círculos blancos). Efecto de 10^{-5} M de hidrocortisona (círculos negros)

x10³ LINFOCITOS T DE AMIGDALA AÑADIDOS A 250.0000 LINFOCITOS B DE AMIGDALA

	0	5	25	125	250
0	680.0 (±213.3)	6.511.5 (1154.1)	22.938 (3.712.9)	21.553.8 (6.050.4)	13.833.8 (4.252.6)
HCO 10 ⁻⁵ M		1.841.5 (460.2) p 0.005	6.900.0 (1.547.2) p 0.005	21.946.1 (3.580.7) --	24.950.7 (5.863.3) p 0.05
HCO 10 ⁻⁶ M		2.323.9 (687.1) p 0.01	8.135.0 (2.005.5) p 0.01	20.792.2 (4.137.6) --	22.888.6 (5.317.9) p 0.05
HCO 10 ⁻⁸ M		3.728.0 (1.811.4) --	19.920.0 (5.604.2) --	23.100.0 (7.433.5) --	14.400.0 (5.801.4) --

TABLA 10: Producción de IgM de cultivos estimulados por PWM en los que a 250x10³ linfocitos B de amígdala se le agregan cantidades crecientes de linfocitos T de amígdala. Efecto de hidrocortisona a diversas dosis.

El determinar si para el efecto de mayor producción de inmunoglobulina en cultivos de linfocitos estimulados con PWM y adicionados con hidrocortisona ($10^{-5}M$) era determinante la existencia de una relación B/T favorable a los T, no podía hacerse con el tipo de experimentos descritos, dado que el aumentar el número de linfocitos T, y por tanto la concentración de células en el cultivo por encima de $2 \times 10^6/ml$, daba lugar a malas condiciones de cultivo por sobrepoblación del mismo, que hace de difícil evaluación los resultados.

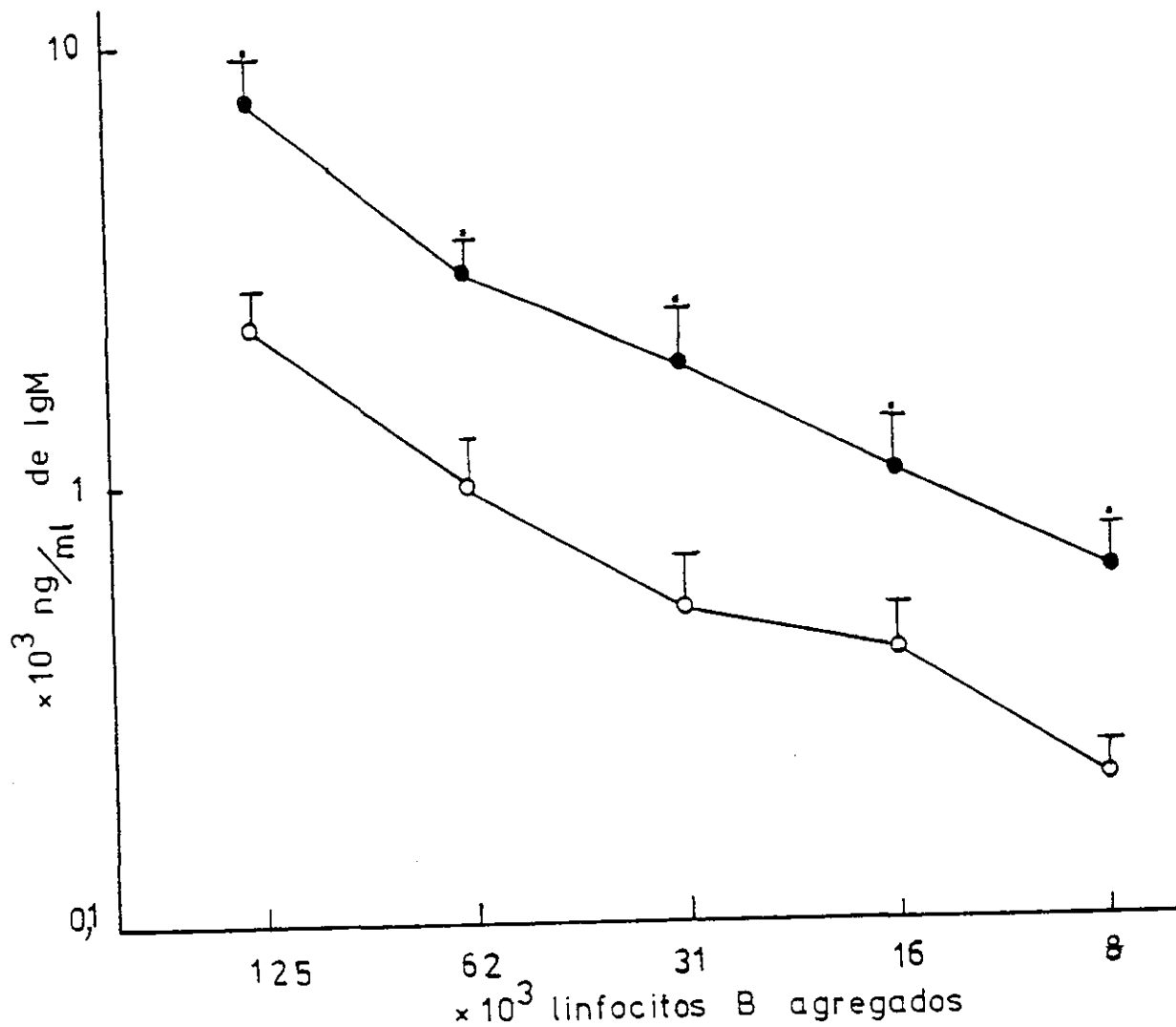
Por ello se hicieron cultivos en los que se mantenía una cantidad constante de linfocitos T (250.000), y se les iban agregando cantidades decrecientes de linfocitos B (125.000, 63.000, 31.000, 16.000, 8.000). Con ello se conseguían mezclas con una relación B/T menor de 1 y no afectadas por problemas de sobrepoblaciones en los cultivos.

Los resultados de la cantidad de IgM de 7 experimentos realizados con linfocitos de amígdala se muestran en la gráfica 14.

En ella se comprueba que la cantidad de IgM producida en los cultivos, desciende en relación al menor número de linfocitos B en el mismo. Cuando se agrega hidrocortisona a la concentración de $10^{-5}M$ (círculos negros), se consigue una curva paralela a la sin el agente (círculos blancos), pero constantemente superior ($p < 0.01$).

Esto viene a confirmar que el efecto de aumento de la producción de inmunoglobulinas inducida por el PWM, debido a la hidrocortisona, se mantiene de forma constante en la presencia de una relación B/T menor de 1.

Todos estos experimentos indican que los glucocorticoides ejercen un doble efecto sobre la producción de inmunoglobulinas en cultivos estimulados por PWM; en relaciones B/T mayores de



GRAFICA 14: Producción de IgM de cultivos estimulados por PWM, en los que a 250×10^3 linfocitos T de amígdala se le agregan cantidades decrecientes de linfocitos B de amígdala. Sin hidrocortisona (círculos blancos) con 10^{-5} M hidrocortisona (círculos negros) . $p < 0.01$

1 disminuyen la producción, y en relaciones B/T menores de 1 provocan un aumento de la misma.

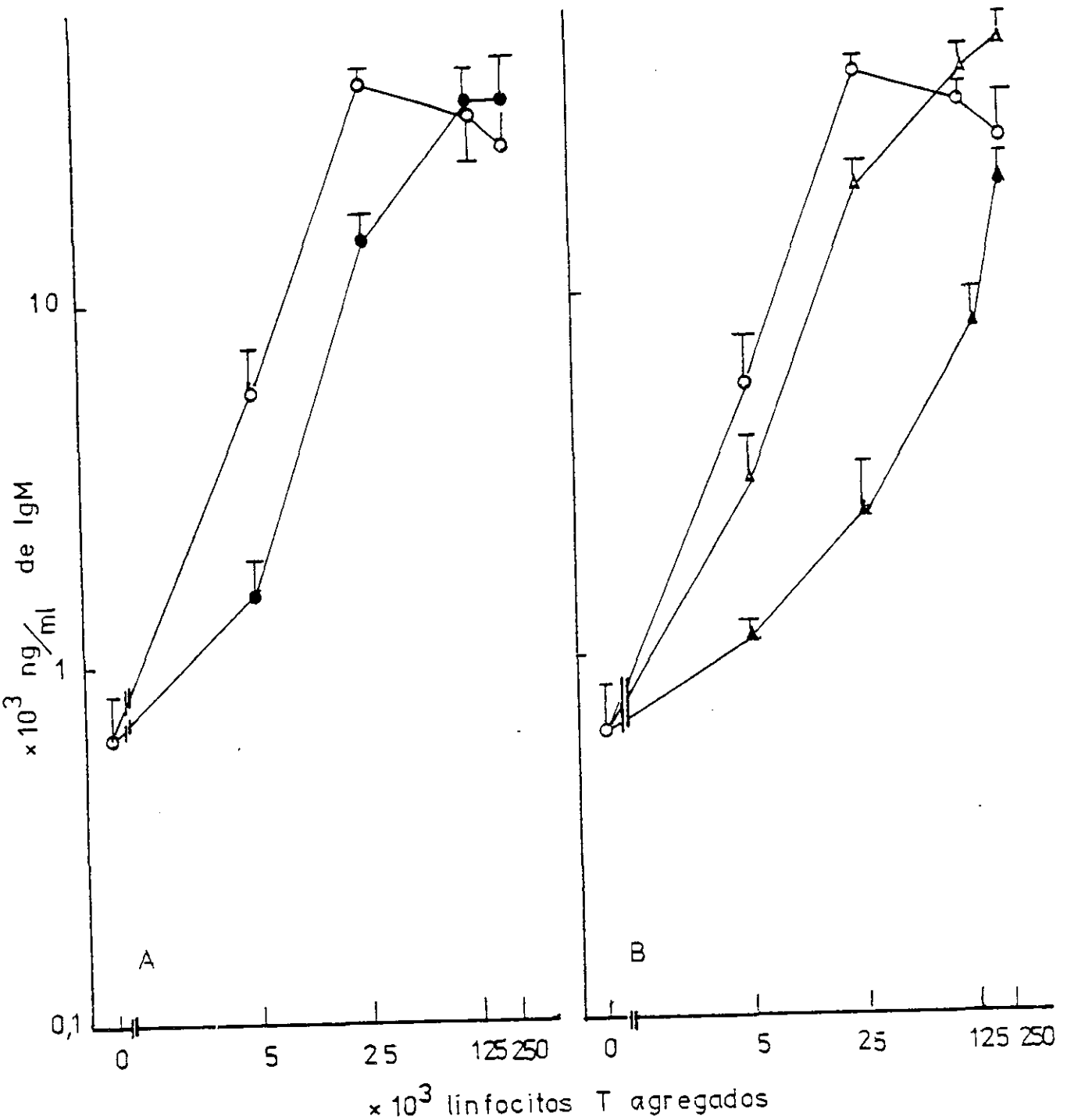
Estos efectos son ejercidos sobre los linfocitos, de forma independiente a la proveniencia de los mismos, puesto que son idénticamente demostrable en poblaciones de sangre y amígdala.

La actuación descrita para estos agentes son claramente observables a dosis farmacológicas de los mismos ($10^{-5}M$, $10^{-6}M$).

10.- COMPARACION DEL EFECTO DE LA HIDROCORTISONA Y LA IRRADIA- CION DE LINFOCITOS T SOBRE LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULI- NAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON PWM.

Se pretende comparar los efectos de los glucocorticoides en el sistema de producción de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos estimulados con PWM, con los efectos que linfocitos T irradiados a 2000 rads ejercen en el mismo sistema. Para ello se hicieron experimentos similares a los mostrados en la gráfica 9. Los resultados de cuatro experimentos pueden observarse en la gráfica 15.

En A se muestran el efecto de la hidrocortisona ya anteriormente descrito. En B se ha repetido el experimento anterior agregando linfocitos T (círculos blancos) y linfocitos T irradiados a 2000 rads (triángulos blancos) y además con $10^{-5}M$ de hidrocortisona (triángulos negros). Como puede verse, la acción de los linfocitos T irradiados sobre la producción de inmunoglobulinas es sensiblemente parecido al producido por los glucocorticoides; la producción de inmunoglobulinas es inferior en los cultivos en los que la relación B/T es mayor de 1, pero en torno a 1/1 se -



GRAFICA 15: Comparación del efecto de la hidrocortisona y la irradiación sobre la producción de IgM de cultivos de mezclas de linfocitos de amígdala estimulada por PWM. A) A 250x10³ linfocitos B se le agregan cantidades crecientes de linfocitos T. Sin hidrocortisona (círculos blancos) con - hidrocortisona (círculos negros). B) A 250x10³ linfocitos B se le agregan cantidades crecientes de linfocitos T (círculos blancos), linfocitos T irradiados a 2000 rads sin hidrocortisona (triángulos blancos), y con - 10⁻⁵ M hidrocortisona (triángulos negros).

hace superior. El máximo de producción conseguida con linfocitos T irradiados es superior, y desplazado a una relación B/T de 1.

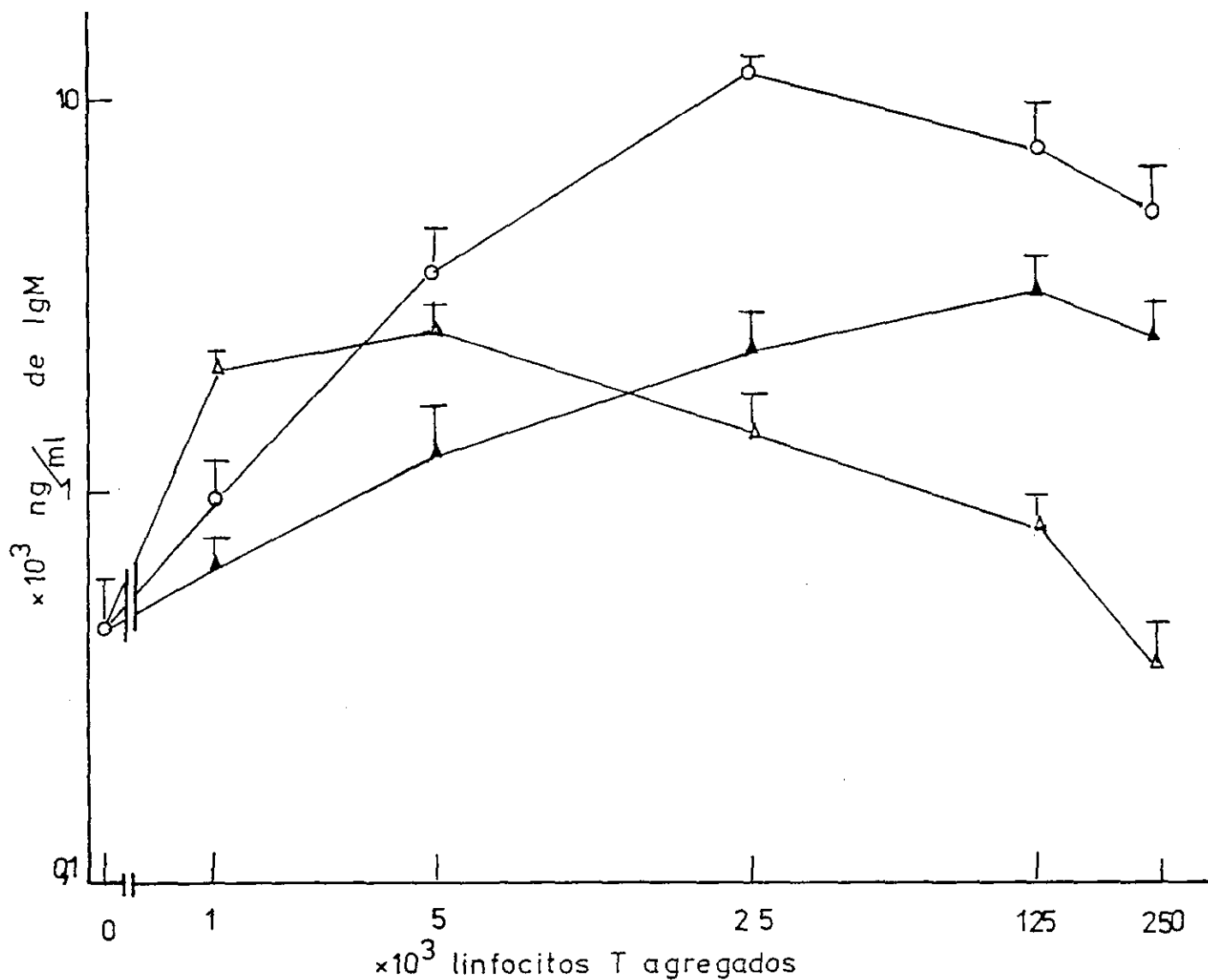
Cuando a estos cultivos se les añadía hidrocortisona (triángulos negros) se obtenía un nuevo desplazamiento de la curva de producción hacia la derecha, que se muestra como una curva agudamente ascendente.

De la comparación de A y B puede deducirse que los mecanismos que intervienen en el efecto descrito para los glucocorticoides, pueden ser los mismos que los involucrados en la actividad de los linfocitos T irradiados, ya que los resultados finales son similares. Por otra parte ambas actividades son adicionables, ya que la suma de las mismas (triángulos negros) produce también una suma de efectos.

11.- EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD REGULADORA DE LINFOCITOS T PRETRATADOS CON CON A EN LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON PWM.

Los linfocitos T cultivados durante 48 horas en presencia de Con A a dosis mitogénicas (10 µgr/ml), presentan una actividad reguladora predominantemente negativa sobre la producción de inmunoglobulinas estimuladas con PWM, como se ha descrito previamente. Se persigue en estos experimentos ver el efecto que la hidrocortisona ejerce sobre esta actividad.

Por ello se estudiaron poblaciones de amígdala, agregándose a una cantidad constante de linfocitos B (250.000) cantidades crecientes (1000, 5000, 25000, 125000, 250000) de linfocitos T controles precultivados sin Con A (círculos blancos) , precultivados con Con A (triángulos blancos) y precultivados con



GRAFICA 16: Producción de IgM en cultivos de linfocitos de amígdala - estimulados por PWM. A 250×10^3 linfocitos B se le agregan cantidades crecientes de linfocitos T precultivados sin Con A (círculos blancos) linfocitos T precultivados con Con A sin hidrocortisona (triángulos - blancos), y con 10^{-5} M hidrocortisona (triángulos negros). Las significaciones se detallan en el texto.

Con A y adicionados al inicio del cocultivo con 10^{-5} M hidrocortisona (triángulos negros).

Los resultados de 6 experimentos se expresan en la gráfica 16. Como puede verse los linfocitos pretratados con ConA se comportan de forma distinta a los precultivados sin ConA. Mientras que estos dan lugar a una curva de producción de inmunoglobulinas similar a la que producen linfocitos T controles, aquellos dan mayor produccción de inmunoglobulinas cuando son agregadas muy pequeñas cantidades de linfocitos T - ($p < 0.01$) siendo sin embargo mucho más bajas en los cultivos con mayores cantidades de linfocitos T ($p < 0.001$). El pretratamiento con Con A provoca por tanto un desplazamiento del máximo de producción hacia la izquierda (relación B/T de 250/1 ó 100/1), así como una disminución del mismo y un predominio de la actividad negativa en el sistema.

Cuando se compara el efecto de los linfocitos T tratados con Con A (triángulos blancos), con los mismos al añadirseles hidrocortisona a 10^{-5} M (triángulos negros), se observa que en el segundo caso existe una disminución de la actividad cooperadora inicial ($p < 0.01$), y un aumento de la producción de - inmunoglobulinas por encima de la conseguida sin glucocorticoides en la fase de acción supresora de estas células ($p < 0.05$).

No obstante la reversión obtenida por la hidrocortisona sobre la actividad de los linfocitos tratados con Con A, no se consigue inhibir absolutamente la función de estas células, - ya que las producciones de inmunoglobulinas alcanzadas siguen siendo inferiores a las inducidas por linfocitos T precultivados sin Con A.

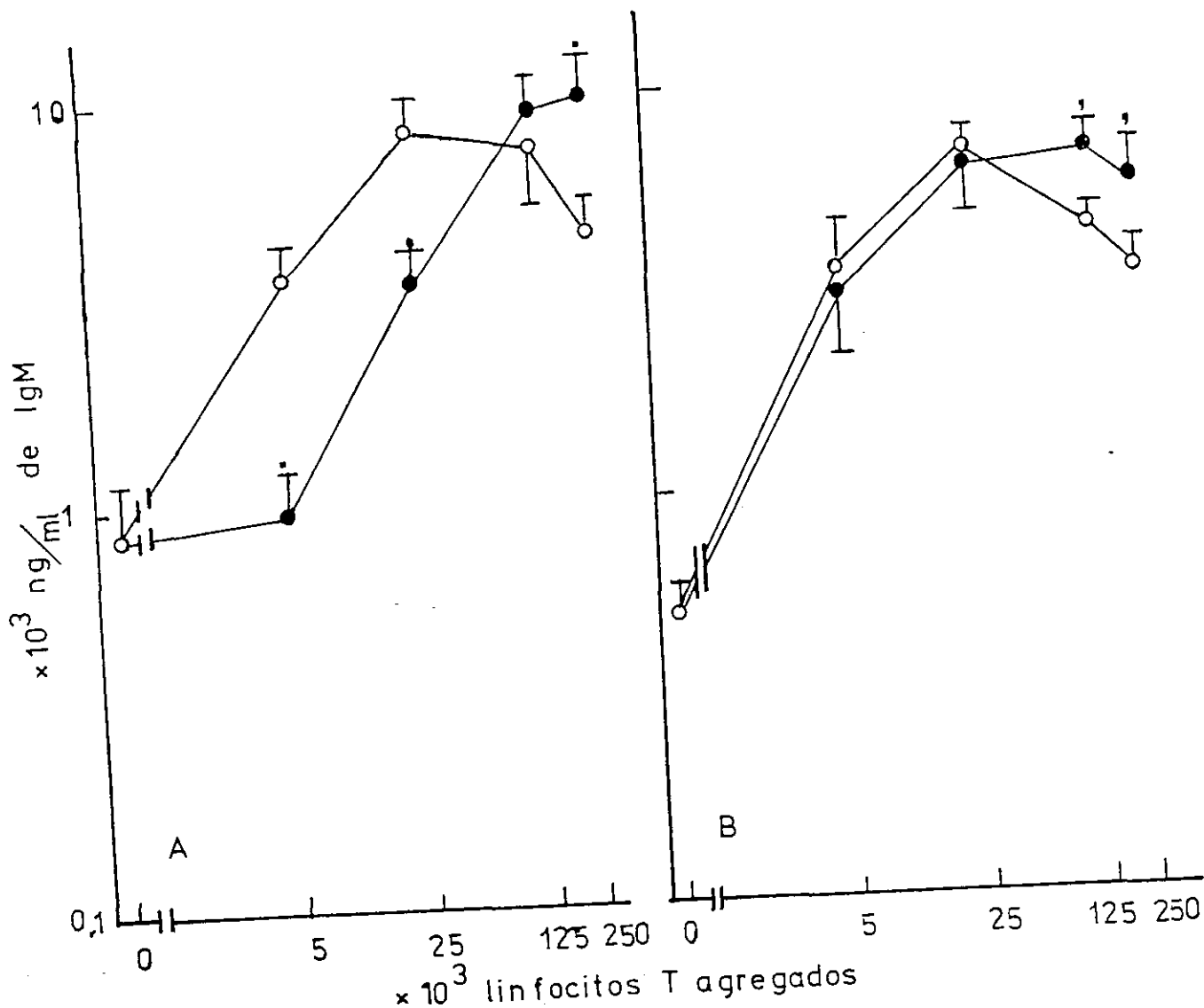
Estos datos indican, que la hidrocortisona revierte de forma parcial, pero significativamente. la función supresora - de los linfocitos T pretratados con Con A.

12.- EFECTO DE LA DISMINUCION DE CELULAS ENE POSITIVAS (MONOCITOS) SOBRE LA ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON PWM.

El propósito de estos experimentos era ver el papel, - que en el efecto ejercido por los glucocorticoides en este sistema, juegan los monocitos, siendo esta población identificada por su tinción positiva para esterasas no específicas. Mediante técnicas de adherencia se obtuvieron poblaciones linfocitarias de amígdala relativamente deplecionadas en células identificadas por este marcador como de la serie monocito-macrófago. Con estas técnicas se consiguió disminuir la proporción de monocitos de un 5,2% ($\pm 1-8$) a un 1% (± 0.5) ($p < 0.01$). Se compararon para el efecto que nos ocupa, mezclas como las descritas para la gráfica 9, de poblaciones controles (A) o poblaciones deplecionadas de monocitos (B). Los resultados de 6 experimentos se exponen en la gráfica 17.

Como se ve en A los resultados son similares a los expuestos ya anteriormente como era de esperar; curva de producción en los cultivos control (círculos blancos) y curva de cultivos tratados con hidrocortisona (círculos negros). En presencia de una relación B/T mayor de 1, la producción de inmunoglobulinas es inferior al añadir hidrocortisona ($p < 0.05$). En presencia de una relación B/T de 1/1, la producción es incrementada por el agente ($p < 0.05$).

Cuando se hace el mismo experimento con poblaciones deplecionadas de monocitos (B), se observa que los cultivos sin hidrocortisona dan lugar a una curva de producción de inmunoglobulinas (círculos blancos) parecida a su análoga en A, si bien cabe destacar que en algunos puntos es discretamente inferior.



GRAFICA 17: Efecto de la hidrocortisona sobre la función de los monocitos. Producción de IgM en cultivos de linfocitos de amígdala estimulados con PWM. A 250×10^3 linfocitos B se le agregan cantidades crecientes de linfocitos T. A) Poblaciones sin deplecionar - ($5.2\% \pm 1.2$ monocitos). B) Población deplecionada ($1\% \pm 0.5$ monocitos). Sin hidrocortisona (círculos blancos) con 10^{-5} M hidrocortisona (círculos negros). $p < 0.05$, $p < 0.01$

Cuando se añade hidrocortisona (círculos negros) se aprecia la producción de inmunoglobulinas en los puntos en los que la relación B/T es muy favorable a los linfocitos B ser similar a la de los cultivos no tratados con hidrocortisona, de forma contraria a lo observado en A. Cuando la relación B/T se acerca a 1, se observa un aumento de la producción de inmunoglobulinas ($p < 0.01$) similar al detectado en A.

Estos experimentos sugieren que la acción depresora de los glucocorticoides en presencia de una relación B/T mayor que 1 se encuentra vehiculado por los monocitos, ya que la depleción de los mismos se acompaña de la desaparición de este efecto. Sin embargo la presencia o no de monocitos no parece jugar papel en el efecto incrementador de la producción de inmunoglobulinas que median estos agentes en cultivos de linfocitos con relación B/T igual o inferior a 1.

Para asegurar este punto se hicieron 8 experimentos - (figura 3) con linfocitos totales de sangre, que, como ya se expuso, tienen una relación B/T muy inferior a 1. Para ello se compararon poblaciones linfocitarias sanguíneas deplecionadas (barras rayadas) o sin deplecionar (barras blancas) de monocitos por técnicas de adherencia, y se les añadió hidrocortisona (B) o no (A). La disminución de monocitos obtenida - por técnicas de adherencia, redujo el número de los mismos - desde un 24,8% (± 2.7) a un 6,3% (± 1.6) ($p < 0.01$).

Como puede observarse en A al deplecionar monocitos se obtiene un descenso de la producción de inmunoglobulinas ($p < 0.05$). Cuando se adiciona hidrocortisona a 10^{-5} M (B), se consigue un aumento de la producción de inmunoglobulinas, tanto para la población no deplecionada ($p < 0.05$), como para la deplecionada ($p < 0.01$).

Esto confirma, que el efecto de aumento de la producción de inmunoglobulinas que genera la adición de glucocorticoides en cultivos con una relación B/T inferior a 1, es independiente de la presencia de monocitos.

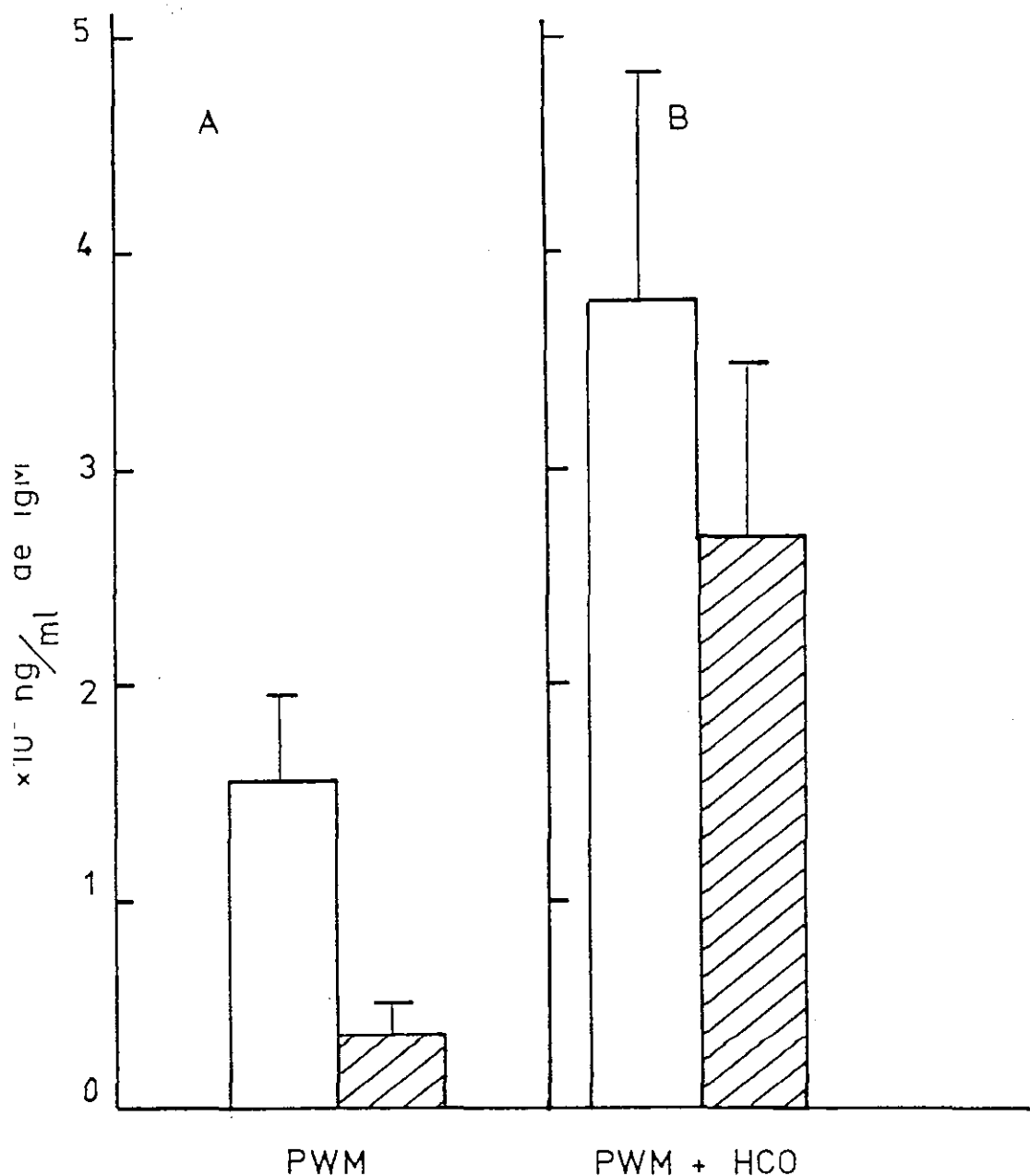


FIGURA 3:

Efecto de la hidrocortisona sobre la función de los monocitos. Producción de IgM en cultivos de linfocitos de sangre (1×10^6 linf/ml) - estimulados por PWM. Poblaciones sin deplecionar ($24.8\% \pm 2.7$ monocitos) (barras blancas), y deplecionadas ($6.3\% \pm 1.6$ monocitos) (barras rayadas). A) sin hidrocortisona. B) Con 10^{-5} M hidrocortisona. Significaciones constan en el texto.

DISCUSSION

En el presente trabajo se ahonda en la acción que ejercen los glucocorticoides sobre diversas funciones de los linfocitos humanos in vitro.

En primer lugar se estudian los efectos de estos agentes sobre la proliferación de los linfocitos estimulados con mitógenos. Dicha proliferación requiere obviamente síntesis de DNA, por lo que para medirla se ha usado una técnica de seguimiento de la neoformación de esta macromolécula revelada por la incorporación de timidina tritiada. Los glucocorticoides provocan una inhibición de la proliferación en los experimentos presentados. Esta inhibición es dosis-dependiente, y no se debe, dentro del rango de concentraciones usadas, a un efecto de toxicidad celular. La inhibición, muy suave a concentraciones fisiológicas de estos fármacos, se hace mas consistente a concentraciones farmacológicas (dato que es útil resaltar como veremos mas adelante), aunque respetando gran parte de la actividad proliferativa de las células. La respuesta a los diferentes mitógenos testados (PHA, PWM, y Con A) muestran una inhibición paralela tras la adición de estos agentes, aunque es algo mayor para la estimulación por Con A y menor para PWM, siendo intermedio el efecto para la PHA. Los dos glucocorticoides usados muestran parecido grado de actividad. Estos resultados en su conjunto están de acuerdo con lo publicado por otros (FAUCI, A.S., DALE, D.C., y BALOW, J.E., 1976), (YU, D.T.Y. 1977).

Este efecto de inhibición de la proliferación linfocitaria por mitógenos, no debe entenderse como una acción homogénea sobre todos los linfocitos, sino mas bien, como un efecto específico sobre determinadas poblaciones de los mismos. Asi en cultivos estimulados con PHA, se ha comprobado que dexametasona a dosis farmacológicas, provoca un aumento de linfocitos T portadores de receptores para el Fc de la IgM (TILLYER, C.R., y BUTTERWORTH, P.H.W. 1980). En cultivos no estimulados de linfocitos T humanos se ha comprobado, que tras la adición

de hidrocortisona y metilprednisolona en estas dosis, se produce una disminución de linfocitos T con receptores para el Fc de la IgG (GUPTA, S, y GOOD, R.A., 1977). Estos hechos sumados a los efectos diferenciales que estos fármacos poseen sobre la cinética de supoblaciones de linfocitos in vivo, - sugieren que el efecto demostrado sobre la proliferación se halla ligado a acciones específicas sobre diversas subpoblaciones celulares en juego en este sistema.

Posteriormente se ha analizado la acción de estos fármacos sobre la producción de inmunoglobulinas por linfocitos humanos. Esto se ha realizado en un sistema de cultivos de - linfocitos estimulados con PWM. Este mitógeno es capaz de estimular in vitro el paso de linfocitos B a plasmáticas, y - por consiguiente la síntesis presenta la ventaja de ser T-dependiente, por lo que puede ser usado en el estudio de la - interacción celular y de la regulación de la respuesta. La - medida de las inmunoglobulinas producidas se ha efectuado mediante una sensible técnica de RIA.

En contraste con el efecto de inhibición encontrado para la proliferación, la producción de inmunoglobulinas es amunta da tras la adición de hidrocortisona o prednisolona. Este amento ocurre en cultivos de linfocitos sanguíneos a dosis farmacológicas ($10^{-5}M$ a $10^{-6}M$). A dosis fisiológicas ($10^{-7}M$ - $10^{-8}M$) el efecto era menos llamativo. Este hallazgo coincide con el - descrito por otros autores (FAUCI, A.S., PRATT, K,R., y WHAL- EN,G., 1977), (COOPER, D.A., DUCKETT, M., PETT, V., y PENNY, R.(1979). El grado de aumento es aproximadamente el doble de - la producción alcanzada en los cultivos a los que no se añadía glucocorticoides siendo esto similar a lo detectado por FAUCI y cols. 1977).

Aunque el efecto de aumento era similar para las tres clases principales de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), era mas

significativo para la IgM. Este dato contrasta con lo encontrado por COOPER y cols.(1979), ya que estos autores encontraban mas significativo el efecto para la IgG. Esta disparidad puede posiblemente explicarse por el uso de diferentes reactivos en la técnica de detección. No se observan diferencias entre los efectos producidos por prednisona o hidrocortisona. COOPER y cols (1979) han ampliado este estudio usando otros glucocorticoides, encontrando parecida actividad en todos ellos.

El efecto de aumento de producción de inmunoglobulinas - de linfocitos sanguíneos, no se debe a una mayor capacidad productora de cada célula plasmática, sino a la generación de un mayor número de estas células, como sugiere el hallazgo de un aumento paralelo al de la producción de inmunoglobulinas, de las células etiquetables como plasmacitoides por su tinción citoplasmática con suero antiinmunoglobulinas fluorescinado. Por lo tanto estos agentes hacen madurar mayor cantidad de linfocitos B hacia su transformación en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas.

La cinética de la secreción de inmunoglobulinas en estos cultivos no sufre cambios significativos con la adición de los glucocorticoides hasta el quinto día de cultivo. A partir de aquí, se aprecia un aumento significativo de la producción de inmunoglobulinas.

Si bien los glucocorticoides solos no ejercen acción alguna sobre la producción de inmunoglobulinas de cultivos no estimulados, el efecto descrito se manifiesta claramente sobre los cultivos estimulados con PWM. Pero para ello es necesario que estos agentes se adicionen al cultivo en los primeros momentos del mismo. En los experimentos mostrados cuando se añade el fármaco a las 24 horas de iniciado el cultivo, se detecta un muy ligero efecto, si se compara con los cultivos a los que se adicionó el agente en el inicio del mismo, y no se observa

efecto cuando se añade a las 48 horas. Estos hechos coinciden con los descritos por FAUCI y cols. (1977) y COOPER y cols. (1979). Experimentos en los que se adicionaba glucocorticoides para producir un aumento en la producción de anticuerpos específicos en cultivos estimulados con antígeno, se requería la presencia de estos agentes en los primeros días de cultivo, pero no eran necesarios en la propia fase de producción de anticuerpos (HALLYDAY, W.J., y GARVEY, J.S. 1964). FAUCI y cols. (1977) han mostrado que linfocitos precultivados con hidrocortisona y posteriormente lavados no producían mayor cantidad de inmunoglobulinas cuando eran estimulados con PWM, siendo necesaria la presencia conjunta de ambas sustancias para producir el efecto. Estos datos sugieren que los glucocorticoides actúan sobre los primeros momentos de la activación linfocitaria por el PWM.

El efecto de los glucocorticoides no se ejerce mediante señales cooperadoras directas sobre los linfocitos efectores en este sistema: los linfocitos B. Poblaciones enriquecidas en linfocitos B son incapaces de producir cantidades apreciables de inmunoglobulinas como respuesta al PWM, y esto no se modifica con la adición de glucocorticoides. Sin embargo el efecto puede reproducirse al añadir a estos cultivos linfocitos T. Por lo tanto los glucocorticoides por sí mismos no aportan señales cooperadoras similares a las generadas por los linfocitos T.

La producción de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos de amígdala en respuesta al PWM, no se ve afectada de la misma forma que la de linfocitos sanguíneos. Este hecho sugiere la posibilidad de que el fenómeno descrito se encuentre en relación con las diferencias existentes entre ambos territorios. Estas diferencias son en primer lugar, las inherentes a las desiguales proporciones que de las diferentes subpoblaciones celulares involucradas, existen entre estos órganos. Así mientras la relación B/T en la amígdala es próxima a 1, en la sangre es muy inferior a esta cifra.

Ello condujo a estudiar el fenómeno descrito mezclando linfocitos B y T en diferentes proporciones. Estos experimentos confirmaron el supuesto de que estas sustancias, poseen un papel modulador sobre la producción de inmunoglobulinas - en este sistema. Así en poblaciones de linfocitos en los que la relación B/T es inferior a 1, ya sea artificialmente creada como en estos experimentos, o naturalmente existente como en el caso de los linfocitos sanguíneos, los glucocorticoides actúan acrecentando la producción de inmunoglobulinas. Por el contrario en poblaciones celulares con una relación B/T superior a 1, los glucocorticoides conducen a un significativo descenso de la producción de inmunoglobulinas. En situaciones de relación B/T próxima a 1, como ocurre en la amígdala, los glucocorticoides no modifican significativamente la producción de inmunoglobulinas. Según esto la diferente modulación ejercida por estos agentes sobre la respuesta al PWM de linfocitos de sangre y amígdala, puede ser explicada por las diversas relaciones B/T existentes, más que expresar diferencias sustanciales entre ambas poblaciones. No obstante es necesario señalar, lo significativamente más elevada respuesta de los linfocitos de amígdala, en relación con los de sangre. La explicación de este hecho puede residir en el distinto carácter de estos territorios: la sangre como órgano de relación, y la amígdala como órgano de respuesta ante los antígenos del tubo digestivo, y por lo tanto con linfocitos más activados.

Una serie de autores (SAXON, A.R., y cols. 1977), (DE LA CONCHA, E., y cols. 1977), (PLATTS-MILLS, T., A.E., y cols. 1979), (ASHMAN, R.S., y cols. 1980) han utilizado en este sistema los cultivos en los que se agregan cantidades crecientes de linfocitos T a una cantidad fija de linfocitos B, como medio de análisis de la interacción celular. Con este tipo de experimentos se obtiene una curva de producción de inmunoglobulina

en respuesta al PWM de tipo gaussiano. Cada punto de la misma es entendido como la resultante de un balance entre los efectos positivos y negativos, que se generan en el sistema. - Estos efectos son fundamentalmente producidos por diferentes poblaciones de linfocitos T, bien cooperadores o supresores. En los seres humanos no se tiene la posibilidad de distinguir claramente estas subpoblaciones de linfocitos T reguladores, aunque su existencia e importancia son mas que probables. Por todo ello se asume que en este sistema, la mayor producción de inmunoglobulina en la primera fase de la curva es expresión de un predominio de la función de los linfocitos T cooperadores sobre los T supresores, y lo contrario en la fase descendente de la curva. No obstante no se conoce cual es el caracter y la fenomenología de las señales positivas y negativas en este sistema, así como el papel del monocito, u - otras posibles subpoblaciones celulares funcionales en el mismo.

Al analizar la función de los glucocorticoides en este tipo de experimentos, se observa que dichas sustancias producen un doble efecto: por un lado provocan un desplazamiento de la curva de producción a la derecha, haciendo que sea, en presencia de las mismas, necesaria una mayor cantidad de linfocitos T para conseguir una determinada cantidad de inmunoglobulinas que la que se requiere en ausencia del fármaco; en segundo término el máximo que se puede conseguir en los cultivos con estos agentes, es superior al alcanzado sin ellos, si bien para conseguirlo es necesario agregar mayor número de linfocitos T que en los cultivos con PWM exclusivamente. De forma bastante reproducible, las curvas se igualan cuando la relación B/T se aproxima a 1. Este punto parece dividir el efecto en dos partes. En la primera (cultivos con relación B/T mayor a 1), decrece la producción de inmunoglobulinas con

los glucocorticoides en la segunda (cultivos con relación B/T inferior a 1), la aumentan. Este último hecho se confirma en aquellos experimentos en que se mantiene una cantidad fija de linfocitos T y se agregan cantidades variables de linfocitos B, aunque siempre inferiores; en todos ellos se observa un consistente efecto de aumento de respuesta tras la adición del fármaco.

Estos hechos no son específicos de una población linfocitaria determinada, dado que de forma muy similar, son observables en sangre y amígdala de dos territorios del sistema inmune de marcadas diferencias funcionales.

La importancia de la relación B/T en la determinación de este fenómeno modulador, viene además subrayada por el hecho de que cuando se estudian cultivos en los que gracias a usar una baja cantidad de linfocitos B se elimina la parte decedente de la respuesta (zona de predominio supresor), el efecto descrito se mantiene en los mismos términos.

Muchas son las explicaciones posibles de este fenómeno. Esta multiplicidad viene dada por lo complejo de las interacciones celulares en este sistema. Así un defecto de actividad del sistema revelado por una menor producción de inmunoglobulinas, puede deberse a un defecto de la cantidad de estímulos positivos, emanados de los linfocitos T cooperadores o quizás de otras células, a un aumento de los estímulos negativos de los linfocitos T supresores y monocitos, o a un efecto o cambio en la habilidad de responder por parte del linfocito B.

Por el contrario, un aumento de la actividad del sistema, detectada por una mayor producción de inmunoglobulinas, puede explicarse por mecanismos opuestos a los anteriores: es decir, una mayor capacidad para engendrar estímulos positivos

por parte de los linfocitos T cooperadores u otras células, una disminución de los estímulos reguladores negativos provinientes de linfocitos T supresores o monocitos, o alteraciones de los linfocitos B que los hagan mas asequibles a los estímulos positivos y menos a los negativos.

El mecanismo por el cual los glucocorticoides ejercen las acciones descritas, debe explicarse a través de esta red de interacciones celulares.

La irradiación de linfocitos T provoca una serie de cambios funcionales en los mismos. Estos cambios han sido estudiados por una serie de autores (MORITO, T., y cols. 1980), (SIEGAL, F.P. y SIEGAL, M., 1977), (KISHIMOTO, S., y cols. 1979), (SAXON, A., y cols. 1979), (LYDYARD, P.M., y HAYWARD, A.R., 1979). Estos estudios concluyen que dicho tratamiento afecta de forma heterogénea a las diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Así, mientras producen un ligero efecto depresor sobre la actividad T cooperadora, provoca un profundo efecto inhibitor sobre la T supresora, como expresión de una mayor sensibilidad, de la población celular que la ejecuta, para la irradiación.

Quando se compara el efecto de linfocitos T irradiados y el de los glucocorticoides en el tipo de experimentos que nos ocupan, se observa una gran similitud entre los resultados alcanzados en ambos casos. Esto da pie a explicar los mecanismos envueltos en la acción de los glucocorticoides como idénticos a los que sirven de base para la función de los linfocitos T irradiados.

Por otra parte es conocido que los linfocitos T precultivados con Con A en determinadas condiciones modifican su actividad reguladora en este tipo de cultivos, en el sentido de provocar una pequeña cooperación (con un máximo de producción

de inmunoglobulinas menor al conseguido con linfocitos T que no han entrado en contacto con Con A) más precoz (hace falta menor número de linfocitos T), e inmediatamente producen un marcado predominio supresor sobre el sistema (SCHWARTZ, S. A., y cols. 1977), (SHOU, L., y cols. 1976), (GUPTA, S., y cols. 1979), (KRAKAUER, R.S., y cols. 1979), (MORIMOTO, C., 1978). Este fenómeno ha sido interpretado como una activación predominante de los linfocitos T supresores mediante el precul_ tivo con el mitógeno Con A.

El papel posiblemente inhibidor de la supresión ejercido por los glucocorticoides en los experimentos mostrados, hace interesante el observar su acción sobre los linfocitos T pretratados con Con A, en los que como se ha visto, predominan la actividad negativa.

Los experimentos realizados en este sentido no aportan conclusiones definitivas. La acción de los glucocorticoides sobre este tipo de cultivos es similar a la descrita sobre linfocitos T sin tratar: esto es, se consigue un desplazamiento de la curva de producción hacia la derecha, y un máximo de producción mas elevado que en los cultivos sin el fármaco. No se observa por tanto un cambio radical en el comportamiento de los linfocitos T tratados con Con A al añadir glucocorticoides. Esto, no obstante, si bien no confirma la acción de los glucocorticoides sobre la población supresora, tampoco la descarta. En primer lugar la actividad supresora inducida por el tratamiento con Con A puede no ser idéntica a la existente de forma natural. Por otra parte puede ocurrir, que el tratamiento con el mitógeno de los linfocitos T determine una limitación irreversible de la actividad cooperadora, por lo que a pesar de que se inhibiera la actividad supresora, no se observarían cambios radicales en el comportamiento de estas células.

Estos resultados entran en contradicción con los reportados por otros autores (HAYNES, B.F., y FAUCI, A.S., 1979). Ellos no observan cambios al adicionar hidrocortisona a dosis farmacológicas, sobre la actividad de linfocitos T pretratados con Con A, en la producción de células formadoras de placas en respuesta al PWM. La disparidad puede explicarse porque en el trabajo mencionado se usa una relación B/T de 1, como único esquema de estudio, y como se extrae del presente trabajo, así como de otros (SAXON, A.R, y cols. 1979), (ASHMAN, R.S., 1980), (DE LA CONCHA, E. G., y cols. 1977), (PLATTS-MILLS, T.A.E., y cols: 1979), la regulación de la actividad en este sistema de cultivos, se ve fuertemente afectada por la relación B/T y por las concentraciones relativas y absolutas de cada subpoblación en los cultivos. Por ello es posible no detectar cambios en unas determinadas condiciones, y obtenerlos al cambiar las mismas. Es por tanto necesario para analizar los cambios en la regulación de la producción de inmunoglobulinas en este sistema, el uso de cultivos con variadas concentraciones de las diferentes subpoblaciones celulares envueltas en el mismo.

Otra serie de evidencias adicionales, sugieren la acción inhibitoria de los linfocitos T supresores. HAYNES y FAUCI (1979) han podido demostrar que la actividad supresora natural existente en algunos sujetos normales denominado por ello no-respondedores, y que puede ser evidenciado en cultivos de linfocitos T de estos sujetos y linfocitos B de sujetos respondedores, es abolida en presencia de hidrocortisona. También han podido observar este mismo efecto, estudiando linfocitos de estos sujetos, extraídos 4 horas después de que se les hubiera suministrado hidrocortisona por vía intravenosa (HAYNES, B.F., KATZ, P., Y FAUCY, A.S. 1979). SAXON, STEVENS, RAMER, CLEMENST, y YU (1979) han analizado la función de las diferentes subpoblaciones linfocitarias involucradas en este sistema, antes y 4 horas después de suministrar metilprednisolona intravenosa. En estos estudios ellos observan -

una disminución de la actividad supresora de los linfocitos T tras la administración del fármaco. No obstante debe tenerse en cuenta en los estudios resalizados in vivo, que los efectos observados pueden ser debidos a los cambios cinéticos producidos por los glucocorticoides sobre diferentes subpoblaciones de linfocitos T y otras células (FAUCI, A.S., y DALE, D.C., 1974), (YU, D.T., y cols. 1974), (HAYNES, B. F., y FAUCI, A.S., 1978), mas que a cambios funcionales en los mismos.

Un hallazgo de interés es, que no solo la irradiación y los glucocorticoides parecen ejercer un efecto inhibitor sobre la función supresora, sino que esta misma acción se ha demostrado con una serie de sustancias como azatioprina (DIMITRIN y FAUCI, 1978). AMP cídico (KATZ y FAUCI 1978), mitomicina C (FAUCI, STEINBERG, HAGNES, y WHALEN, 1978) y cidofofamida (STEVENSON y FAUCI 1980). Un conocido efecto común a este conjunto de agentes es el de afectar en mayor o menor grado la capacidad proliferativa de los linfocitos en respuesta a mitógenos. Se sabe que la blastogénesis es un requisito previo para la producción de inmunoglobulinas en respuesta al PWM (CHOI, Y.S., y GOOD, R.A., 1977).

Tanto en los experimentos que se muestran en el presente trabajo como en los de otros autores (KIESSLING, M., SPECK, B., y GOSELINK, H. 1972), (HEILMAN, D.H., GAMBRILL, M.R., y LEICHTNER, J.P., 1973) se demuestra que los glucocorticoides son inhibidores de la proliferación. Se ha podido comprobar que esta inhibición recae sobre los linfocitos T no afectándose la proliferación de los linfocitos B (BLOMGREN, H., y ANDERSSON, B., 1976). Los linfocitos T cooperadores no necesitan proliferar en este sistema para efectuar su misión (KEIGHTLEY, R.G., y cols. 1976). Estos hechos apuntan a un paralelismo entre dos efectos simultáneos de los -

glucocorticoides; por un lado provocan una inhibición de la proliferación, y por otro de la función de los linfocitos T supresores. Es posible que ambos fenómenos estén funcionalmente ligados, si, como parece, los linfocitos T supresores necesitan proliferar para ejercer su función. Así la inhibición de la misma podría venir mediada por la inhibición específica de la capacidad proliferativa de esta subpoblación.

Se han realizado experimentos con el objeto de analizar el papel de los monocitos en el efecto ejercido por los glucocorticoides. Para ello se han comparado cultivos de poblaciones celulares antes y después de ser deplecionadas de monocitos por técnicas de adherencia. De estas observaciones puede deducirse que no se aprecian cambios en las curvas de producción de inmunoglobulinas en respuesta al PWM entre ambas poblaciones. Cuando se añaden glucocorticoides, la curva de producción de inmunoglobulinas correspondiente a la población deplecionada de monocitos no presenta una disminución de la producción de los cultivos con relación B/T mayor a 1, como la que es apreciable en los cultivos de poblaciones no deplecionadas. Por el contrario, la fase de aumento de la producción inducida por los glucocorticoides en los cultivos con relación B/T menor de 1, se mantiene sensiblemente similar a la evidenciada en la población no deplecionada. Esto último es corroborado en los experimentos mostrados en linfocitos sanguíneos cuya relación B/T es muy inferior a 1. Cuando se compara la respuesta de poblaciones totales y deplecionadas de monocitos, se observa un descenso de la misma en estas últimas. Este descenso puede deberse a la depleción relativa de ciertos linfocitos B adherentes (FAUCI, 1979), que a la depleción de monocitos, puesto que para que mediante esta se produzca una disminución importante de la respuesta, es necesaria una de

pleción mayor en estas células que la alcanzada. No obstante la menor producción de inmunoglobulinas en estos cultivos, la adición de glucocorticoides conduce a una respuesta aumentada, de forma parecida a lo que ocurre en la población sin deplecionar.

Estos hallazgos sugieren que la depleción de monocitos, revierte el efecto de descenso de los glucocorticoides sobre la respuesta de cultivos con relación B/T mayor de 1. mientras que no afecta el resto del fenómeno. Los monocitos por tanto, en presencia de una relación B/T mayor de 1, - serían estimulados por los glucocorticoides para producir señales supresoras sobre el sistema, bien sobre el linfocito B directamente, bien sobre los linfocitos T reguladores.

La actividad de los monocitos en el sistema que nos ocupa está aún sujeta a controversia. En los primeros trabajos que tratan el tema (BALOW, J.E., y ROSENTHAL, A.S., 1973), (WAHL, S.M., y cols. 1975), (McMILLAN, R., y cols, 1976), se afirma que la depleción de los mismos no afecta la respuesta. Posteriormente, en estudios en los que se usaban técnicas de depleción más eficaces de estas células, se obtenían resultados que obligan a admitir la necesidad de la presencia de los mismos para una respuesta correcta, siendo esta función garantizada por cifras tan pequeñas como 1% -4% de monocitos en el cultivo (BLEASE, R.M., y cols. 1977) (KNAPP, W., y BAUMGARTEN, G., 1978). Este hecho se corroboraba en otro trabajo en el que se demostraba la respuesta - abolida en poblaciones altamente deplecionadas de monocitos. Tras la adición de cantidades relativamente pequeñas de una suspensión enriquecida en estas células se obtenía de nuevo una producción normal de inmunoglobulinas (ASHMAN, R.S., y cols. 1980) . Recientemente se ha comprobado el papel regulador de los monocitos en la producción de inmunoglobulinas en respuesta al PWM, demostrándose la capacidad de estas célu-

las para potenciar o suprimir dicha respuesta, dependiendo de la cantidad de los mismos adicionada a una cantidad fija de linfocitos B y T (GMELING-MEYLING, F., y WALDMANN, T.A. 1981). Es por tanto cada vez mas evidente que los monocitos son necesarios en este tipo de cultivos, aunque - quizás con un 1% de los mismos sea suficiente para ejercer su función, así como la capacidad reguladora potencial, - tanto positiva como negativa de estas células. No se conocen los factores que condicionan las habilidades reguladoras de estas células, si bien no puede descartarse que las proporciones en que se encuentran las células que intervienen en la producción de inmunoglobulinas, sea uno de ellos.

En los experimentos mostrados en este trabajo, no se evidencian cambios en las respuestas obtenidas tras el estímulo de PWM, con la depleción de monocitos. La razón de este hecho puede residir en que los niveles conseguidos de depleción de estas células, aunque sustanciales, nunca redujeron la proporción de las mismas por debajo de un 1%, cifra al parecer suficiente para que no se observen alteraciones importantes de la respuesta.

Estos resultados, por tanto, parecen indicar que si bien la depleción de monocitos no ha sido lo suficientemente efectiva para alterar la respuesta, si se ha conseguido con ella sustraer la población de los mismos, responsable de la disminución de la producción de inmunoglobulinas observada al añadir glucocorticoides en cultivos con una relación B/T mayor a 1. Esta subpoblación sería la encargada de, tras ser activada por dichas sustancias, inducir un efecto supresor en el sistema.

En los cultivos utilizados, la cantidad de monocitos era aportada en la población enriquecida en linfocitos B, - siendo por tanto fija a lo largo de todos los cultivos. No

obstante, y dada la indudable capacidad reguladora de estas células en el sistema, no debe extrañar el que puedan observarse actividades diferenciales en la función de estas células a lo largo de la curva de producción, puesto que si bien el número de monocitos se mantiene constante a lo largo de todos los cultivos, tanto la concentración total de células, como las regulaciones B-T, monocitos-T, son cambiadas en los mismos, pudiendo ser los condicionantes de la actividad o inhibición del fenómeno supresor producido por los monocitos.

Puesto que en los resultados expuestos, el efecto de los glucocorticoides es similar en las respuestas de las poblaciones deplecionadas y no deplecionadas en cultivos en los que la relación B/T se hace inferior o igual a 1, cabe pensar que el efecto supresor de los monocitos mediado por los glucocorticoides, es revertido en estas condiciones. Esto sugiere que quizá el efecto ejercido por los monocitos tiene como célula diana a los linfocitos T cuando se encuentran en bajo número, y mayor cantidad de los mismos es capaz de revocar dicho efecto.

La existencia de monocitos con capacidades supresoras para diferentes funciones del sistema inmune incluyendo la producción de inmunoglobulinas ha sido repetidamente demostrada en seres humanos normales. (RINEHART, J.J., ORSER, M., KAPLA, M.E., 1979), (YODIM, S., 1979). (WILSON, C.B., y REMINGTON, J.S., 1979), (GMELIN-MEYLING, F., y WALDMANN, T.A., 1981), y en animales (KIRCHNER, H., FERNBACH, B.R., y HERBERMAN, R. B., 1976). Este fenómeno se muestra más fácilmente tras la activación de los monocitos por diferentes mecanismos (GMELIG MEYLING, F, y WALDMANN, T.A., 1981), (YODIM, A., 1979), (KIRCHNER, H. y cols. 1976), o en estados patológicos (KIRCHNER, H., y cols. 1976), (BERLINGER, N.T., LOPEZ, C., y GOOD, R.A., 1976), (STOBO, J.D., 1977), (ELLNER, J.J., 1978), (BRODER, S.,

HUMPHREY, R., DURM, M., BLACKMAN, M., MEADE, B., GOLDMAN, C., STROBER, W., y WALDMANN, T., 1975), (KATZ, P., HAYNES, B.T. y FAUCI, A.S., 1979).

Es difícil saber cual es el mecanismo por el cual - ejercen los monocitos la acción supresora inducida por los glucocorticoides demostrada en este trabajo. No obstante, - algunos datos hacen pensar que puedan hacerlo a través de la producción de prostaglandinas. Por una parte se ha comprobado que monocitos productores de estas sustancias suprimen - la función de colonias de linfocitos B in vitro (KURLAND, J. E., KINLADE, P.W. y MOORE, M.A.S., 1977). Por otra parte la acción inhibidora de los glucocorticoides sobre la proliferación linfocitaria está, al menos en parte, ligada a la - síntesis de prostaglandinas por monocitos capaces de ello (STASZAK, C., y GOODWIN, J.S., 1980). Es posible, por tanto, que en el fenómeno que nos ocupa, pueda ocurrir de igual - manera. Así la población de monocitos productora de prostaglandinas, sería activada a secretarlas por los glucocorticoides, en presencia de una elevada relación monocitos/linfocitos T. Este efecto desaparecería al aumentar el número de - linfocitos T.

El hecho de que la curva de producción obtenida con poblaciones deplecionadas y tratada con glucocorticoides sea bastante similar en su primera fase a las de las poblaciones no tratadas con glucocorticoides, ya sean no deplecionadas o deplecionadas, sugiere que tanto la función de los linfocitos B como la de los linfocitos T cooperadores, no son afectadas por la acción de estos fármacos.

Esto no debe extrañar, ya que repetidamente, se han aportado datos apoyando la mayor resistencia de estas células a los efectos de los glucocorticoides. Así la producción de anticuerpos específicos producidos por los linfocitos B, se

ve poco afectada por el tratamiento in vivo con glucocorticoides, y es necesario una prolongación del mismo a altas dosis para conseguir un descenso del pool de inmunoglobulinas séricas (FAUCI, A.S. y cols. 1976), (McMILLAN, R., y cols. 1976). También se ha observado la no inhibición de la proliferación in vitro estimulada por mitógenos de los linfocitos B tras la adicción de estos fármacos (BLOMGREN, H., y ANDERSSON, B., 1976).

Hay algunas evidencias que apoyan una mayor resistencia a estos agentes por parte de los linfocitos T cooperadores. - GUPTA y GOOD (1977) han mostrado que en cultivos sin estimular a los que se añade glucocorticoides no se observa afectación de la población de linfocitos T_M , los cuales parecen involucrados en la función T cooperadora. Esta misma población era incluso aumentada en cultivos estimulados con PHA a los que se agregaba dexametasona (TILLYER, C.R., y BUTTTERWORTH, P.H.W. 1980). SAXON y cols. (1978) han comprobado que linfocitos sanguíneos de donantes extraídos 4 horas después de la administración intravenosa de metilprednisolona, conservaban inalterada la función T cooperadora para la producción de inmunoglobulinas en cultivos estimulados con PWM. Parecidos efectos de resistencia de los linfocitos T cooperadores a estos agentes han sido publicados en animales, tanto en sistema de respuesta humoral (MISHELL, R.I., SHIIGI, J.M., MISHELL, B.B., GRABSTEIN, K. H., y SHIIGI, S.M., 1980), como celular (LEE, K., 1977)

Según todo lo expuesto, la acción ejercida por los glucocorticoides sobre la producción de inmunoglobulinas de cultivos de linfocitos estimulados con PWM, no se muestra como un efecto único y de fácil explicación. Los efectos producidos más probablemente, se dan en primer lugar sobre la población de monocitos, o una subpoblación de los mismos, estimulándolos a producir una actividad supresora sobre la producción de inmu

noglobulinas, en presencia de una relación entre linfocitos B/T mayor de 1. El cambio de esta relación, o el simple - aumento del número de linfocitos T, revierte esta actividad negativa. Por otro lado, los glucocorticoides parecen inhibir la actividad de los linfocitos T supresores en presencia de una relación B/T menor de 1, dando lugar a un aumento de la producción de inmunoglobulinas en estas condiciones. El primer efecto puede estar mediado por la producción de prostaglandinas por parte de la población de monocitos capaz de realizarla. El segundo fenómeno puede realizarse mediante una inhibición de la capacidad proliferativa de la subpoblación - de linfocitos T supresores, actividad que es al parecer requerida por estas células para ejercer su función.

Aunque los glucocorticoides podrían actuar sobre otras subpoblaciones (linfocitos B, linfocitos T cooperadores), esta actuación parece menos probable.

Todos estos fenómenos muestran lo complejo de los efectos de estos fármacos, y permite esborzar la importancia moduladora de los mismos en un sistema de producción de inmunoglobulinas in vitro, que guarda sustanciales similitudes a los fenómenos que ocurren in vivo. Esto sugiere que estas sustancias pueden realizar un papel modulador en la respuesta inmune in vivo.

Este aserto se refuerza, cuando se analizan los complejos efectos de los glucocorticoides sobre la producción de inmunoglobulinas in vivo.

Así, en ratones, las inmunoglobulinas séricas descienden tras el tratamiento con estas drogas (DUKOR, P., y DIETRICH, - F.M., 1968), mientras que permanece inalterada la respuesta - de anticuerpos específicos. Para suprimir esta son necesarios tratamientos prolongados y el efecto inhibitorio es diferencial, afectando solo la respuesta a antígenos-T-dependientes, y no a T-independientes (MONTZOURANIS, E., y BOREL, Y., 1979).

En seres humanos normales estos tratamientos, disminuyen ligeramente las inmunoglobulinas séricas. pero no afectan la respuesta específica a una serie de antígenos (BUTLER, W. T., COUCH, R.B., ROSSEN, R.D., y HERSH, E.M., 1974). Cuando se analiza la producción de inmunoglobulinas en diferentes territorios linfoides, se aprecia que en médula ósea es varias veces superior que en sangre o bazo. Sin embargo la producción de anticuerpos específicos despues de la inmunización es más alta en sangre y bazo que en médula ósea (McMILLAR, R., LONG MIRE, R.L., YELENOSKY, R., LANG, J.E., HEAD, V., y CRADDOCH, C.G., 1972). Esto sugiere que la médula ósea no es capaz de iniciar la respuesta específica, y que es más bien un órgano de reserva de linfocitos B de memoria o ya activados, y por lo tanto en ella reside la producción basal de inmunoglobulinas cuya expresión es el pool de inmunoglobulinas séricas. Sin embargo la respuesta primaria a un antígeno específico es producida en otros territorios linfoides. McMILLAN y cols. (1975) - realizaron un estudio sobre la producción de inmunoglobulinas en médula ósea y bazo de pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática en tratamiento con glucocorticoides. Ellos observaron que la producción de inmunoglobulinas en la médula es suprimida por el tratamiento, y este descenso se relaciona con el descenso de las inmunoglobulinas séricas. Sin embargo la producción del bazo no se altera con el tratamiento. Estos datos hacen pensar en un efecto diferencial de los glucocorticoides según el territorio linfoide que se analize. La razón de este diverso comportamiento puede explicarse por acciones específicas en órganos determinados, o bien por interferencias en el tráfico normal de subpoblaciones. Aunque existen una serie de datos para pensaren la segunda razón como más probable para explicar el efecto diferenciador descrito, los resultados expuestos aquí pueden apuntar hacia la primera hipótesis. Así, como se ha mostrado en el presente trabajo, los glucocorticoides actuan suprimiendo la producción de inmunoglobulinas por

medio de los monocitos en presencia de una relación B/T mayor que 1, Este hecho puede darse en realidad en la médula ósea, órgano donde predomina la serie B sobre la T. Mientras tanto, en órganos como el bazo, donde la relación linfocitos B/T es cercana a 1, no es afectado en el ejercicio de esta función por los glucocorticoides, hecho similar al demostrado en este trabajo.

En estados patológicos, en los que al menos en parte, la afección es expresada a través de trastornos en la producción de inmunoglobulinas, también se ha observado el papel modulador de los glucocorticoides .

Así, es bien conocido que en las enfermedades autoinmunes existen hipergammaglobulinemia y autoanticuerpos detectables. Ambos fenómenos disminuyen en el curso del tratamiento con estos fármacos, y estos hechos se ligan a mejoría clínica de estos pacientes (RAGAN, C.A., GROKOESE, W., y BOOTS, R.N. 1949), (CASEY, T.P., y HOWIE, S.P., 1965), (DECKER, J.I., STEINBERG, A.D., REINERTSEN, J.L., PLOTZ, P.H., BALOW, J.E., y KUPPEL, J.H., 1979). (DUKOR, P., y DIETRICH, F.M., 1968), (JANOSSY, G., y GREAVES, M., 1975).

Por otra parte en algunas inmunodeficiencias caracterizadas por un defecto en la producción de una respuesta normal de anticuerpos contra antígenos, se ha comprobado un aumento de la producción de inmunoglobulinas, tanto in vitro como in vivo, con el tratamiento con glucocorticoides (WALDMANN, T.A., BRODER, S., KRAKAUER, R., McDERMOTT, R.P., DURM, M., GOLDMAN, C., y MEADE, B., 1976), (SOOTHILL, J., 1975), (WALDMANN, T. A., BRODER, S., DURM, M., MEADE, B., KRAKAUER, R., BLACKMAN, M., y GOLDMAN, C., 1976). En algunos de estos casos se ha detectado la existencia de un aumento de actividad T supresora (WALDMANN, T.A. y cols. 1976).

Vemos como en estos dos casos, los trastornos de la respuesta inmune son diferentes, e incluso, en algunos aspectos, opuestos. Mientras en los primeros la deficiente regulación de la producción de anticuerpos da lugar a una respuesta humoral exagerada y autolesiva, en los últimos se aprecia un defecto de la producción normal de anticuerpos, debida a deficiencias de células efectoras o a exceso de señales negativas. No obstante, en ambas situaciones, los glucocorticoides consiguen un efecto benéfico. Dado que estas sustancias existen fisiológicamente, es posible pensar que, normalmente estas hormonas ejercen una función de modulación de la respuesta inmune. Este efecto regulador es más manifiesto cuando se consiguen concentraciones mayores (farmacológicas) de dichas sustancias.

Estos efectos pueden ser, al menos en parte, parecidos a los descritos en este trabajo. Las situaciones de hiperrespuesta pueden ser en parte moduladas por la estimulación que los glucocorticoides ejercen sobre una población de monocitos supresores, y en las respuestas defectuosas por exceso de actividad T supresora, estas sustancias inhibirán dicha actividad excesiva.

CONCLUSIONES

1°) La hidrocortisona y prednisolona tienen un efecto inhibitorio sobre la proliferación de linfocitos estimulados por mitógenos. Este efecto no se debe a citotoxicidad y es dosis-dependiente.

2°) Estos mismos glucocorticoides provocan un aumento de la producción de inmunoglobulinas de linfocitos sanguíneos estimulados con PWM. Este efecto es más significativo - a 10^{-5} M a 10^{-6} M (dosis farmacológicas), y se observa para las tres clases principales de inmunoglobulinas, si bien es más expresivo para la IgM.

3°) El efecto se debe a un aumento del número de células sintetizadoras de inmunoglobulinas.

4°) Para producir dicho efecto se requiere que la hidrocortisona sea incorporada al inicio del cultivo.

5°) Los glucocorticoides no producen cambios en la cinética de producción de inmunoglobulinas inducida por el PWM.

6°) El efecto no se debe a un aporte por parte de los glucocorticoides de señales cooperadoras a poblaciones de linfocitos B.

7°) No se observan efectos significativos de estos agentes sobre poblaciones de linfocitos totales de amígdala, en contraste de lo ocurrido en sangre. Esto sugiere un posible papel diferencial de los glucocorticoides en diversos territo

rios linfoides.

8°) Los glucocorticoides a dosis farmacológicas ejercen una acción de disminución de la producción de inmunoglobulinas en cultivos de mezclas de poblaciones enriquecidas en linfocitos B y T, que guardan una relación B/T mayor de uno. Este efecto se debe a la acción supresora de una población de monocitos tras el contacto con glucocorticoides y desaparece al deplecionar estas células.

9°) Estos fármacos a las mismas dosis aumentan la producción de inmunoglobulinas en cultivos con una relación B/T menor que uno. Este efecto parece depender de la inhibición de la actividad de los linfocitos T supresores ejercida por los glucocorticoides, dado su parecido con la acción de linfocitos T irradiados, y la reversión parcial de la actividad de los linfocitos T tratados con Con A.

10°) Estos hechos sugieren un papel modulador de estos agentes a dosis farmacológicas, que quizás pueda explicar algunos de los efectos de estos fármacos en diversos estados patológicos.

RESUMEN

Se pretende en el presente trabajo, abordar el análisis de los efectos de los glucocorticoides a dosis alcanzables *in vivo*, sobre los mecanismos de interacción celular que se generan en el sistema de producción de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos humanos estimulados con PWM.

Para ello se estudia la función de poblaciones linfocitarias totales y mezclas de subpoblaciones enriquecidas en linfocitos B y T, de sangre y amígdala.

La adición de glucocorticoides (hidrocortisona y prednisona) a cultivos de linfocitos sanguíneos conduce a una inhibición de la síntesis de DNA estimulada por mitógenos (PHA, Con A, PWM), inhibición que es mayor a mayores dosis, y no depende de efectos citotóxicos. Por el contrario estos fármacos provocan un aumento de la producción de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos sanguíneos estimulados con PWM. Este aumento es mas expresivo a dosis farmacológicas ($10^{-5}M$, $10^{-6}M$) de estos agentes, y se ejerce sobre las tres clases principales de inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA), si bien es mas significativo para la IgM. Este efecto se debe a la generación en el cultivo adicionado con el fármaco, de un mayor número de células sintetizadoras (células plasmacitoides) de inmunoglobulinas. Para que el efecto se produzca, es necesaria la incorporación del agente al cultivo al inicio del mismo, y el efecto no se acompaña de cambios en la cinética de la respuesta al PWM. Este efecto no se ejerce sobre poblaciones enriquecidas en linfocitos B. Estos hechos sugieren que el efecto de los glucocorticoides se ejerce sobre los eventos iniciales de la respuesta al PWM. Este efecto de aumento no se observa en poblaciones de linfocitos de amígdala. Estos órganos poseen marcadas diferencias en las proporciones que contienen de las diversas subpoblaciones. Esto lleva a estudiar los efectos de estos fármacos en mezclas de subpoblaciones B y T. Con estos experimentos se

comprueba que en relaciones B/T mayores de 1, los glucocorticoides dan lugar a un descenso de la producción de inmunoglobulinas, y en aquellos con una relación B/T menor de 1, actúan aumentando dicha producción. Esto ocurre tanto con linfocitos de sangre como de amígdala. El efecto de aumento en cultivos con una relación B/T menor de 1 puede explicarse por una acción inhibidora de los glucocorticoides sobre la población T supresora, dado el parecido de este efecto con el generado por linfocitos T irradiados, y por la reversión parcial de la actividad supresora de los linfocitos T pretratados con Con A. El efecto de disminución de la producción de inmunoglobulinas en cultivos con relación B/T mayor de 1, se debe a la acción supresora de una población de monocitos, ya que el efecto desaparece al deplecionar dicha población, hecho este que no conduce a cambios en el fenómeno observado en cultivos con relaciones B/T menores de 1.

Todo esto sugiere un papel modulador para los glucocorticoides a dosis farmacológicas, que actuarían aumentando o disminuyendo la producción de anticuerpos, dependiendo de las proporciones que, de las distintas células que intervienen en la respuesta, existan en el cultivo. Esto puede explicar algunos de los efectos que producen los glucocorticoides in vivo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALLAN, D., y CRUMPTON, M., J. (1973). PHYTOHEMAGGLUTININ LYMPHOCYTE INTERACTION. CHARACTERIZATION OF BINDING SITES ON PIG LYMPHOCYTES FOR ^{135}I -LABELLED PHYTOHEMAGGLUTININ EXP. CELL. RES. 78, 271.
- 2.- ALLISON, A.C., (1977). AUTOINMUNE DISEASES: CONCEPTS OF PATHOGENESIS AND CONTROL. EN AUTOINMUNITY p 91-133 ED: - TALAL, N. ACADEMIC PRESS.
- 3.- AMMANN, A., (1977). IMMUNODEFICIENCY DISORDERS AND AUTOIMMUNITY. EN AUTOIMMUNITY. p 479-508 ED. TALAL, N. ACADEMIC - PRESS.
- 4.- ANDERSEN, V., AUTORADIOGRAPHIC STUDIES OF EOSINOPHIL KINETICS: EFFECT OF CORTISOL. (1969). CELL TISSUE KINET. 2,139.
- 5.- ANDERSSON, J., EDELMAN, G., MOLLER, G., y SOBERG, O., (1972). ACTIVATION OF B LYMPHOCYTES BY LOCALLY CONCENTRATED CONCANA VALIN A. EUROP. J. IMMUNOL. 2, 99.
- 6.- ARMERDING, D., SACHS, D., H. y KATZ, D.H., (1974). ACTIVATION OF T AND B LYMPHOCYTES IN VITRO III PRESENCE OF Ia DETERMINANTS ON ALLOGENIC EFFECT FACTOR. J. EXP. MED. 140-1717.
- 7.- ASHMAN, R.S., SAXON, R., y STEVENS, R.H., (1980). PROFILE OF MULTIPLE LYMPHOCYTE FUNCTIONAL DEFECTS IN ACQUIRED HYPOGAMMA GLOBULINEMIA DERIVED FROM IN VITRO CELL RECOMBINATION ANALYSIS. J. ALLERGY. CLIN. IMMUNOL. 65,242.
- 8.- ATHENS, J.W., HAAB, D.P., RAAB, S.O., MAVER, A.M., ASHENBUCHER, H., CARTWRIGHT, G.E., y WINTROBE, M.M., (1961). LEUKO KINETICS STUDIES IV. THE TOTAL BLOOD CIRCULATING AND MARGINAL GRANULOCYTE POOLS AND THE GRANULOCYTE TURNOVER RATE

IN NORMAL SUBJECTS. J. CLIN. INVEST. 40, 989.

- 9.- ATKINSON, J.P., y FRANK, M.M., (1974). CORTISONE INHIBITION OF COMPLEMENT INDEPENDENT ERYTHROCYTE CLAREANCE. BLOOD, 44, 629.
- 10.- BALOW, J.E., y ROSENTHAL, A.S., (1973) GLUCOCORTICOID SUPPRESSION OF MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR . J. EXP. MED. 138-1031.
- 11.- BALOW, J.E., HUNNINGHAKE, G.W., y FAUCI, A.S., (1977) CORTI COSTEROIDS IN HUMAN LYMPHOCYTE MEDIATED CYTOTOXIC REACTIONS EFFECT ON THE KINETICS OF SENSITIZATION AND ON THE CYTOLYTIC CAPACITY OF EFFECTOR LYMPHOCYTES IN VITRO. TRANSPLANTATION 23-322.
- 12.- BALLIEUX, R.E., HEISNEN, C.J., VITDEHAAG, F., y ZEGERS, B.J. M., (1979) REGULATION OF B CELL ACTIVITY IN MAN: ROLE OF T CELL. IMMUNOLOGICAL REV. 45-3.
- 13.- BAXTER, J.D., y FORSHAM, P.H., (1972). TISSUE EFFECTS OF GLUCOCORTICIDS. AM. J. MED. 53-573.
- 14.- BAXTER, J.D., y HARRIS, A.W. (1975) MECHANISM OF GLUCOCORTI COID ACTION: GENERAL FEATURES, WITH REFERENCE TO STEROID-MEDIATED IMMUNOSUPPRESSION. TRANSPLANT. PROC. 7-55.
- 15.- BERLINGER, N.T., LOPEZ, C. y GOOD, R.A, (1976) FACILITATION OR ATTENUATION OF MIXED LEUKOCYTE CULTURE RESPONSIVENESS - BY ADHERENT CELLS. NATURE 260, 145.
- 16.- BLEASE, R.M., LAWRENCE, E.C., y POPLACK, D.G., (1977). A CRI TIQUE OF TECHNIQUES OF MACROPHAGE-MONOCYTE DEPLETION IN STU DIES OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR LEUKOCYTE (MNL)

FUNCTION. EN: REGULATORY MECHANISM IN LYMPHOCYTE ACTIVATION
ED. D. E. LUCAS. ACADEMIC PRESS. NEW YORK.

- 17.- LEE, K., (1977). CORTISONE AS A PROBE FOR CELL INTERACTIONS IN THE GENERATION OF CITOTOXIC T CELLS. I. EFFECT ON HELPER CELLS, CYTOTOXIC T CELL PRECURSORS AND ACCESORY CELLS. J. IMMUNOL, 119, 1836.
- 18.- BOGGS, D.R., ATHENS, J.W., CARTWRIGHT, G.E., y WINTROBE, M. M., (1964). THE EFFECT OF ADRENAL GLUCOCORTICIDS UPON THE CELLULAR COMPOSITION OF INFLAMMATORY EXUDATES, AM. J. PATHOL 44,763.
- 19.- BRAUN W. (1974). EN CYCLIC AMP. CELL GROWTH, AND THE IMMUNE RESPONSE pp4. ED. W. BRAUN, L.M. LICHTENSTEIN, AND C. W. - PARKER, .SPRINGER VERLAG, NEW. YORK.
- 20.- BRODER, S., HUMPHREY, R., DURM, M., BLACKMAN, M., MEADE, B., GOLDMAN, C., STROBER, W., y WALDMANN, T.A.,(1975). IMPAIRED SYNTHESIS OF POLYCLONAL (NON-PARAPROTEINS) IMMUNOGLOBULINS BY CIRCULATING LEUKOCYTES FROM PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA. N. ENGL. J. MED. 293,887.
- 21.- BRODER, S., EDELSON, R.L., LUTZNER, M.A., NELSON, D.L., - McDERMONT, R.P., DURM, M.E., GOLDMAN, C.K., MEADE, B.D., y WALDMANN, T.A., (1976). THE SEZARY SYMDROME. A MALIGNANT - PROLIFERATION OF HELPER T CELLS. J. CLIN. INVEST. 58, 1297.
- 22.- BRODER, S., POPLAK, D., WHANG-PENG, J., DURM, M., GOLDMAN, L., MUNL, L., y WALDMANN, T.A., (1978). CHARACTERIZATION OF A SUPPRESSOR-CELL LEUKEMIA. EVIDENCE FOR THE REQUIRE - MENT OF AN INTERACTION OF TWO T CELLS IN THE DEVELOPMENT OF HUMAN SUPPRESSOR EFFECTOR CELLS. N. ENGL. J. MED. 298-66.

- 23.- BROOM, P.D., DE LA CONCHA, E.G., WEBSTER, A.D.B., (1976) INTRACELLULAR IMMUNOGLOBULIN PRODUCTION IN VITRO BY - LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH HYPOGAMMAGLOBULINEMIA AND THEIR EFFECTS ON NORMAL LYMPHOCYTES. CLIN. EXP. - IMMUNOL. 23, 77.
- 24.- BUTLER, W.I., COUCH, R.B., ROSSEN, R.D., y HERSH, E.M., (1974). METHYLPREDNISOLONE FAILS TO INHIBIT PRIMARY - AND SECONDARY ANTIBODY RESPONSES BUT CAUSE MARKED SUPPRESSION OF ON-GOING ANTIBODY FORMATION IN MAN. J. - CLIN. INVEST. 53, 14.
- 25.- CAMPOS, A., (1980). RESPUESTA DE LINFOCITOS HUMANOS - " IN VITRO" A LA ESTIMULACION CON MITOGENOS.MODIFICACION DE LA MISMA POR LA IRRADIACION. TESIS DE LICENCIATURA. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, MADRID.
- 26.- CANTOR, H., y BOYSE, E.A, (1977). LYMPHOCYTES AS MODELS FOR THE STUDY OF MAMMALIAN CELLULAR DIFFERENTIATION. IMMUNOLOGICAL REV. 33, 105.
- 27.- CANTOR, H., McVAY-BOUDREAU, L., HUGEMBERGER, J., NAIDORF, N., SHEN, F.W., y GERSHON, R.K., (1978). IMMUNOREGULATORY CIRCUITS AMONG T-CELL SETS. II PHYSIOLOGIC ROLE OF FEEDBACK INHIBITION IN VIVO: ABSENCE IN NZB - MICE. J. EXP. MED. 147, 116.
- 28.- CASEY, T.P., y HOWIE, J.P., (1965). AUTOINMUNE HEMOLYTIC ANEMIA IN NZB/BL MICE TREATED WITH CORTICOSTEROID DRAUG BETAMETHASONE. BLOOD. 24, 423.

- 29.- CLAMAN, H.N., (1972) CORTICOSTEROIDS AND LYMPHOID CELL
N. ENGL. J. OF MED. 24, 388
- 30.- CLAMAN, H.W., (1975). HOW CORTICOSTEROIDS WORK. J. ALLERGY
ALLERGY CLIN. IMMUNOL. 55, 145.
- 31.- CLARKE, J. R., GAGNON, R.F., GOTCH, F.M., HEYWORTH, M.
R., MACLENNAN, I.C.M., TRVELOVE, S.C. y WALLER, C.A.,
(1977). THE EFFECT OF PREDNISOLONE ON LEUKOCYTE FUNC-
TION IN MAN. A DOUBLE BLIND CONTROLLES STUDY. CLIN.
EXP. IMMUNOL. 28, 292.
- 32.- COOPER, D.A., DUCKETT, M., PETT, V., y PENNY, R., (1979).
CORTICOSTEROID ENHACEMENT OF IMMUNOGLOBULIN SYNTHESIS.
BY POKEWEEED MITOGEN-STIMULATED HUMAN LYMPHOCYTES. CLIN
EXP. IMMUNOL. 37, 145.
- 33.- CUMMINS, M. M. y HUDGINS, P.C. (1952). THE INFLUENCE
OF CORTISONE ON THE PASSIVE TRANSFER OF TUBERCULIN -
HYPERSENSITIVITY IN THE GUINEA PIG. J. IMMUNOL. 69, 331.
- 34.- CHEDID, L., JUY, D., y BONA, C., (1974). INFLUENCE OF
HYDROCORTISONE ON ANTIBODY-DEPENDENT LYMPHOCYD CELL
MEDIATED CYTOTOXICITY. IMMUNOL. -COMM. 3, 477.
- 35.- CHOI, Y.S., y GOOD, R.A., (1977). DIFFERENTIATION OF
HUMAN PERIPHERAL BLOOD B LYMPHOCYTES. IMMUNOL 33, 887
- 36.- CHORIAZZI, N., FU, S.M., KUNKEL, H.G., (1979). INDUC-
TION OF HUMAN ANTIBODY RESPONSE IN VITRO WITH ENPHASIS
ON ALLOGENIC HELPER FACTOR. IMMUNOLOGICAL REV. 45, 219

- 37.- CHORIAZZI, N., FU, S.M., MONTAZERI, G., KUNKEL, H., E., RAI, K., y GEE, T., (1979). T CELL HELPER DEFECT IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. J. - IMMUNOL. 122, 1087.
- 38.- DALE, D.C., FAUCI, A.S., y WOLF, S.M., (1974). ALTERNATE DAY PREDNISONE: LEUKOCYTE KINETICS AND SUSCEPTIBILITY TO INFECTIONS. N. ENGL. J. MED. 291, 1154.
- 39.- DALE, D.C., FAUCI, A.S., GLERRY, N.D., y WOLF, S.M., - (1975). COMPARISON OF AGENTS PRODUCING A NEUTROPHILIC LEUKOCYTOSIS IN MAN. HYDROCORTISONE, PREDNISONE, ENDOTOXIN, AND ETIOCHOLANALONE, J. CLIN. INVEST. 56, 808.
- 40.- DECKER, J.L., STEINBERG, A.D., REINERTSEN, J.L., PLOTZ P.H., BALOW, J.E., y KUPPEL, S.H., (1979). SYSTEMIC-LUPUS ERYTHEMATOSUS: EVOLUTIVE CONCEPTS. ANN. INT. MED. 91, 587.
- 41.- DE LA CONCHA, E.G., OLDHAM, G., WEBSTER, A.D.B., ASHERSON, G.I., y PLATTS-MILLS, T.A.E., (1977). QUANTITATIVE MEASUREMENTS OF T AND B CELL FUNCTION IN VARIABLE PRIMARY HYPOGAMMAGLOBULINEMIA. EVIDENCE FOR A CONSISTENT B-CELL DEFECT. CLIN. EXP. IMMUNOL. 27, 208.
- 42.- DELFRAISSY, J.F., GALANAUD, P., DERMONT, J., y WALLON, C., (1977). PRIMARY IN VITRO ANTIBODY RESPONSE FROM HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES J. IMMUNOL. 118, 630.

- 43.- DE VRIES, G., LAFEBER, J.M., VAN DERWEIJ, J.P., VAN BUIJSEN, A.C., LEIJH, P.C., S., y CATS, A., (1980) POKEWEEED MITOGEN INDUCED LYMPHOCYTE PROLIFERATION: THE EFFECT OF STIMULATION ON MONONUCLEAR PHAGOCYtic CELLS. IMMUNOL. 40-177.
- 44.- DIMITRIU, A., y FAUCI, A.S. (1978). ACTIVATION OF HUMAN B LYMPHOCYTES XI. DIFFERENTIAL EFFECT OF AZATHIOPRINE ON B LYMPHOCYTE AND LYMPHOCYTE SUBPOPULATION REGULATING B CELL FUNCTION. J. IMMUNOL 121,1.
- 45.- DOSCH, H.M., y GELFAND, E.W., (1976). CONDITIONS FOR THE IN VITRO GENERATION OF SPECIFIC PLAQUE FORMING CELLS - (PFC) IN MAN. FED. PROC. 35-711.
- 46.- DOSCH, H.M., y GELFAND, E., W. (1979). SPECIFIC IN VITRO IgM RESPONSE OF HUMAN B CELL: A COMPLEX REGULATORY NETWORK MODULATED BY ANTIGEN. IMMUNOLOGICAL REV. 45, 243.
- 47.- DOSCH, H., SCHUURMAN, R.K.B., y GELFAND, E.W., (1980). POLYCLONAL ACTIVATION OF HUMAN LYMPHOCYTES " IN VITRO" II REAPPRAISAL OF T AND B CELL-SPECIFIC MITOGENS. J. -- IMMUNOL. 125, 827.
- 48.- DOUGHERTY, T.F., BERLINER, M.L., y SCHNERBELI, G.L., - (1964). HORMONAL CONTROL OF LYMPHATIC STRUCTURE AND FUNCTION. ANN. NY. ACAD. SCI. 113, 825
- 49.- DUKOR, P., y DIETRICH, F.M., (1968). CHARACTERISTICS - FEATURES OF IMMUNOSUPPRESSION BY STEROIDS AND CYTOTOXIC DRUGS. INT. ARCH. ALLERGY APPL. IMMUNOL; 34,32,
- 50.- DUTTON, R.W., (1972). INHIBITORY AND STIMULATORY EFFECT OF CONCANAVALIN A ON THE RESPONSE OF MOUSE SPLEEN CELL

SUPPRESSIONS TO ANTIGEN. I. CHARACTERIZATION OF THE -
INHIBITORY CELL ACTIVITY. J. EXP. MED. 136, 1445.

- 51.- DUTTON, R.W., (1973). INHIBITORY AND STIMULATORY EFFECT OF CONCAVALIN A ON THE RESPONSE OF MOUSE SPLEEN CELL SUPPRESSIONS TO ANTIGEN II EVIDENCE FOR SEPARATE STIMULATORY AND INHIBITORY CELLS. J. EXP. MED. 138, 1496.
- 52.- DUTTON, R.W., (1976). SUPPRESSOR T CELL. TRANSPL. REV. 26, 39.
- 53.- EARDLEY, D.D., HUGEMBERGER, J., McDAY-BOUDREAU, L., SHERM F. W., GERSHON, R.H., y CANTOR, H., (1978). IMMUNOREGULATORY CIRCUITS AMONG T-CELL SETS. I. T-HELPER CELLS IN - DUCE OTHER T-CELL SETS TO EXERT FEED BACK INHIBITION - (1978). J. EXP. MED. 147, 106.
- 54.- EBERT, R.H., y BARCLAY, W.R., (1952). CHANGES IN CONNECTIVE TISSUE REACTION INDUCED BY CORTISONE. AM. INTERN. MED. 37, 506.
- 55.- EKSTEDT, R.D., WATERFIELD, J.D., NESPOLI. L., y MOLLER, - G., (1977). MECHANISM OF ACTION OF SUPPRESSOR CELLS IN - VIVO. CONCAVALIN A-ACTIVATED SUPPRESSOR CELLS DO NOT - DIRECTLY AFFECT B CELLS. SCAND. J. IMMUNOL. 6, 247.
- 56.- ELLER, J.J., (1978). SUPPRESSOR ADHERENT CELLS IN HUMAN TUBERCULOSIS. J. IMMUNOL. 121, 2573.
- 57.- FANGER, M.W., HART, D.A., WELLS, J.V., y NISONOFF, A., - (1970). ENHACEMENT BY REDUCING AGENTS OF THE TRANSFOR - MATION OF HUMAN AND RABBIT PERIPHERAL LYMPHOCYTES. J. - IMMUNOL. 105, 1043.

- 58.- FAUCI, A.S., y DALE, D.C., (1974). THE EFFECT OF IN VIVO HYDROCORTISONE ON SUBPOPULATIONS OF HUMAN LYMPHOCYTES. J. CLIN. INVEST. 53, 240.
- 59.- FAUCI, A.S., y DALE, D.C., (1975). THE EFFECT OF HYDRO-CORTISONE ON THE KINETICS OF NORMAL HUMAN LYMPHOCYTES. BLOOD 46, 235.
- 60.- FAUCI, A.S., (1975). CORTICOSTEROIDS AND CIRCULATING LYMPHOCYTES. TRANSPLANT. PROC. 7,37
- 61.- FAUCI, A.S., DALE, D. C., y BALOW, J.E, (1976). GLUCO-CORTICOSTEROID THERAPY: MECHANISMS OF ACTION AND CLINICAL CONSIDERATIONS. ANN. INTERN. MED. 84,304.
- 62.- FAUCI , A.S.y PRATT, K., (1976). ACTIVATION OF HUMAN B LYMPHOCYTES I. DIRECT PLAQUE FORMING CELL ASSAY ANTIGENIC STIMULATION OF HUMAN B LYMPHOCYTES. J. EXP. MED. 114,676.
- 63.- FAUCI, A.S., PRATT, K., y WHALEN, G., (1976). ACTIVATION OF HUMAN B LYMPHOCYTES II CELLULAR INTERACTION IN THE PFC RESPONSE OF HUMAN TONSILLAR AND PERIPHERAL BLOOD B LYMPHOCYTES TO POLYCLONAL ACTIVATION BY POKEWEEEN MITOGEN. J. - IMMUNOL, 117-2100.
- 64.- FAUCI, A.S., PRATT, K.R., y WHALEN, G., (1977). ACTIVATION OF HUMAN B LYMPHOCYTES. IV REGULATORY EFFECTS OF CORTICOSTEROIDS ON THE TRIGGERING SIGNAL IN THE PLAQUE-FORMING CELL RESPONSE OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD B LYMPHOCYTES TO POLYCLONAL ACTIVATION. J. IMMUNOL 119, 598.
- 65.- FAUCI, A.S., STEINBERG, A.D., HAYNES, B.F., y WALEN, G., (1978). IMMUNOREGULATORY ABERRATIONS IN SYSTEMIC LUPUS - ERYTHEMATOSUS. J. IMMUNOL, 121 1473.

- 66.- FAUCI, A.S., (1979). HUMAN B CELL FUNCTION IN A POLYCLONALLY INDUCED PLAQUE FORMING CELL SYSTEM. CELL TRIGGERINS AND IMMUNOREGULATION. IMMUNOL. REV. 45, 93.
- 67.- FAUCI, A.S., y BALLIEUX, R.E., (1979). ANTIBODY PRODUCTION IN MAN. ACADEMIC PRESS
- 68.- FELDEMANN, M. (1972). CELL INTERACTIONS IN THE IMMUNE RESPONSE IN VITRO. II SPECIFIC COLLABORATION VIA COMPLEXES OF ANTIGENS AND THYMUS-DERIVED CELL IMMUNOGLOBULIN. J. EXP. MED. 136, 737.
- 69.- FERNANDES, G., YUNIS, E.S y GOOD, R.A., (1975). DEPRESSION OF CYTOTOXIC T CELL SUBPOPULATION IN MICE BY HYDROCORTISONE TREATMENT. CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL. 4, 304.
- 70.- FISHER, D.B., y MULLER, G.C., (1969). ACETYL-D-GALACTOSAMINE INHIBITS THE EARLY PHOSPHOLIPID RESPONSE BY LYMPHOCYTES TO PHYTOHEMAGGLUTININ. NATURE, LOND, 221, 566.
- 71.- FROLAND, S.S., (1972). BINDING OF SHEEP ERYTHROCYTES TO HUMAN LYMPHOCYTES. A PROBABLE MARKER OF T LYMPHOCYTES. SCAND. J. IMMUNOL. 1, 269.
- 72.- GALANAUD, P., (1979) IN VITRO ANTIBODY RESPONSE TO TRINITROPHENIL-POLYACRYLAMIDE BEADS. IMMUNOLOGICAL REV. 45, 141
- 73.- GALLIN, E.K., y GALLIN, J.L., (1977). INTERACTION OF CHEMOTACTIC FACTORS WITH HUMAN MACROPHAGES. INDUCTION OF TRANSMEMBRANE POTENTIAL CHANGES. J. CELL BIOL. 75, 277

- 74.- GEHA, R.S., (1979). REGULATION OF HUMAN B CELL ACTIVATION. IMMUNOLOGICAL REV, 45, 275.
- 75.- GELFAND, E.W., y DOSH, H.M., (1979). IN VITRO INDUCTION AND MEASUREMENTS OF ANTIBODY SYNTHESIS IN MAN . EN ANTIBODY PRODUCTION IN MAN (Ed. A.S. Fanci y R.E. Ballieux) ACADEMIC PRESS.
- 76.- GERSHON, R.K. (1974). T CELL CONTROL OF ANTIBODY PRODUCTION. CONTEMP. TOP. IMMUNOBIOLOG, 3, 1.
- 77.- GMELIG-MEYLING, F., y WALDMANN, T.A. (1981). HUMAN B CELL ACTIVATION IN VITRO. AUGMENTATION AND SUPPRESSION BY MONOCYTES THE IMMUNOGLOBULIN PRODUCTION INDUCED BY VARIOUS B CELL STIMULANTS. J. IMMUNOL. 126, 529.
- 78.- GOLUB, E.S., (1977a) THE CELLULAR BASIS OF THE IMMUNE RESPONSE p.p. 15,23 SINAUER ASSOCIATES. INC. SUNDERLAND MASSACHUSETTS.
- 79.- GOLUB, E.S., (1977b) THE CELLULAR BASIS OF THE IMMUNE RESPONSE p.p. 81-99 SINAUER ASSOCIATES. INC. SUNDERLAND MASSACHUSETTS.
- 80.- GOWANS, J.L., y MCGREGOR, D.D., (1965). THE IMMUNOLOGICAL ACTIVITIES OF LYMPHOCYTES. PROGR. ALLERGY 1,8.
- 81.- GRANT, L., (1974). IN THE INFLAMMATORY PROCESS (VOL II) pp 205 ED. B.W. ZWELFACH, L. GRANT y R.T. McCLUSKEY. ACADEMIC PRESS.

- 82.- GREAVES, M.F., y BAUMINGER, S. (1972). ACTIVATION OF T AND B LYMPHOCYTES BY INSOLUBLE PHYTOMITOGENS. NATURE NEW BIOL. 235, 67.
- 83.- GREAVES, M.F., OWEN, J.J.T. y RAFF, M, C., (1973b) EN T AND B LYMPHOCYTES. P. 33-36 EXCERPTA. MEDICA. AMSTERDAM DENMARK.
- 84.- GREAVES, M.F., OWEN, J.J.T. y RAFF, M.C., (1973a) EN T AND B LYMPHOCYTES. p. 82-84 EXCERPTA. MEDICA. AMSTERDAM DENMARK.
- 85.- GREAVES, M.F., SANOSSY, G., y DOENHOFF, M. (1974). SELECTI VE TRIGGERING OF HUMAN T AND B LYMPHOCYTES IN VITRO BY POLY CLONAL MITOGENS. J. EXP. MED. 140, 1
- 86.- GRANELLI-PIPERNO, A., VASALLI, J.D., y REICH, E., (1977) SECRETION OF PLASMINOGEN ACTIVATOR BY HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES. MODULATION BY GLUCOCORTICOIDS AND OTHER EFFEC - TORS. J. EXP. MED 146, 1693.
- 87.- GUPTA, S., y GOOD, R.A., (1977). SUBPOPULATIONS OF HUMAN T LYMPHOCYTES II EFFECT OF THYMOPOIETIN, CORTICOSTEROIDS AND IRRADIATION. CELL. IMMUNOL. 34. 10.
- 88.- GUPTA, S., SHWARTZ, S.L., y GOOD, R.A., (1979). SUBPOPULA TIONS OF HUMAN T LYMPHOCYTES. VII CELLULAR BASIS OF CONCANA VALIN A -INDUCED T CELL-MEDIATED SUPPRESSION OF IMMUNOGLO BULIN PRODUCTION BY B LYMPHOCYTES FROM NORMAL HUMANS. CELL. IMMUNOL. 44, 242.

- 89.- HAHN, B.H. MACDERMONT, R.P., BURKHOLDE JACOBS, S., PLETSCHER S., y BEALE, M.G., (1980). IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECT OF LOW DOSIS OF GLUCOCORTICOIDS: EFFECTS ON AUTOLOGOUS AND ALLOGENIC MIXED LEUKOCYTE REACTION. J. IMMUNOL. 124, 2812.
- 90.- HALLAHAN, C., YOUNG, D.A., y MUNCK, A. (1968). TIME COURSE OF EARLY EVENTS IN THE ACTION OF GLUCOCORTICOIDS ON RAT - THYMUS CELL IN VITRO. J. BIOL. CHEM. 248, 2922.
- 91.- HALLYDAY, W.J., y GARVEY, J.S., (1964). SOME FACTORS AFFECTING THE SECONDARY IMMUNE RESPONSE TO TISSUE CULTURE CONTAINING HYDROCORTISONE. J. IMMUNOL. 93, 757.
- 92.- HAN, T., (1973). ENHANCEMENT IN VITRO LYMPHOCYTE RESPONSE BY NEURAMINIDASE. CLIN. EXP. IMMUNOL. 13, 165.
- 93.- HAYNES, B.F., y FAUCI, A.S. (1978). THE DIFFERENTIAL EFFECT OF IN VIVO HYDROCORTISONE ON THE KINETICS OF SUBPOPULATIONS OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD T LYMPHOCYTES. J. CLIN. INVEST. 61, 703.
- 94.- HAYNES, B.F., y FAUCI, A.S., (1979). MECHANISMS OF CORTICOSTEROID ACTION ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATION IV. EFFECT OF IN VITRO HYDROCORTISONE ON NATURALLY OCCURRING AND MITOGEN-INDUCED SUPPRESSOR CELLS IN MAN. CELL. IMMUNOL. 44, 157.
- 95.- HAYNES, B.F., KATZ, P., y FAUCI, A.S., (1979) MECHANISM OF CORTICOSTEROID ACTION ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATION. V. - EFFECTS OF IN VIVO HYDROCORTISONE ON THE CIRCULATORY KINETICS AND FUNCTION OF NATURALLY OCCURRING AND MITOGEN-INDUCED SUPPRESSOR CELLS IN MAN. CELL. IMMUNOL. 44, 169.

- 96.- HEILMAN, D.H., GAMBRILL, M.R., y LEICHER, J.P. (1973). THE EFFECT OF HYDROCORTISONE ON THE INCORPORATION OF TRITIATED THYMIDINE BY HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES WITH PHYTOHAEMAGGLUTININ AND POKEWEEED MITOGEN. IMMUNOL. 15, 203
- 97.- HIRANO, T., KURITANI, T., KISHIMOTO, T., y YAMAMURA, V., (1977). IN VITRO IMMUNE RESPONSE OF HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES. I. MECHANISM (S) INVOLVED IN T CELL HELPER FUNCTIONS IN THE POKEWEEED MITOGEN-INDUCED DIFFERENTIATION AND PROLIFERATION OF B CELLS. J. IMMUNOL. 119, 1235.
- 98.- HOPPER, J. E., y HAREN, J.M., (1980). STUDIES ON A SEZARY LYMPHOCYTE POPULATION WITH T-SUPPRESSOR ACTIVITY. SUPPRESSION OF Ig SYNTHESIS OF NORMAL PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES. CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL. 17,43,
- 99.- HSU, H.S., (1969). CELLULAR BASIS OF CORTISONE-INDUCED HOST SUSCEPTIBILITY TO TUBERCULOSIS. AM. REV. RESP. DIS. 100,677
- 100.- HUNNINGHAKE, C.W., y FAUCI, A.S., (1977). IMMUNOLOGICAL REACTIVITY OF THE LUNG. VII. EFFECT OF CORTICOSTEROIDS AND CYCLOPHOSPHAMIDE ON THE Fc RECEPTOR FUNCTION OF ALVEOLAR MACROPHAGES. CELL. IMMUNOL. 32, 228
- 101.- IGNARRO, L.J., (1977). GLUCOCORTICOID INHIBITION OF NONPHAGOCYtic DISCHARGE OF LYSOSOMAL ENZYMES FROM HUMAN NEUTROPHILS. ARTHRITIS RHEUM. 20, 73.
- 102.- INSEL, R.A., y MERLER, E. (1977). THE NECESITY FOR T CELL FOR HUMAN TONSIL B CELL RESPONSE TO POKEWEEED MITOGEN: INDUCTION OF DNA SYNTHESIS. IMMUNOGLOBULIN AND SPECIFIC ANTI BODY PRODUCTION WITH A T CELL HELPER FACTOR PRODUCED WITH POKEWEEED MITOGEN. J. IMMUNOL. 118, 2009.

- 103.- JANOSSY, G., y GREAVES, M.F., (1971). LYMPHOCYTE ACTIVATION I. RESPONSE OF T AND B LYMPHOCYTES TO PHYTOMITOGENS. CLIN. EXP. IMMUNOL. 9, 483.
- 104.- JANOSSY, G., GREAVES, M.F., DOENHOFF, M.J., y SNAJAR, J., (1973). LYMPHOCYTE ACTIVATION I. QUANTITATION OF PROLIFERATIVE RESPONSES TO MITOGENS USING DEFINED T AND B CELL POPULATIONS. CLIN. EXP. IMMUNOL. 14, 581.
- 105.- JANOSSY, G., SHOHAT, M., GREAVES, M.F., y DOURMASHKIN, R.R. (1973). LYMPHOCYTE ACTIVATION IV THE ULTRASTRUCTURAL PATTERN OF THE RESPONSE OF MOUSE T AND B CELLS TO MITOGENIC STIMULATION IN VITRO. IMMUNOL. LOND. 24, 211.
- 106.- JANOSSY, G., y GREAVES, M.F., (1975). FUNCTIONAL ANALYSIS OF MURINE AND HUMAN B LYMPHOCYTES SUBSETS. TRANSPLANT. REV. 24, 117.
- 107.- JERNE N.K., y NORDIN, A.A. (1963). PLAQUE FORMATION IN AGAR BY SINGLE ANTIBODY-PRODUCING CELLS. SCIENCE 140, 405.
- 108.- JONES, G., (1973). THE NUMBER OF REACTIVE CELLS IN MICE - LYMPHOCYTES CULTURES STIMULATED WITH PHYTOHEMAGGLUTININ, CONCAVALIN A OR HYSTOCOMPATIBILITY ANTIGEN. J. IMMUNOL. 111, 914,
109. KATZ, D.H., DORF, M.E., y BENACERRAF, B., (1974). CELL INTERACTIONS BETWEEN HYSTOCOMPATIBLE T AND B LYMPHOCYTES. VI COOPERATIVE RESPONSE BETWEEN LYMPHOCYTES DERIVED FROM MOUSE DONOR STRAINS DIFFERING AT GENES IN THE S AND D REGIONS OF THE H-2 COMPLEX. J. EXP. MED. 140, 290.

- 110.- KATZ, P., y FAUCI, A.S., (1978). ACTIVATION OF HUMAN B LYMPHOCYTES VII. THE REGULARORY EFFECT OF CYCLIC ADENO SINE MONOPHOSPHATE ON HUMAN B CELL ACTIVATION. J. ALLER GY CLIN. IMMUNOL. 61, 334.
- 111.- KATZ, P., HAYNES, B.F., y FAUCI, A.S. (1979). ABERRANT REGULATION OF B-CELL FUNCTION IN IMMUNOLOGICALLY MEDIATED DISEASES: SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND SARCOIDOSIS. EN ANTIBODY PRODUCTION IN MAN p 351 (ED. A.S. FANCI, y R. E. BALLIEUX) ACADEMIC PRESS.
- 112.- KEIGHTLEY, R.G., COOPER, M.D., y LAWTON, A.R., (1976). THE T CELL DEPENDENCE OF B CELL DIFFERENTIATION INDUCED BY POKEWEEED MITOGENS. J. IMMUNOL. 117, 1538.
- 113.- KIESSLING, M., SPECK, B., y GOSELINK, H., (1972). EFFECTS OF HYDROCORTISONE ON LYMPHOCYTES STIMULATED BY PHYTOHAEMA GGLUTININ AND POKEWEEED MITOGEN. VOX. SANG. (BASEL) 23 , 344.
- 114.- KIRCHNER, H., FERNBACH, B.R., y HERBERMAN, R.B., (1976). MACROPHAGES SUPPRESSING T AND B CELL MITOGEN RESPONSES AND THE MIXED LEUKOCYTE REACTION . EN: MITOGENS IN IMMUNOBIO_ LOGY . p. 495. ED.: OPPENHEIM, J.J. y ROSENSTREICH, L., ACADEMIC PRESS. N. Y.
- 115.- KISHIMOTO, S., TOMINO, S., MITSUYA, H., y FUJIWARA, H., (1979). AGE-RELATED CHANGES IN SUPPRESSOR FUNCTIONS OF - HUMAN T- CELLS. J. IMMUNOL. 123, 1586.

- 116.- KOSKI, I.R., POPLACK, D.G., y BLEASE, R.M., (1976). A NONSPECIFIC ESTERASE STAIN FOR THE IDENTIFICATION OF MONOCYTES AND MACROPHAGES. EN: IN VITRO METHODS IN CELL MEDIATED AND TUMOR IMMUNITY. p. 359-362. BLOOM, R.B., y DAVID, J. R., ACADEMIC PRESS. N.Y.
- 117.- KNAPP, W., y BAUMGARTEN, G., (1978) MONOCYTE MEDIATED - SUPPRESSION OF HUMAN B LYMPHOCYTE DIFFERENTIATION IN - VITRO. J. IMMUNOL. 121, 1177.
- 118.- KRAKAUER, R.S., GLOUGH, J.D. FRANK, S., y SUNDEEN, J.T., (1979) SUPPRESSOR CELL FUNCTION DEFECT IN IDIOPATHIC SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL. 14, 327.
- 119.- KURLAND, J.E., KINLADE, P.W., y MOORE, M.A., S., (1977). - REGULATION OF B LYMPHOCYTE CLONAL PROLIFERATION BY STIMULATORY AND INHIBITORY MACROPHAGE-DERIVED FACTORS. J. EXP. MED. 146, 1420.
- 120.- LEE, K. (1977). CORTISONE AS A PROBE FOR CELL INTERACTION IN THE GENERATION OF CYTOTOXIC T CELLS I. EFFECTS ON HELPER CELLS, CYTOTOXIC T CELL PRECURSORS AND ACCESSORY CELLS. J. IMMUNOL. 119, 1836.
- 121.- LEE, T.P., y REED, C.E., (1977). EFFECTS OF STEROIDS ON THE REGULATION OF THE LEVELS OF CYCLIC AMP IN HUMAN LYMPHOCYTES. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM. 78, 998.
- 122.- LEVIS, W.R., y ROBBINS, J.H., (1970). EFFECT OF GLASS ADHERENT CELLS ON THE BLASTOGENIC RESPONSE OF PURIFIED LYMPHOCYTES TO PHYTOHEMAGGLUTININ. EXP. CELL. RES. 61, 153.

- 123.- LINDHAL-KIESLING, K., y PETERSON, R.D.A. (1969). THE MECHANISM OF PHYTOHEMAGGLUTININ (PHA) ACTION. II THE EFFECT OF CERTAIN ENZYMES AND SUGARS. EXP. CELL. RES. 55, 81.
- 124.- LIPPMAN, M., y BARR, R., (1977). GLUCOCORTICOID RECEPTORS IN PURIFIED SUBPOPULATIONS OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES. J. IMMUNOL. 118, 1977.
- 125.- LIPSKY, P.E., GINSBURG, W.W., FINKELMAN, F.D., y ZIFF, M. (1978). CONTROL OF HUMAN B LYMPHOCYTES RESPONSIVENESS: - ENHANCED SUPPRESSOR T CELL ACTIVITY AFTER IN VITRO INCUBATION. J. IMMUNOL. 120, 902.
- 126.- LUNDGREN, G., (1970). IN VITRO CYTOTOXICITY BY HUMAN LYMPHOCYTES FROM INDIVIDUALS IMMUNIZED AGAINST HYSTOCOMPATIBILITY ANTIGENS. I. KINETICS AND SPECIFICITY OF THE REACTIONS. INFLUENCE OF METABOLIC INHIBITORS AND ANTI-LEUKOCYTE SERUM. CLIN. EXP. IMMUNOL. 6, 664.
- 127.- LUZZATI, A.L., TAUSSING, M.J., MEO, T., y PERNIS, B., (1976) INDUCTION OF AN ANTIBODY RESPONSE IN CULTURE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES. J. EXP. MED. 144, 573.
- 128.- LYDYARD, R.M., y HAYWARD, A.R., (1979) INDUCTION OF SUPPRESSION THROUGH HUMAN T CELL INTERACTIONS. CLIN. EXP. IMMUNOL. 39, 496.
- 129.- MACGREGOR, R.R., SPAGNUOLO, P.J., LENTNEK, A.L., (1974). INHIBITION OF GRANULOCYTE ADHERENCE BY ETHANOL, PREDNISONE, AND ASPIRIN MEASURED WITH AN ASSAY SYSTEM. N. ENGL. J. MED. 291, 642.

- 130.- McMILLAN, R., LONGMIRE, R.L., YELENOSKY, R., LANG, J.E., HEAD, V., y CRADDOCK, C.G., (1972). IMMUNOGLOBULIN SYNTHESIS BY HUMAN LYMPHOIDS TISSUES: NORMAL BONE MARROW AS A MAJOR SITE OF IgG PRODUCTION. J. IMMUNOL. 109, 1386.
- 131.- McMILLAN, R., ALTMAN, L.C., y ROSENSTREICH, D.L., (1975). INHIBITION OF IN VITRO LYMPHOKINE SYNTHESIS BY GLUCOCORTI COSTEROIDS. J. OF IMMUNOL. 115, 476.
- 132.- MENDELSON, J., MUTLER, M.,M. BOONE, R.F., (1973). ENHANCED EFFECTS OF PROSTAGLANDIN E₁ AND DIBUTYROL CYCLIC AMP ON HUMAN LYMPHOCYTES IN PRESENSE OF CORTISOL. J. CLIN. INVEST. 52, 2129.
- 133.- MILLER, J.F.A.P. y MITCHELL, G.T. (1968). IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF THYMUS AND THORACIC DUCT LYMPHOCITES. PROC. NAT. ACAD. SCI. USA 59, 296.
- 134.- MILLER, K.B. y SHWARTZ, R.S., (1979). FAMILIAL ABNORMALITIES OF SUPPRESSOR-CELL FUNCTION IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. N. ENGL. J. MED. 301, 803.
- 135.- MISHELL, R.I., SHIIGI, J.M., MISHELL, B.B., GRABSTEIN, K., y SHIIGI, S.M., (1980). PREVENTION OF THE IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECTS OF GLUCOCORTICOSTEROIDS BY CELL FREE FACTORS FROM ADJUVANT-ACTIVATED ACCESORY CELLS. IMMUNOPHARMACOL. 2,233.
- 136.- MITCHINSON, N.A. (1971). THE CARRIER EFFECT IN THE SECONDARY RESPONSE TO HAPTEN-PROTEIN CONJUGATES. II. CELLULAR - COOPERATION. EUR. J. IMMUNOL. 1, 18.

- 137.- MONTZOURANIS, E., y BOREL, Y. (1979) DIFFERENT EFFECTS OF CORTISONE ON THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO T-DEPENDENT AND T-INDEPENDENT ANTIGENS. CELL. IMMUNOL. 43,202
- 138.- MOLLER, G., (1961). DEMONSTRATION OF MOUSE ISOANTIGENS AT A CELLULAR LEVEL BY THE FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE. J. EXP. MED. 114, 415.
- 139.- MOLLER, G., ANDERSSON, J., POHLIT, H., u SJOBERG, O., (1973). QUANTITATION OF THE NUMBER OF MITOGEN MOLECULES ACTIVATING DNA SYNTHESIS IN T AND B LYMPHOCYTES. CLIN EXP. IMMUNOL. 13, 89.
- 140.- MOLLER, G., : TRANSPLANT REV. VOL. 45, (1979).
- 141.- MORETTA, L., WEBB, S.R., GROSSI, C.E., LIDYARD, P.M., y COOPER, M.D., (1977). FUNCTIONAL ANALYSIS OF TWO HUMAN T-CELL SUBPOPULATIONS: HELP AND SUPPRESSION OF B CELL RESPONSES BY T CELL BEARING RECEPTORS FOR IgM (Tm) OR IgG (Tg). J. EXP. MED. 146, 184.
- 142.- MORIMOTO, C., (1978). LOSS OF SUPPRESSOR T-LYMPHOCYTE FUNCTION IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (SLE) . CLIN. EXP. IMMUNOL. 32, 125.
- 143.- MORITO, T., BANKHURST, A.D., y WILLIAMS, R.C., (1980). STUDIES OF T AND B CELL INTERACTIONS IN ADULT PATIENTS WITH COMBINED IMMUNODEFICIENCY. J. CLIN. INVEST. 65, 422.
- 144.- MORIYA, N., NAGAOKI, T., OKUDA, N., y TANIGUCHI, N., (1979). SUPPRESSION OF THE ADULT B CELL DIFFERENTIATION IN POKEWEEED MITOGEN-STIMULATED CULTURES BY Fc (IgG) RECEPTOR-NEGATIVE T CELLS FROM CORD BLOOD, J. IMMUNOL. 123, 1795.

- 145.- MOSIER, D.E., (1976). A REQUIREMENT FOR TWO CELL TYPES FOR ANTIBODY FORMATION IN VITRO. SCIENCE. 158, 1573.
- 146.- NEIFELD, J.P., LIPPMAN, M.E., y TORNEY, D.C., (1977). STEROID HORMONE RECEPTORS IN NORMAL HUMAN LYMPHOCYTES. INDUCTION OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR ACTIVITY BY PHYTOHEMAGGLUTININ STIMULATION. J. BIOL. CHEM. 252, 2972
- 147.- O'MALLEY, B.W., (1971). MECHANISMS OF ACTIONS OF STEROID HORMONES. N. ENGL. J. MED. 284, 370.
- 148.- OPPENHEIM, J.J., y ROSENSTREICH, D.L., (1976). SIGNALS REGULATING IN VITRO ACTIVATION OF LYMPHOCYTES. PROG. - ALLERGY, 20, 65.
- 149.- PARKER, C.W., HUBER, M.G., y BAUMANN, M.L., (1973). ALTERATIONS IN CYCLIC AMP METABOLISM IN HUMAN BRONCHIAL ASTHMA III LEUKOCYTES AND LYMPHOCYTES RESPONSES TO STEROIDS. J. CLIN. INVEST. 52, 1342.
- 150.- PARRILLO, J.E., y FAUCI, A.S., (1980) MECHANISMS OF CORTICOSTEROID ACTION ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS. III DIFFERENTIAL EFFECTS OF DEXAMETHASONE ADMINISTRATION ON SUBPOPULATIONS OF EFFECTOR CELLS MEDIATING CELLULAR CYTOTOXICITY IN MAN. CLIN. EXP. IMMUNOL. EN PRENSA.
- 151.- PAULI, R.M., SALLE, L., DE, HIGGINS, P., HENDERSON, E., NOAIN, A., y STRAUSS, B., (1973). PROLIFERATION OF STIMULATED HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES: PREFERENTIAL INCORPORATION OF CONCAVALIN A BY STIMULATED CELLS AND MITOGENIC ACTIVITY. J. IMMUNOL. 111, 424,

- 152.- PEAVY, D.L., ADLER, W.H., y SMITH, R.T., (1970). THE MITOGENIC EFFECTS OF ENDOTOXIN AND STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B ON MOUSE SPLEEN CELLS AND HUMAN PERIPHERAL - LYMPHOCYTES. J. IMMUNOL. 105, 1453.
- 153.- PLATTS-MILLS, F.A. E., y ISHIZAKA, K., (1975). IgG AND IgA DIPHTERIA ANTITOXIN RESPONSES FROM HUMAN TONSIL LYMPHOCYTES. J. IMMUNOL. 114, 1058.
- 154.- PLATTS-MILLS, T.A.E., OLDHAM, G., CASSIDY, J.T., WEBSTER, A.D.B., y DE LA CONCHA E.G., (1979) THE CELLULAR DEFECT IN IgA DEFICIENCY: POSSIBLE LINKS TO HYPOGAMMAGLOBULINEMIA. En: ANTIBODY PRODUCTION IN MAN. p. 367-388 (ED. A.S. FANCI y R.E. BALLI EUX) ACADEMIC PRESS.
- 155.- POWELL, A.E., y LEON, M., (1970). REVERSIBLE INTERACTION OF HUMAN LYMPHOCYTES WITH THE MITOGEN CONCANAVALIN A. EXP. CELL RES. 62, 315.
- 156.- RAFF, M.C., (1970). ROLE OF THYMUS-DERIVED LYMPHOCYTES IN THE SECONDARY HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN MICE. NATURE, 226 1257.
- 157.- RAGAN, C.A., GROKOST, W., y BOOTS, R.M., (1949). EFFECT OF ADRENOCORTICOTROPHIC HORMONE ON RHEUMATOID ARTHRITIS. AM. J. MED. 7, 741.
- 158.- REINHERZ, E.L., NADLER, L.M., SALLAM., S.E., y SCHLOSSMAN, S.F., (1979). SUBSET DERIVATION OF T-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN MAN. J. CLIN. INVEST. 64, 392.

- 159.- REINHERZ, E.L., RUBENSTEIN, A., GEHA, R.S., STRELKAUSKAS A.J., ROSEN, F.S., y SCHLOSSMAN, S.F., (1979). ABNORMALITIES OF IMMUNOREGULATORY T CELL IN DISORDERS OF IMMUNE - FUNCTION. N. ENGL. J. MED. 301, 1018.
- 160.- RICH, R.R., y PIERCE, C.W., (1973a). BIOLOGICAL EXPRESSIONS OF LYMPHOCYTE ACTIVATION. I. EFFECTS OF PHYTOMITOGENS ON ANTIBODY SYNTHESIS IN VITRO. J. EXP. MED. 137, 205.
- 161.- RICH, R.R., y PIERCE, C.W., (1973b). BIOLOGICAL EXPRESSIONS OF LYMPHOCYTE ACTIVATION. II GENERATION OF A POPULATION OF THYMUS-DERIVED SUPPRESSOR LYMPHOCYTES. J. EXP. MED. 137, 649
- 162.- RINEHART, J.J., SAGONE, A.L., BALCERZAK, S.P., ACKERMAN, G. A., y LOBUGLIO, A.F., (1975). EFFECT OF CORTICOSTEROID - THERAPY ON HUMAN MONOCYTE FUNCTION. N. ENGL. J. MED. 292, 236.
- 163.- RINEHART, J.J., ORSER, W., y KAPLAN, M.E., (1979). HUMAN MONOCYTE AND MACROPHAGE MODULATION OF LYMPHOCYTE PROLIFERATION. CELL. IMMUNOL. 44, 13.
- 164.- ROITT, I., GREAVES, M.F., TORRIGIANI, G., BROSTOFF, J., y PLAYFAIR, J.H.L., (1969). THE CELLULAR BASIS OF IMMUNOLOGICAL RESPONSE. LANCET, 2, 367.
- 165.- ROITT, I., (1971). ESSENTIAL IMMUNOLOGY. p1-3 ED- BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS. OXFORD. ENGLAND.
- 166.- ROSEMBERG, S.A., y LIPSKY, P.E., (1979). MONOCYTE DEPENDENCE OF POKEWEEED MITOGEN-INDUCED DIFFERENTIATION OF IMMUNOGLOBULIN-SECRETING CELLS FROM HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS. J. IMMUNOL. 12, 926.

- 167.- ROSENSTREICH, D.L., NOWOTNY, A., CHUSED, T., y MERGENHAGEN, S. E. (1973). IN VITRO TRANSFORMATION OF MOUSE BONE MARROW DERIVED (B) LYMPHOCYTES BY THE LIPID COMPONENT OF ENDOTOXIN. INFECT. IMMUNOL. 8, 406.
- 168.- SAKANE, T., STEINBERG, A.D., y GREEN, I., (1978). STUDIES OF IMMUNE FUNCTIONS OF PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. I DISFUNCTION OF SUPPRESSOR T-CELL ACTIVITY RELATED TO IMPAIRED GENERATION OF RATHER THAN RESPONSE TO SUPPRESSOR CELLS. ARTHRITIS AND RHEUMATISM. 21, 657.
- 169.- SAXON, A.R., STEVENS, H., y ASHMAN, R.F., (1977). REGULATION OF IMMUNOGLOBULIN PRODUCTION IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES: CELLULAR INTERACTIONS. J. IMMUNOL. 118, 1972.
- 170.- SAXON, A.R., STEVENS, H., RAMER, S.J., CLEMENTS, P.J., y YU, D.T., (1978). GLUCOCORTICOID ADMINISTERED IN VIVO INHIBIT SUPPRESSOR T LYMPHOCYTE FUNCTION AND DIMINISH B LYMPHOCYTE RESPONSIVENESS IN IN VITRO IMMUNOGLOBULIN SYNTHESIS. J. CLIN. INVEST. 922.
- 171.- SAXON, A.R., STEVENS, R.H., y GOLDE, D.W., (1979). HELPER AND SUPPRESSOR T-LYMPHOCYTE LEUKEMIA IN ATAXIA TELANGIECTASIA. N. ENGL. J. MED. 300, 700.
- 172.- SAYER, G., y TRAVIS, R.H., (1970). ADRENOCORTICOTROPHIC HORMONE: ADRENOCORTICAL STEROIDS AND THEIR SYNTHETIC ANALOGS. THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS. FOURTH EDITION. pp. 1604-1642. ED. by L.S. GOODMAN, AND A. GLIMAN. THE MACMILLAN COMPANY. NEW. YORK.

- 173.- SCHLESINGER, M., e ISRAEL, E., (1974). THE EFFECT OF LECTIN ON THE MIGRATION OF LYMPHOCYTES IN VIVO. CELL. IMMUNOL. 14, 66.
- 174.- SCHWARTZ, S.A., SHOU, L., GOOD, R.A., y CHOI, Y.S., (1977). SUPPRESSION OF IMMUNOGLOBULIN SYNTHESIS AND SECRETION BY PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES FROM NORMAL DONORS. PROC. NATL. ACAD. SIC. 74, 2099.
- 175.- SHOU, L., SHWARTZ, A.L., y GOOD, R.A., (1976). SUPPRESSOR CELL ACTIVITY AFTER CONCANAVALIN A TREATMENT OF LYMPHOCYTES FROM NORMAL DONORS. J. EXP. MED. 143, 1100.
- 176.- SIEGAL, F.P., SIEGAL, M. y GOOD, R.A., (1976). SUPPRESSION OF B CELL DIFFERENTIATION BY LEUKOCYTES FROM HYPOGAMMAGLOBULINEMIC PATIENTS. J. CLIN. INVEST. 58, 109.
- 177.- SIEGAL, F.P., y SIEGAL, M., (1977). ENHACEMENT BY IRRADIATED T CELLS OF HUMAN PLASMA CELL PRODUCTION: DISSECTION OF HELPER AND SUPPRESSOR FUNCTIONS. " IN VITRO". J. IMMUNOL. 113, 642.
- 178.- SIEGAL, F.P., SIEGAL, M., y GOOD, R.A., (1978). ROLE OF HELPER, SUPPRESSOR AND B CELL DEFECT IN THE PATHOGENESIS OF THE HYPOGAMMAGLOBULINEMIAS. N. ENGL. J. MED. 299, 172.
- 179.- SOOTHILL, J., (1975) EN; IMMUNODEFICIENCY IN MAN AND ANIMALS. p. 50. Ed. BERGSMAN, D., GOOD, R.A., y FINSTAD J., SINAUER. ASOC. INC. SUNDERLAND. MASSACHUSETTS.
- 180.- STASZAK, C. y GOODWIN, J.S., (1980). PROTAGLANDIN A MEDIATOR FOR THE INHIBITORY ACTION OF HISTAMINE, HYDROCORTISONE AND ISOPROTERENOL? CELL. IMMUNOL. 54, 351.

- 181.- STAVY, L., COHEN, I.R., y FELDMAN, M., (1973). THE EFFECT OF HYDROCORTISONE ON LYMPHOCYTE-MEDIATED CYTOLYSIS. CELL. IMMUNOL. 7, 302.
- 182.- STAVY, L., COHEN, I.R., y FELDMAN, M., (1974). STIMULATION OF RAT LYMPHOCYTE PROLIFERATION BY HYDROCORTISONE DURING THE INDUCTION OF CELL-MEDIATED IMMUNITY IN VITRO. TRANSPLANTATION 17.173.
- 183.- STEVENSON, H.C., y FAUCI, A.S., (1980) ACTIVATION OF HUMAN B LYMPHOCYTES XII. DIFFERENTIAL EFFECTS OF IN VITRO CYCLOPHOSPHAMIDE ON HUMAN LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS INVOLVED IN B CELL ACTIVATION. IMMUNOL; 39, 391.
- 184.- STOBO, J.D., (1977). IMMUNOSUPPRESSION IN MAN: SUPPRESSION BY MACROPHAGES CAN BE MEDIATED BY INTERACTIONS WITH REGULATORY T LYMPHOCYTES. J. IMMUNOL. 119, 918
- 185.- STRELKAUSKAS, A.J., CALLERY, R.T., McDOWELL, J., BOREL, Y., y SCHLOSSMAN, S.F., (1978). DIRECT EVIDENCE FOR LOSS OF HUMAN SUPPRESSOR CELLS DURING ACTIVE AUTOIMMUNE DISEASE. PROC. NATL. ACAD. SCI. 75, 5150.
- 186.- SULTZER, B.M., y NILSSON, B., (1972). PPD-TUBERCULIN- A B CELL MITOGEN. NATURE NEW. BIOL. 240, 198.
- 187.- TAKEMORI, T, y TADA, T. (1975). PROPERTIES OF ANTIGEN-SPECIFIC SUPPRESSIVE T-CELL FACTOR IN THE REGULATION OF ANTIBODY RESPONSE OF THE MOUSE. I. IN VIVO ACTIVITY AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION. J. EXP. MED. 142, 1241.
- 188.- TALAL, N., (1977). AUTOIMMUNITY AND LYMPHOID MALIGNANCY: MANIFESTATION OF IMMUNOREGULATION DISEQUILIBRIUM. EN: AUTOIMMUNITY p. 184-205. ED. TALAL, N. ACADEMIC PRESS.

- 189.- TAUSSING, M., (1974). T CELL FACTOR WHICH CAN REPLACE T CELLS IN VIVO. NATURE, 248, 234.
- 190.- THOMAS, Y., SOSMAN, J., RIGOYEN, O., FRIEDMAN, F.M., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., y CHESS, L., (1980). FUNCTIONAL ANALYSIS OF HUMAN T CELL SUBSETS DEFINED BY MONOCLONAL ANTIBODIES I. COLLABORATIVE T-T INTERACTIONS IN THE IMMUNOREGULATION OF B CELL DIFFERENTIATION. J. IMMUNOL. 125, 2402 .
- 191.- THOMPSON, E.B., y LIPPMAN, M.E., (1974)MECHANISM OF ACTION OF GLUCOCORTICOIDS. METABOLISM. 23, 159.
- 192.- THONG, Y.H., HENSEN, S.A., VINCENT, M.M., ROLA-PLESZCZYNSKY, M., WALSER, J.B., y BELLANTI, J.A., (1975). EFFECT OF HYDROCORTISONE ON IN VITRO CELLULAR IMMUNITY TO VIRUSES IN MAN. CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL. 3, 363
- 193.- THORN, G.W., (1973). THE ADRENAL CORTEX: REFLEXIONS, PROGRESS, AND SPECULATIONS. TRANS. ASSOC. AMER. PHYS.86,65.
- 194.- TILLYER, C.R., y BUTTERWORTH, P.H., (1980). DEXAMETHASONE ENHACEMENT OF THE INDUCTION OF CELLS BEARING RECEPTORS FOR IgM IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE CULTURE.CLIN. EXP. IMMUNOL. 40, 178.
- 195.- UNANUE, E.R., (1972). THE REGULATORY ROLE OF MACROPHAGES IN ANTIGENIC STIMULATION.ADV. IMMUNOL. 15, 95.
- 196.- VAN FURTH, R.y JONES, T.C., (1975). EFFECT OF GLUCOCORTICOIDS ON PHAGOSOME-LYSOSOME INTERACTION.INFECTION IMMUN. 12, 888.

- 197.-VAN ZWET, T.L., THOMPSON, S., y VAN FURTH, H., (1975) EFFECT OF GLUCOCORTICOSTEROIDS ON THE PHAGOCYTOSIS AND INTRACELLULAR KILLING BY PERITONEAL MACROPHAGES. INFECTION IMMUN. 12, 699
- 198.- WAHL, S.M., ALTMAN, L.C., y ROSENSTREICH, D.L., (1975) INHIBITION OF IN VITRO LYMPHOKINE SYNTHESIS BY GLUCOCORTICOSTEROIDS. J. IMMUNOL. 115, 476.
- 199.-WALDMANN, T.A., BRODER, S., BLAESE, R.M., DURM, M., BLACKMAN, M., y STROBER, W., (1974). ROLE OF SUPPRESSOR T-CELLS IN PATHOGENESIS OF COMMON VARIABLE HYPOGAMMAGLOBULINEMIA. LANCET. II. 609.
- 200.-WALDMANN, T.A., BRODER, S., DURM, M., MEADE, B., KRAKAUER, R., BLACKMAN, M., y GOLDMAN, C. (1976). EN: MITOGENS IN IMMUNOBIOLOGY. P. 509. ED.: OPPENHEIN, J.J., y ROSENSTREICH, D.L. ACADEMIC PRESS. N.Y.
- 201.-WALDMANN, T.A. BRODER, S., KRAKAUER, R., McDERMOTT, R.P., DURM, M., GOLDMAN, C., y MEADE, B. (1976) THE ROLE OF SUPPRESSOR CELLS IN THE PATHOGENESIS OF COMMON VARIABLE HYPOGAMMAGLOBULINEMIA ASSOCIATED WITH MYELOMA. FED. PROC. 35, 2067.
- 202.-WALDMANN, T.A. y BRODER, S. (1977) SUPPRESSOR CELLS IN THE REGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE. PROGRESS IN CLINICAL IMMUNOLOGY. 3, 155.
- 203.-WALDMAN, T.A., BLAESE, R.M., BRODER, S. y KRAKAUER, R. (1978) DISORDERS OF SUPPRESSOR IMMUNOREGULATORY CELLS IN THE PATHOGENESIS OF IMMUNODEFICIENCY AND AUTOIMMUNITY. ANN. INT. MED. 88, 226.

- 204.- WARD, P.A., (1966). THE CHEMOSSUPPRESSION OF CHEMOTAXIS.
J. EXP. MED. 124, 209.
- 205.- WASSERMAN, J., VON STEDINGK, L.V., BIBERFELD, G., y PER
TINI, B. (1979). THE EFFECT OF IRRADIATION ON T-CELL SU-
PPRESSION OF ELISA-DETERMINED Ig. PRODUCTION BY HUMAN
BLOOD B-CELLS IN VITRO. CLIN. EXP. IMMUNOL. 38, 366.
- 206.- WATSON, J. EPSTEIN, R., NAKOINZ, I. y RALPH, P. (1973).
THE ROLE OF HUMORAL FACTORS IN THE INITIATION OF IN VITRO
PRIMARY IMMUNE RESPONSE. II EFFECTS OF LYMPHOCYTE MITOGENS
J. IMMUNOL. 110, 43.
- 207.- WAXDAL, M. U. (1974) ISOLATION, CHARACTERISZATION AND
BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FIVE MITOGENS FROM POKEWEEED, BIO-
CHEMISTRY. 13, 3671.
- 208.- WEBEL, M.L., RITTS, R.E., TASWELL, H.F., DONADIO, J.V., y
WOODS, J.E., (1974). CELLULAR IMMUNITY AFTER VENOUS ADMINIS
TRATION OF METHYLPREDNISOLONE. J. LAB. CLIN. MED. 83, 383
- 209.- WEISSMANN, G., y THOMAS, L., (1963). STUDIES ON LYSOSOMES
II., THE EFFECT OF CORTISONE ON THE RELEASE OF ACID HYDRO
LASES FROM A LARGE GRANULE FRACTION OF RABBIT LIVER BY AN
EXCESS OF VITAMIN A. J. CLIN. INVEST. 42, 661.
- 210.- WESTON, W.L., CLAMAN, H. N., y KRUEGER, G.G., (1973). SITE
OF ACTION OF CORTISOL IN CELLULAR IMMUNITY. J. IMMUNOL. 110,
880.

- 211.- WIENER, E., MARMARY, Y. y CURELARU, Z., (1972). THE IN VITRO EFFECT OF HYDROCORTISONE ON THE UPTAKE AND INTRA CELLULAR DIGESTION OF PARTICULATE MATTER BY MACROPHAGE IN CULTURE. LAB. INVEST. 26, 220.
- 212.- WILLIAMS, T.W., y GRANGER, G.A., (1969). LYMPHOCYTES IN VITRO CYTOTOXICITY: CORRELATION OF DEPRESSION WITH RELEA SE OF LYMPHOTOXIN FROM HUMAN LYMPHOCYTES. J. IMMUNOL. 103, 170.
- 213.- WILSON, C.B., y REMINGTON, J.S., (1979). EFFECTS OF MONO CYTES FROM HUMAN NEONATES ON LYMPHOCYTE TRANSFORMATION. CLIN. EXP. IMMUNOL. 36, 511.
- 214.- WRIGHT, D.G., y MALAVISTA, S.E., (1973). MOBILIZATION AND EXTRACELLULAR RELEASE OF GRANULAR ENZYMES FROM HUMAN LEU KOCYTES DURING PHAGOCYTOSIS: INHIBITION BY COLCHICINE AND CORTISOL BUT NOT BY SALICYLATE. ARTHRITIS RHEUM. 16, 749.
- 215.- YOSHINAGA, M., YOSHINAGA, A., y WAKSMAN, B.H., (1972). REGU LATION OF LYMPHOCYTE RESPONSE IN VITRO. I. REGULATORY EFFE CT OF MACROPHAGES AND THYMUS-DEPENDENT (T) CELLS ON THE - RESPONSE OF THYMUS-INDEPENDENT (B) LYMPHOCYTES TO ENDOTO- XIN. J. EXP. MED. 136, 956.
- 216.- YODIN, S. (1979). ENHANCING AND SUPPRESSIVE EFFECTS OF MA CROPHAGES ON T LYMPHOCYTE STIMULATION IN VITRO. CELL. y IMMUNOL. 45, 377.

- 217.- YU, D.T., Y, CLEMENTS, P.L., PAULUS, H. E., PETER, J.B.,
LEVY, J., y BARNETT, E.V., (1974). HUMAN LYMPHOCYTE SUB
POPULATIONS. EFFECT OF CORTICOSTEROIDS. J. CLIN. INVEST.
53, 565.
- 218.- YU, D.T.Y., (1977). EFFECT OF CORTICOSTEROIDS ON LYMPHO
CYTE ACTIVATION. BLOOD 49, 873-881
- 219.- YU, D.T.Y., CLEMENST, P,J., y PEARSON, C.M., (1977). -
EFFECT OF CORTICOSTEROIDS ON EXERCISE-INDUCED LYMPHOCY
TOSIS. CLIN. EXP. IMMUNOL. 28, 326.
- 220.- ZWEIMAN, B., SLOTT, R.I., y ATKINS, P.C., (1976). HISTOLO
GIC STUDIES OF HUMAN SKIN TEST RESPONSES TO RAGWEED AND
COMPOUND 48/80 III. EFFECTS OF ALTERNATE-DAY STEROID -
THERAPY. J. ALLERGY. CLIN. IMMUNOL. 58, 657.