

## El "mito" de la diferenciación inmunológica entre lo "propio" y lo "no propio" y la existencia de un "equilibrio inmunológico u homeostasis inmunológica antígeno-dependiente"

J. Gras

Instituto Municipal de Investigación Médica. Barcelona.

**The "myth" of the immunologic "self/non-self" discrimination and the existence of an "immunological equilibrium" or "antigen-dependent immunologic homeostasis"**

It was noticed, since the beginning of immunology, the capacity of the organism to readily produce antibodies to antigens from the external environment and the lack of response to the organism's own components; i.e. the organism discriminated, as it were, the "self" from the "non-self".

Nowadays, the occurrence of low levels of autoantibodies to most self-components (whether cell-bound or circulating) has to be accepted as a normal event (a note in support for this is included in the text); therefore, the "self/non-self" discrimination becomes unacceptable.

Several mechanisms have been postulated to explain the regulation of the response to self-antigens. Those mechanisms are reviewed and the conclusion is reached that the only two valid models are the "Immunologic Homeostasis" and the "Clonal Abortion or Anergy", the latter being a stage of the former.

We have repeatedly shown that persistent immunization, for a sufficiently long time, causes the IgM-to-IgG switch and, finally, the response ex-

haustion; the latter lasts as long as the antigenic stimulation does and disappears when immunization is discontinued. We have consequently postulated the existence of an "immunologic equilibrium" or "antigen-dependent immunologic homeostasis" between the antigenic stimulation and the B-cell maturation-differentiation. The different stages of that maturation-differentiation are discussed; the IgM/IgG switch would be triggered by the antigen at the pre-B, or immature B cell stage and, at an earlier stage, the antigen would inhibit B-cell maturation (Nossal's "clonal energy"). This "clonal energy" corresponds to one of the periods of the "immunologic equilibrium" or "antigen-dependent immunologic homeostasis". This immunologic homeostasis has a good biological sense. This, in the face of a first antigenic contact, the IgM response is fast, localized, and short-lived; if the antigenic stimulation persists, the response switches to IgG, which is long-lived, accumulates and diffuses throughout the organism; when the antigen is always present, or persists for a long time, inhibition or tolerance (i.e., unresponsiveness) ensues. Because the response to self-antigens is regulated by the above-mentioned equilibrium, there is no need to postulate a mechanism discriminating self from non-self.

Desde los inicios de la inmunología destacó el hecho de la facilidad con que un organismo forma anticuerpos frente a antígenos procedentes del medio externo, mientras que no los crea frente a sus propios constituyentes, como si el organismo reconociese lo que es "propio" de lo que "no es propio", y no reaccionase frente a los primeros. Es lo que Ehrlich formuló con su doctrina del *horror autotoxicus*. La inexistencia de autoanticuerpos frente a lo propio se aceptó hasta hace relativamente pocos años, a pesar de que también desde los inicios de la inmunología (Metalnikov, 1900) se observó la posibilidad de formación de autoanticuerpos anticristalino y anti-spermatozoides. En la actualidad, la existencia de autoanticuerpos a niveles bajos ha de aceptarse como un hecho normal, como veremos a continuación.

### LA EXISTENCIA DE AUTOANTICUERPOS ES UN HECHO FISIOLÓGICO

Desde los trabajos de Kidd y Friedenwald en 1942, que demostraron la existencia normal en el conejo de factores circulantes antihísticos y en especial a partir de la década de los sesenta se ha descrito la presencia normal de autoanticuerpos a títulos bajos y a una frecuencia que aumenta con la edad<sup>1,2</sup> frente a un gran número de antígenos circulantes o hísticos, como hemos destacado por extensión con anterioridad<sup>3,4</sup>. Muchos de los que se señalaron inicialmente en sueros patológicos se ha demostrado después que también existen en los sueros normales, a títulos bajos, como el factor Waller-Rose, que es un anti-gamma<sup>5</sup> y los antinucleares<sup>6,7</sup>. También se ha comprobado que pueden aparecer

Correspondencia y solicitud de separatas: J. Gras, Instituto Municipal de Investigación Médica. P. Maritim 25-29, 08003 Barcelona.

anticuerpos antihísticos provocando experimentalmente lesiones tóxicas de un órgano o inyectando papilla de órganos<sup>13</sup>. En este sentido son muy demostrativos los datos de la clínica humana en el caso de las cardiomiomas y vascuomiomas; en ambos casos, los autoanticuerpos llegan a encontrarse en el 90 a 100 % de los operados y frente a antígenos para los que normalmente no se encuentran o a títulos bajos y con una especificidad muy superior a la de los naturales<sup>14, 15</sup>.

La existencia de autoanticuerpos ha sido comprobada, no tan sólo frente a antígenos histiomas, sino también frente a antígenos circulantes de hemafías o leucocitos, pero "internos" u "ocultos", que se ponen de manifiesto, tanto como anticuerpos circulantes, como a nivel de células formadoras de placas (CFP), por tratamiento de dichas células por enzimas proteolíticas (Cunningham<sup>16, 18</sup>). Desde las observaciones iniciales de Landsteiner en 1903, se conoce la existencia de "crioaglutininas" frente a los hematíes propios, que corresponden al sistema I-i (Wiener et al<sup>19</sup>, Marsh y Jenkins<sup>20</sup>), sistema que presenta la particularidad de un desarrollo tardío; los hematíes del recién nacido son aglutinados débilmente por los anti-I y fuertemente por los anti-i. En los primeros meses de vida aumenta progresivamente la aglutinabilidad anti-I y disminuye la anti-i. El antígeno I puede considerarse como precursor de las sustancias de grupo sanguíneo (Vicari y Kabat<sup>21, 22</sup>). Personalmente hemos comprobado que su título varía con las donaciones de sangre y con la eritroforesis experimental<sup>23, 24</sup>.

Estas crioaglutininas anti-I son heterogéneas<sup>25</sup> y aumentan considerablemente en el hombre en la neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* y en los conejos por inyección de dicho *Mycoplasma*, *Streptococcus MG* o *Listeria monocytogenes*, probablemente por reacciones cruzadas entre el antígeno I y antígenos de estos gérmenes<sup>26, 27</sup>. La posibilidad de aparición de autoanticuerpos antihematíes se ha

comprobado experimentalmente en el ratón por inyección de hematíes de rata, que puede llegar a inducir una anemia autoinmune<sup>28, 29</sup>.

Recientemente por técnicas de inmunoadsorción se ha comprobado la presencia en el suero normal de anticuerpos antitubulina, actina, mioglobina, tiroglobulina, fetuina, albúmina, transferrina. Estos autoanticuerpos se han detectado también en el ratón, incluso mediante la obtención de hibridomas, comprobando que algunos de estos autoanticuerpos son polifuncionales, es decir que reaccionan con más de uno de estos antígenos e incluso con TNP<sup>30, 32</sup>. Estos investigadores sugieren<sup>30</sup> que si estos estudios se extienden a otros antígenos, se encontrarán en el suero humano normal anticuerpos naturales capaces de reaccionar con prácticamente todos los antígenos "propios".

Un contraste muy interesante es el que se observa en el sistema ABO de grupos sanguíneos humanos. Para simplificar nos fijaremos en los grupos A y B. En un individuo A se encuentran aglutininas anti-B y, viceversa, en un individuo B, anti-A, a títulos netamente detectables, pero es rarísimo encontrar anti-A en un individuo A, o anti-B en uno B. En cuanto a los subtipos de A, se encuentra anti-A<sub>2</sub> en un 0,40 % de los A<sub>1</sub> y anti-A<sub>1</sub> en un 20 % de los A<sub>2</sub> (Wiener<sup>33</sup>). La especificidad de estos antígenos de grupo sanguíneo les viene dada por la incorporación a moléculas precursoras de unidades de fucosa, galactosa o acetilgalactosamina (Watkins<sup>34</sup>). Recientemente Galili et al<sup>35</sup> han comprobado la existencia de un anticuerpo natural con especificidad anti- $\alpha$ -galactosyl a títulos altos y en cantidades de 50 a 100  $\mu$ g/ml en todos los individuos estudiados. Únicamente un 1 % de los hematíes normales reaccionan con el mismo, pero en mucha mayor proporción en los individuos con Talasemia o anemia de células falciformes. Estas sustancias de grupo sanguíneo se encuentran también en los individuos secretores, en la saliva y en líquidos orgánicos y fuera de nues-

tro organismo en bacterias y vegetales, por lo que estamos constantemente estimulados por las mismas. Resulta por lo tanto, que un individuo A está sometido a un estímulo constante de su propia sustancia A y de la procedente del exterior y no presenta autoanticuerpos, sino son anti el subtipo que no es el suyo. Por el contrario, un individuo A está sometido únicamente a los estímulos de la sustancia B procedente del exterior, esporádicos y menos intensos, y tiene anti-B. Igualmente, un individuo B está constantemente estimulado por su propia sustancia B y la que procede del exterior y en rarísimas ocasiones se ha señalado la presencia de autoanti-B; por el contrario, tiene aglutininas anti-A. La existencia de autoanti-B se ha señalado en individuos con antígenos B débiles característicos del subtipo B<sub>u</sub>, en algún caso de individuos A<sub>1</sub>B y, recientemente, un anti-B en un paciente con una leucemia aguda<sup>36</sup>.

La existencia de una reacción normal con activación de células T, frente a células no-T "autólogas", es decir la reacción "linfocitaria mixta autóloga", es un hecho conocido desde los trabajos de Opelz et al<sup>37</sup> en 1975 y los de Kuntz et al<sup>38</sup> en 1976; las células T, como ya hemos visto para las B, pueden también ser estimuladas por "componentes propios". Esta activación de las T está ligada al reconocimiento de antígenos de superficie de células no-T, correspondientes al complejo de histocompatibilidad de clase II (Romani et al<sup>39</sup>).

Es evidente que la existencia de autoanticuerpos es un hecho normal, aunque en general a niveles muy bajos, y que estos niveles están en función de la naturaleza del antígeno y de su situación dentro del organismo. También las células-T pueden ser activadas por células no-T propias en los normales. Por tanto, no puede aceptarse la diferenciación inmunológica entre lo "propio" y lo "no propio", y lo que debemos explicar es el mecanismo que regula el nivel de la respuesta o su inhibición. Son bastan-

tes los mecanismos que se han postulado para explicar la no formación o la regulación de la formación de autoanticuerpos, que sintetizamos en la tabla I y que vamos a exponer y valorar brevemente.

**ABORTO DE LA CLONA CORRESPONDIENTE**

Al abandonarse las teorías instructivas de la formación de anticuerpos e imponerse las selectivas, y coincidiendo con las investigaciones sobre la tolerancia inmunológica inducida por el contacto pre o perinatal con un antígeno, Burnet y Lederberg, sugirieron en 1957-1959 la hipótesis de la "supresión o delección clonal" o de las "clonas prohibidas". En síntesis postula que el contacto de un determinado antígeno en una fase de inmadurez de la célula formadora del correspondiente anticuerpo la elimina<sup>40</sup>; la eliminación de una clona de determinada especificidad implica que no puede reaparecer sin la aparición de un mutante con dicha especificidad, lo que es muy difícil de compaginar con la existencia normal de autoanticuerpos tan abundantes.

Para obviar esta dificultad, Nossal y Pike propusieron, en 1975, la hipótesis del "aborto clonal"<sup>41</sup>, en la que la clona no es eliminada sino *frenada en un determinado estadio de su maduración*. Comprueban que las células de la médula ósea pueden tolerarse a concentraciones muy bajas de un *antígeno monomérico*, pero no las células de bazo. La maduración del linfocito B pasa por diferentes fases antes de llegar a la B madura con receptores de membrana Ig<sup>42,43</sup> y en una de éstas, la acción del antígeno la mataría o inhibiría su maduración, pero sin influir en las que están en una fase anterior o posterior. Después lo interpretan como una "anergia de la clona" correspondiente, sobre lo que volveremos más adelante, ya que la consideramos de una importancia fundamental pero que no debe considerarse aisladamente sino integrada dentro de lo que formulamos

como un "equilibrio inmunológico u homeostasis inmunológica antígeno-dependiente".

**LOS AUTOANTICUERPOS NORMALES SON IgM Y TENDRIAN UNA FUNCION FISIOLÓGICA**

Dado que la gran mayoría de anticuerpos naturales son IgM, Weir y Elson sugirieron en 1969<sup>44</sup> que esto correspondería a una forma limitada de respuesta contra los antígenos históricos liberados por lesiones y que tendrían una función fisiológica para la remoción de los mismos. Como señalaremos al estudiar la homeostasis inmunológica, el paso de IgM a IgG depende de la intensidad y persistencia del estímulo antigénico, por lo que este hecho ha de interpretarse como una consecuencia de que los autoestímulos antigénicos son en general poco intensos y discontinuos.

**BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA POR LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LOS ANTIGENOS PROPIOS**

En 1974, Grabar<sup>45</sup> considera que la función del sistema inmunológico ha de interpretarse fundamentalmente como involucrada en el transporte de productos metabólicos y catabólicos, tanto de substancias residuales como de las procedentes del exterior, en el sentido de un sistema de "higiene". Normalmente, los componentes de una célula muerta son degradados por enzimas autolíticas, pero en ciertas condiciones, p. ej. después de una destrucción masiva, esta acción no sería suficiente y se estimularía la formación de autoanticuerpos que fijarían los autoantígenos liberados facilitando su fagocitosis y subsiguiente degradación. También acepta la posibilidad de que estos autoantígenos insuficientemente degradados puedan fijarse a los receptores de membrana tolerándolos. La idea de que los anticuerpos tienen funda-

**TABLA I. Posibles mecanismos de regulación de la formación de autoanticuerpos**

<p>Aborto de la clona correspondiente (Nossal y Pike, 1975)</p> <p>Los autoanticuerpos normales son IgM y tendrían una función fisiológica (Weir y Elson, 1969)</p> <p>Bloqueo de los receptores de membrana por los productos de degradación de los antígenos propios (Grabar, 1974)</p> <p>El reconocimiento de un determinante antigénico induce la parálisis y el reconocimiento de dos, la activación (Bretscher y Cohn, 1970)</p> <p>La regulación de la respuesta entre lo "propio" y lo "no propio", depende únicamente de las células T (Coutinho, 1980)</p> <p>Existencia de un "equilibrio inmunológico" u "homeostasis inmunológica antigena dependiente" (Gras, 1968)</p>
--

mentalmente la función de captación y transporte de las substancias no propias que penetran en el organismo por vía no digestiva, para facilitar su ulterior fagocitosis y metabolización lisosómica la creemos correcta y la habíamos defendido ya en 1961<sup>46</sup>. La posibilidad de que induzcan un bloqueo de receptores también puede aceptarse, sin olvidar que este bloqueo se induce óptimamente con un cierto grado de polivalencia de un mismo determinante antigénico en la molécula portadora<sup>47,50</sup> y que el máximo efecto de tolerancia se obtiene precisamente en la célula pre-β o β-inmadura, sin o con pocos receptores de membrana. Grabar<sup>45</sup> señala que la tolerancia de la célula T parece más difícil de explicar, pero que también es posible su bloqueo.

**EL RECONOCIMIENTO DE UN DETERMINANTE ANTIGENICO INDUCE LA PARALISIS Y EL RECONOCIMIENTO DE DOS, LA ACTIVACION**

*Toda célula madura antígeno-sensible puede ser tolerada o activada. Es tolerada si reconoce un*

solo determinante antigénico a través del receptor de membrana anticuerpo específico para el mismo, al que se fija. Para ser activada a la secreción del mismo, requeriría el reconocimiento de otro determinante antigénico, el determinante del *carrier*, a través de otro anticuerpo, el *carrier* anticuerpo, que al unirse al antígeno presentaría modificaciones conformacionales que inducirían una segunda señal a la célula antígeno-sensible, que la activaría (Bretscher y Cohn<sup>51</sup>); el *carrier* anticuerpo sería probablemente una inmunoglobulina especial, sintetizada por las células T. En este sentido, todos los antígenos serían T-dependientes. Las modificaciones conformacionales se producirían en las regiones constantes del *carrier* anticuerpo y estimularían a una unidad de interacción sensorial, situada junto al receptor anticuerpo, activándolo. Sugieren que de esta forma resulta fácil tolerar tanto a la célula B como a la T por un contacto inicial único de ambos tipos de células con un antígeno propio, mientras que el doble estímulo sería mucho más difícil. Esta hipótesis no tiene en cuenta, por una parte, que la tolerancia es más fácil de inducir en las células inmaduras, y que ha de distinguirse del bloqueo a nivel de membrana, el cual requiere la multiplicidad de un mismo determinante antigénico (hapteno) en el antígeno. Por otra parte, también se ha señalado la activación de una célula madura antígeno-sensible con un complejo antigénico constituido por un determinante antigénico (hapteno) conjugado a un *carrier* inerte<sup>52</sup>.

Al desarrollarse los estudios sobre los activadores policlonales de la respuesta en anticuerpos y la formulación por Coutinho y Möller<sup>53</sup> de la teoría de la "señal única no específica", Cohn y Blomberg<sup>54</sup> reformularon su hipótesis de las dos señales en el sentido de que el reconocimiento del antígeno por una célula B y una T induce en esta última, a través del "anticuerpo asociado" un estímulo mitogénico, que activa al segundo receptor de la célula B, o receptor mito-

génico. Como las células B maduran antes que las T en la vida fetal, serían toleradas a medida de su aparición, por falta de la señal asociada de activación.

### LA REGULACION DE LA RESPUESTA ENTRE LO "PROPIO" Y LO "NO PROPIO" DEPENDE ÚNICAMENTE DE LAS CELULAS T

Aceptando de manera general y absoluta que las células B no se activan al unirse con un antígeno T-dependiente sin la participación de mecanismos de ayuda, ni se activan por la fijación de haptenos y que, por el contrario, pueden activarse no específicamente por diversos mitógenos (activación policlonal) Coutinho y Möller formulan la hipótesis de la "señal única no específica"<sup>55</sup>; la activación se induce por la señal no específica y los receptores específicos servirían únicamente para aumentar su concentración. Los antígenos T-independientes poseerían intrínsecamente factores mitogénicos capaces de inducir la segunda señal. Por lo tanto, un determinado nivel de segunda señal activaría y un exceso de la misma toleraría, proceda de donde proceda dicha señal. La tolerancia frente a los antígenos propios se explicaría por una mayor sensibilidad de las B inmaduras a una dosis supraóptima de la segunda señal, lo que también ocurriría para las T. Al desarrollarse por Jerne<sup>56</sup> la teoría del retículo a través de los "idiotipos" de las Ig, que representan imágenes internas de todos los posibles determinantes antigénicos externos, y la reacción idiotipo-antidiotipo (anti-anticuerpo), lleva a Coutinho<sup>56,57</sup> a aceptar que las células B no pueden distinguir los antígenos "propios" de los "no-propios", y que la discriminación funcional de lo "propio" y lo "no propio" ha de ser función exclusiva de las células T.

Esta hipótesis de la señal única no específica se basa en la aceptación de que las células B pueden ser activadas únicamente por un

estímulo policlonal, lo que no creemos esté claramente demostrado, puesto que la estimulación que se induce es proporcional al *back-ground* de CFP preexistente, y que si éste no preexiste no hay activación<sup>58,59</sup> que algunos mitógenos requieren la previa activación de células accesorias<sup>60</sup> y que su acción es sinérgica a la del antígeno e inversamente proporcional a la intensidad del estímulo antigénico<sup>61,62</sup>.

### LOS RECEPTORES ANTIGENICOS DE LAS CELULAS T Y SU ACTIVACION

En principio se pensó que los receptores antigénicos de las células T serían los mismos o similares a los de las B, en el sentido de que tendrían las mismas cadenas variables, con distinta cadena constante, pero posteriormente se presentó cierta discrepancia por la gran variabilidad de datos que se obtenían. Recientemente se ha comprobado que dicho receptor está constituido por dos cadenas, la  $\beta$  y la  $\alpha$ , de unos 40.000 dalton, con homologías con las Ig. La que se conoce mejor es la  $\beta$ , que tendría una parte variable y una constante, de la que existirían, en la línea germinal, dos genes para la parte constante (C  $\beta_1$  y C  $\beta_2$ ) y también genes V, D y J, pero con una variabilidad mucho menor que en el caso de las Ig<sup>63,67</sup> y que se ordenarían de una forma similar a la de éstas. Otras moléculas de la superficie celular muestran homologías con las Ig, muchas de ellas sin funciones de reconocimiento<sup>67,68</sup>. La primera que se comprobó, fue la existencia de una reacción cruzada entre anticuerpos anticadena  $\alpha$  y la  $\beta_2$ -microglobulina<sup>69</sup>, que corresponden a la cadena menor de los antígenos de histocompatibilidad de clase I. Estos antígenos están constituidos por dos cadenas polipeptídicas, la mayor de las cuales es un glucopéptido de unos 44.000 dalton, muy polimorfa, y a ella corresponde la especificidad antigénica. La menor, de unos 12.000 dalton, no glucosilada, es la

misma en todas ellas, no está codificada por los genes de histocompatibilidad y corresponde a la  $\beta_2$ -microglobulina. La clase II de antígenos de histocompatibilidad (HLA-D/DR en el hombre, Ia en el ratón), está constituida por dos glucoproteínas de unos 33.000 dalton la  $\alpha$  y de unos 25.000 dalton la  $\beta$ , sin ninguna relación con la  $\beta_2$ -microglobulina<sup>70, 73</sup>.

Los antígenos de histocompatibilidad desempeñan un gran papel en la activación por el antígeno y en las funciones efectoras de las células T. Las T cooperadoras (*helper*) de hipersensibilidad retardada y activadoras de los macrófagos requieren la colaboración de isoantígenos de la clase II, y las citotóxicas la colaboración de isoantígenos de la clase I, aunque esta especialización funcional no es absolutamente estricta<sup>74</sup>. Los linfocitos T al madurar en el timo, se hacen tolerantes para los antígenos de histocompatibilidad que poseen las células no linfoides del mismo, normalmente singénicas, y son éstas, precisamente, las que necesitan para su colaboración con las B y los macrófagos, así como en sus funciones de citotoxicidad<sup>75-78</sup>.

Esta necesidad de colaboración que tienen las células T, puede explicarse por las dos posibilidades siguientes: a) que necesiten para su activación el reconocimiento de dos determinantes antigénicos, uno correspondiente a un antígeno de histocompatibilidad y otro a un antígeno extraño X (no propio); o b) que posean un receptor único para un determinante neoantigénico, formado por la acción del antígeno X sobre un antígeno propio de histocompatibilidad. Esta acción correspondería seguramente a la formación de un complejo entre ambos o a una modificación inducida por el antígeno X en la estructura del antígeno de histocompatibilidad. Ninguna de estas dos posibilidades está unánimemente aceptada<sup>75, 76, 79-82</sup>, aunque personalmente nos parece más aceptable la última, dentro del contexto de los mecanismos inmunológicos conocidos y está en concordancia con el gran polimorfis-

mo de los antígenos de histocompatibilidad y con el hecho de que muchos de sus determinantes antigénicos sean conformacionales<sup>73, 83, 84</sup>. Recientemente, Parham ha comprobado<sup>83</sup> que mediante anticuerpos monoclonales pueden inducirse cambios conformacionales en dichos antígenos con pérdida de determinantes aloantigénicos. Kimura y Ersson<sup>84</sup> aceptan que la activación de las células T por distintos mitógenos, activadores policlonales, es debida al reconocimiento de modificaciones en los antígenos propios H-2. Las células T no reaccionarían normalmente frente a células B, u otras células presentadoras de antígeno, pero si a través de éste se forma un complejo entre los antígenos de histocompatibilidad y los receptores de las T, B o de ambas, se inducen cambios conformacionales en aquellos que activarían a las T (Mc Devitt,<sup>85</sup>); es decir, éstas se activarían cuando los antígenos de histocompatibilidad de las células colaboradoras cambian a "no propios", o sea a determinantes antigénicos para los que no están tolerados.

**EXISTENCIA DE UN EQUILIBRIO INMUNOLOGICO U HOMEOSTASIA INMUNOLOGICA ANTIGENO-DEPENDIENTE**

Al comprobarse la existencia de quimerismos gemelares a partir de las observaciones de Owen en 1945<sup>86</sup> y su producción experimental por Billingham, Brent y Medawar en 1953<sup>87-89</sup> se despertó el interés por el estudio de la "tolerancia inmunológica" inducida por el contacto pre o perinatal con un antígeno y por el de la "parálisis inmunológica" inducida por una dosis masiva de antígeno, reestudiada por Felton a partir de 1942<sup>90</sup>. Personalmente, considerando que la diferencia entre antígenos "propios" y "no propios", en especial en el caso de los sanguíneos, no consiste sólo en que los primeros se encuentran en el orga-

nismo desde el desarrollo embrionario sino, aún más, en que pueden estimular constantemente el sistema de células inmunocompetentes, pensamos que la administración persistente de un estímulo antigénico a un animal adulto (fuera del período pre o perinatal) y a dosis inmunogénica (no masiva), durante un tiempo suficientemente prolongado, podría producir una inhibición de la respuesta al mismo. A partir de 1956 confirmamos la realidad de esta posibilidad en varios modelos experimentales<sup>91-94</sup>. Posteriormente lo estudiamos más extensamente en el modelo *Bruce-lla*-conejo (antígeno T-independiente) y valorando individualizadas la cinética de las respuestas en IgM e IgG<sup>95</sup>. Inicialmente se presenta una respuesta rápida e intensa en IgM, que descendiendo a valores bajos a los 40 días, manteniéndose a partir de entonces a niveles muy bajos. La respuesta en IgG es inicialmente muy pequeña, aumenta intensamente alrededor de los 40 días, llega a un máximo alrededor de los 6 meses, después descendiendo, llegando a valores muy bajos a los 12 meses; si en este momento administramos una dosis 10 veces superior, se observa un aumento pequeño de la respuesta en IgG, sin modificación de la IgM. Si se interrumpe la inyección de *Bruce-lla* y a los 6 meses, se inyecta nuevamente una dosis elevada, comprobamos que aparece una respuesta bastante alta, con un contenido en IgM casi igual al de IgG. Por tanto, es evidente que no se trata de una *inhibición estable y persistente*, sino que *precisa la persistencia del estímulo antigénico*, y desaparece si éste se interrumpe. Por ello formulamos la existencia de un "equilibrio inmunológico u homeostasia inmunológica antígeno-dependiente"<sup>96, 97</sup>. Para el cambio de IgM a IgG y la inhibición de la respuesta es más importante la persistencia del estímulo antigénico, que su intensidad<sup>98</sup>. Inyectando una dosis total equivalente cada 30 días no se obtiene una cinética de respuesta en curva continua, sino en forma de picos, y se necesitan 6 meses para agotar la res-

puesta en IgM y al año no se presenta aún la inhibición, sino una respuesta en picos intensos de IgG. Resultados similares se obtienen con hematies de certero en el conejo y el ratón<sup>99-102</sup>. Con la seroalbúmina humana, antígeno T-dependiente y poco inmunogénico, administrada de forma persistente en el conejo, no llega a obtenerse una individualización tan neta de las respuestas en IgM e IgG, sino que éstas se desarrollan en curvas bastante paralelas hasta llegar a la fase de inhibición, dominando la de IgG si la dosis es alta (700 mg/kg, 3 v/semana)<sup>103</sup>.

Todos estos datos los interpretamos como debidos a la existencia de un equilibrio inmunológico entre la maduración-diferenciación de la célula B y la estimulación antigénica, en el sentido de que la B madura responde al estímulo antigénico con la secreción de IgM; en un estadio anterior el antígeno induciría el cambio a IgG y, en un estadio aún más inmaduro, induciría la interrupción de la maduración; si el antígeno está siempre presente en este estadio no hay maduración de la célula B (aborto de la clona,<sup>11</sup>). Según la intensidad del estímulo antigénico y su persistencia puede establecerse un equilibrio en cualquiera de estos estadios. Por ejemplo con secreción a bajo nivel de IgM (la mayoría de anticuerpos naturales), con síntesis de ambas, predominando primero la IgM y después la IgG y, finalmente, agotamiento de la respuesta.

En el modelo hematies de certero-ratón hemos comprobado<sup>104, 105</sup> que la administración de un citostático (ciclofosfamida, hidroxiaurea) alrededor de la respuesta primaria la inhibe, pero no inhibe el *priming* para una respuesta secundaria. La respuesta secundaria se inhibe al máximo si lo administramos de los 7 a 9 días, postestímulo primario, cuando la respuesta primaria ya se ha desarrollado; creemos que esto demuestra que el *priming* para la respuesta secundaria se induce en una fase proliferativa posrespuesta primaria en presencia del antígeno. En el modelo *Brucella*-cone-

jo<sup>106</sup> hemos visto que la administración de ciclofosfamida al principio de la inmunización persistente origina, al cesar en la misma, un efecto "rebote" acentuado en IgM, mientras que si se administra al iniciarse la respuesta aislada en IgG va seguida, al cesar en la misma, de un intensísimo efecto "rebote" en IgG. Es decir, inicialmente se produce una hiperproliferación de una población que ha tenido poco contacto con el antígeno, mientras que en el segundo caso se produce la hiperproliferación de una población que ha tenido un largo contacto con el antígeno.

Era aceptado implícitamente que el cambio de IgM a IgG es inducido por el antígeno. En 1970, Sterzk et al<sup>107</sup> señalaron que para que ello ocurriese era necesario que el antígeno persistiese, por lo menos, 72 horas durante la respuesta primaria. Al conocerse e irse estudiando la posibilidad de la estimulación policlonal, se aceptó que la proliferación celular activa por estos mitógenos podía inducir dicho cambio y que éste sólo dependería de un determinado número de ciclos proliferativos. La mayoría de estos trabajos han sido realizados *in vitro*, en unas condiciones de densidad celular, presencia de determinados factores y medios muy sofisticados y la valoración del cambio se ha hecho de forma inespecífica, valorando las células secretoras de IgM e IgG *totales* y no las de una determinada especificidad<sup>108-113</sup>. Sin embargo, estudiando las respuestas específicas en IgM e IgG inducidas por estos activadores, se ha observado que la respuesta en ambas es proporcional al *background* preexistente<sup>114-117</sup>. Estudiando el efecto sinérgico del LPS sobre la respuesta a los hematies de certero en el ratón<sup>118</sup>, hemos comprobado que es inversamente proporcional a la intensidad del estímulo antigénico; con una dosis mínima, el LPS potencia la respuesta al máximo; con una dosis máxima no hay potenciación e incluso puede haber inhibición. Todos estos datos y experiencias en curso, nos inducen a pensar que los mitógenos lo que

hacen es potenciar la respuesta de una célula primada por el antígeno, pero no inducir el cambio de IgM a IgG.

Si la presencia del antígeno en una determinada fase de la maduración-diferenciación de la célula B, induce el cambio de IgM a IgG, y dado que en el animal sometido a una hiperestimulación antigénica persistente, este cambio se induce antes que el estado de inhibición de la respuesta, es lógico pensar que esta inhibición ha de inducirse en un estadio anterior de la maduración-diferenciación de la célula B. Para la comprensión de los estados a que puedan corresponder, es conveniente presentar una síntesis de las fases de maduración de las B. A partir de la *stem cell* pluripotente aparece una célula *precurso-ra*, con reordenamiento génico de cadena H, pero sin cadena citoplásmica  $\mu$ , seguida de una *pre-B* con cadena  $\mu$  en el citoplasma, después, de una *B-inmadura* con IgM de membrana monomérica y, finalmente, de una *B-madura* con IgM e IgD de membrana<sup>119-124</sup>. La población de células *pre-B* ( $\text{c}\mu^{\text{su}}$ ), está integrada por dos poblaciones, una grande y otra pequeña. Esta última procede de la primera por un ciclo mitótico, se mantiene un tiempo en reposo, y están en curso de síntesis de cadenas ligeras y de la aparición de IgM de membrana (sIgM)<sup>119, 125, 126</sup>. En el ratón el tratamiento con anti-IgM elimina esencialmente las B pequeñas  $\text{c}\mu^{\text{su}}$ . Por el contrario, las *pre-B*  $\text{c}\mu^{\text{su}}$  son más numerosas, especialmente la subpoblación grande<sup>127</sup>.

Por lo que se refiere al estadio o estadios posteriores involucrados en el cambio de IgM e IgG, se discuten las siguientes posibilidades: si su aparición corresponde a un estado ulterior de la B madura, si procede de ésta por una división asimétrica, o si corresponde a una línea de maduración diferente a partir de las B inmaduras. En la actualidad parece existir una cierta tendencia a aceptar la división asimétrica, en el sentido de que a partir de la célula B madura una célula hija sintetizaría IgM y la otra IgG<sup>128-132</sup>. Si esto fuese así,

tendría que existir una dependencia entre la respuesta primaria en IgM y la secundaria en IgG, y de nuestros trabajos sobre la acción de los citostáticos sobre el *priming* para una respuesta secundaria<sup>104, 105</sup> se deduce que éste es independiente de la respuesta primaria. Como hemos señalado, de esto, y de la importancia de la persistencia del estímulo antigénico para dicho cambio, creemos que el cambio de IgM a IgG se induce en la célula pre-B o en la B-inmadura, por la acción del antígeno, posibilidad postulada recientemente por Bazin et al.<sup>124</sup>

La tolerancia o inhibición de la respuesta por la inmunización persistente, creemos ha de inducirse en un estadio anterior. Como hemos señalado, Nossal y Pike propusieron en 1975<sup>11</sup>, la hipótesis del aborto clonal, en la que sugieren que la clona correspondiente no es eliminada, como sugirió inicialmente Burnet, sino frenada en su maduración. En un trabajo posterior comprueban<sup>131</sup> que las células *slg* son muy sensibles a la tolerancia, en especial en la fase en que van a aparecer los receptores de membrana. Esta inhibición puede inducirse con dosis muy pequeñas de antígeno. En ratones totalmente tolerantes a los que se han dado dosis mucho más grandes de tolerógeno, presentan en su bazo células pre B mIg negativas, que situadas *in vitro*, en un ambiente muy estimulador, adquieren receptores. Señalan que esta es, *por lo menos, una de las razones por las que el antígeno debe persistir para mantener la tolerancia*. El hecho de que concentraciones muy pequeñas del antígeno puedan inducir esta inhibición, les sugiere que el mecanismo de la misma puede ser otro que la simple modulación de los receptores, y que todos estos datos son más consistentes con la inducción de un *estado anérgico, potencialmente reversible, en la maduración de la célula B*, por lo que le dan el nombre de *anergia clonal*, indicando que el antígeno hace a la célula no-responderadora, sin matarla<sup>134-136</sup>, para Nossal<sup>136</sup> esta delección clonal es un mecanis-

mo importante en la tolerancia inmunológica, tanto para los linfocitos B como para los T. Considera que la acción de las T supresoras no es, quizás, el mecanismo primordial, sino que es importante pero auxiliar.

Esta hipótesis de la "anergia clonal" se integra perfectamente como una de las fases de nuestro "equilibrio inmunológico u homeostasia inmunológica antígeno-dependiente", la cual tiene un amplio sentido biológico. Frente a un primer estímulo con un antígeno se presenta una respuesta rápida, local, con poca difusión y con un tiempo de vida corto (IgM). Si el estímulo persiste, se cambia a una respuesta que difunde por todo el organismo y con un tiempo de vida largo, por lo que se acumula (IgG). Si el estímulo está siempre presente o persiste un tiempo largo, se presenta la inhibición o tolerancia, es decir, un estado de no respuesta. La respuesta a los antígenos propios está regulada por dicho equilibrio sin necesidad de postular la diferenciación entre lo propio y lo no propio.

#### Bibliografía

- Hooper B, Whittingham S, Matthews ID, McKay JK, Curnow DM. Autoimmunity in a rural community. *Clin Exp Immunol* 1972; 12:79-87.
- Hallgren HM, Buckley CE, Gilbertson VA, Yunis EJ. Lymphocyte phytohemagglutinin responsiveness, immunoglobulins and autoantibodies in ageing humans. *J Immunol* 1973; 111:1101-1107.
- Gras J. Autoanticuerpos en normales. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1975; 3:255-259.
- Gras J. Los mecanismos de homeostasia inmunológica y el equilibrio inmunológico. Barcelona, editorial JIMS 1979.
- Foz A, Batalla E. Autoantibodies against human globulin in Rheumatoid Arthritis patients. En: Soslings J, Van Swaag H. Contemporary rheumatology. Amsterdam, Elsevier, 1966; 166.
- Koffler D, Can R, Agnello V, Thornburn R, Kunkel HG. Antibodies to polynucleotides in human sera: antigenic specificity and relation to disease. *J Exp Med* 1971; 134:294-312.

- Matre R, Helgeland SV, Tonde O. Humans serum antibodies against native DNA detected by an immunoperoxidase spot technique. *J Immunol Methods* 1974; 5:345-352.
- Weir DM. Liver autoantibodies in the rat. *Immunology* 1963; 6:581-591.
- Weir DM. Immunological reactions after tissue damage. *Lancet* 1964; 1:749-751.
- Elson CJ, Weir DM. Development of anti-tissues antibodies in rats. *Clin Exp Immunol* 1964; 4:241-246.
- Richter M, Sargent AO, Myers JA, Rose B. Production of autoantibodies in rats immunized with homologous or heterologous liver. *Immunology* 1966; 10:211-215.
- Sargent AV, Myers J, Richter M. The immune response to circulating autologous hepatocellular antigens. *J Immunol* 1966; 96:268-272.
- Goter Robinson CJ, Abraham AA, Balazs T. Induction of anti-nuclear antibodies by mercuric chloride in mice. *Clin Exp Immunol* 1984; 58:300-306.
- Tung SK. Human sperm antigens an anti-sperm antibodies. I. Study on vasectomy patients. *Clin Exp Immunol* 1975; 20:93-104.
- Zabriskie JB, Hsu HC, Seegal BC. Heart-reactive antibody associated with rheumatic fever: characterization and diagnostic significance. *Clin Exp Immunol* 1970; 7:147-159.
- Cunningham AJ. Large numbers of cells in normal mice produce antibody to components of isologous erythrocytes. *Nature* 1974; 252:749-751.
- Cunningham AJ. Active suppressor mechanism maintaining tolerance to some self components. *Nature* 1975; 254:143-144.
- Cunningham AJ. Self-tolerance maintained by active suppressor mechanism. *Transplantation Rev* 1975; 3:123-43.
- Wiener HS, Singer CJ, Cohen L, Feldmann J. Type specific cold autoantibodies as a cause of acquired haemolytic anaemia and haemolytic transfusion reactions: biologic test with bovine red cells. *Ann Intern Med* 1958; 44:221-227.
- Marsh WL, Jenkins WJ. Anti I: a new cold antibody. *Nature* 1960; 88:752.
- Vicari G, Kabat EA. Immunochemical studies on blood groups. XLII. Isolation and characterization from ovarian cyst fluid of a blood group substance lacking A, B, H, Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup> specificity. *J Immunol* 1969; 102:821-828.
- Vicari G, Kabat EA. Studies and activities of oligosaccharides produced

by alkaline degradation of a blood group substance lacking A, B, H, Le<sup>b</sup> and precursor substances. *J Exp Med* 1972; 135:1.247-1.258.

23. Luch A, Gras J. Valores de crioglobulinas en sujetos normales dadores y no dadores de sangre. *Med Clin (Barc)* 1974; 62:87-90.

24. Gras J, Luch A. Increase in cold agglutinins induced by erythroperesis in the rabbit. *Eur J Immunol* 1972; 17:184-187.

25. Feizi T. Antibody heterogeneity of anti-I cold agglutinins as shown by cord cell studies. *Nature* 1969; 222:1.288-1.289.

26. Smith CB, McGuinness MH, Schmidt PJ. Changes in erythrocyte I agglutinogen and anti-I agglutinins during *Mycoplasma pneumoniae* infection in man. *J Immunol* 1967; 99:598-604.

27. Costea N, Yakulis VJ, Heller P. The mechanism of induction of cold agglutinins by *Mycoplasma pneumoniae*. *J Immunol* 1971; 106:598-603.

28. Core KD, Keast D. Autoimmune haemolytic anaemia induced in mice immunized with rat erythrocytes. *Clin Exp Immunol* 1974; 17:319-327.

29. Naysmith JD, Elson CJ, Dallman M, Fletcher E, Ortega-Pierres MG. Anti-erythrocyte autoantibody production in mice associated with the injection of rat erythrocytes. I. Regulation of the response by suppressor cells. *Immunology* 1980; 39:469-479.

30. Avrameas S, Guilbert D, Dighiero G. Natural antibodies against Tubulin, Actin, Myoglobin, Thyroglobulin, Fetuin, Albumin and Transferrin are present in normal human sera and monoclonal immunoglobulin from multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia may express similar antibody specificity. *Ann Immunol* 1981; 132C: 231-236.

31. Avrameas S, Dighiero G, Lymberti P, Guilbert B. Studies on natural antibodies and autoantibodies. *Ann Immunol* 1983; 134D:103-113.

32. Dighiero G, Lymberti P, Holmsberg D, Lund uist I, Coutinho A, Avrameas S. High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J Immunol* 1985; 134:765-771.

33. Wiener AS. Blood groups and transfusion. MC Thomas. Illinois, Springfield, 1943.

34. Watkins MB. Blood-group specific substances. En: *Glycoproteins, their composition, structure and function*. Ed. A. Gottschalk. Amsterdam, Elsevier, 1972; 830.

35. Galili V, Macher BA, Buchler S, Shohet SB. Human natural anti-a-ga-

lactosyl IgG. II. The specific recognition of (1 → 3)-linked Galactose residues. *J Exp Med* 1985; 162:573-582.

36. McClelland WM, Bradley A, Morris TCM, Burnside P, Robertson JH. Auto-anti-B in a patient with acute leukaemia. *Vox Sang* 1981; 41:231-234.

37. Opelz GM, Kiuchi M, Takasugi M, Terasaki PI. Autologous stimulation of human lymphocyte subpopulations. *J Exp Med* 1976; 142:1.327-1.333.

38. Kuntz MM, Innes JB, Weksler ME. Lymphocyte transformation induced by autologous and allogeneic non-T lymphocytes. *J Exp Med* 1976; 143:1.042-1.054.

39. Romani PL, Schlossman SF, Reinherz EL. Surface molecules involved in self-recognition and T cell activation in the autologous mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 1984; 133:1.093-1.100.

40. Lederberg J. Genes and antibodies. Do antigens bear instructions for antibody specificity or do they select cell lines that arises by mutation? *Science* 1959; 129:1.649-1.653.

41. Nossal GJV, Pike BL. Evidence for the clonal abortion theory of lymphocyte tolerance. *J Exp Med* 1975; 141:904-917.

42. Osmond DG, Nossal GJV. Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow: I. Quantitative radioautographic studies of anti-globulin binding by lymphocytes in bone marrow and lymphoid tissues. *Cell Immunol* 1974; 13:117-131.

43. Osmond DG, Nossal GJV. Differentiation of lymphocytes in the mouse bone marrow. II. Kinetics of maturation and renewal of anti-globulin binding cells studied by double labelling. *Cell Immunol* 1974; 13:132-146.

44. Weir DM, Elson CJ. Antitissue antibodies and immunological tolerance to self. *Arthritis Rheum* 1969; 12:254-260.

45. Grabar P. "Self" and "not-self" in immunology. *Lancet* 1974; 1:1.320-1.322.

46. Gras J. Naturaleza y significado bioquímico de la respuesta en anticuerpos. *Real Academia de Medicina de Barcelona*, 1961.

47. Aldo-Benson M, Borel Y. The tolerent cell: direct evidence for receptor blockade by tolerogen. *J Immunol* 1974; 112:1.773-1.803.

48. Klaus GGB, Humphrey JH. B cell tolerance induced by polymeric antigens. I. Comparison of the dose and epitope density requirements for inactivation of primed and unprimed B cells *in vivo*. *Eur J Immunol* 1975; 5:361-365.

49. Desaynard C, Howard JG. Role of epitope density in the induction of immunity and tolerance with thymus independent antigens. II. Studies with 2,4-dinitrophenyl conjugates *in vivo*. *Eur J Immunol* 1975; 5:541-545.

50. Nossal GJV, Layton JE. Antigen-induced aggregation and modulation of receptors on hapten-specific B lymphocytes. *J Exp Med* 1976; 143:511-527.

51. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonself discrimination. Paralysis and induction involves the recognition of one and two determinants on an antigen. *Science* 1970; 169:1.042-1.049.

52. Feldmann M, Greaves MF, Parker DC, Rittenberg MB. Direct triggering of B-lymphocytes by insolubilized antigen. *Eur J Immunol* 1974; 4:591-597.

53. Coutinho A, Moller G. Immune activation of B cells: evidence for "one nonspecific triggering signal" not delivered by the Ig receptors. *Scand J Immunol* 1974; 3:133-146.

54. Cohn MA, Blomberg B. The self-nonself discrimination: a one or two signal mechanism? *Scand J Immunol* 1975; 4:1-24.

55. Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (I. Pasteur)* 1974; 125C:373-389.

56. Coutinho A. The self-nonself discrimination and the nature and acquisition of the antibody repertoire. *Ann Immunol (I. Pasteur)* 1980; 131D: 235-253.

57. Coutinho A, Bandeira A, Björklund M, et al. From the mechanism lymphocyte activation to internal activity in the immune system. *Ann Immunol (I. Pasteur)* 1983; 134D:93-102.

58. Bretscher PA. Requirement of antigen in lipopolysaccharide dependent induction on B cells. *Eur J Immunol* 1978; 8:534-537.

59. Vidal J. The lipopolysaccharide polyclonal response is a function of the background response. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1985; 13:41-44.

60. Meichers F, Corbel C. Studies on B cell activation *in vitro*. *Ann Immunol (I. Pasteur)* 1983; 134D:63-73.

61. Tilló T, Gras J. Estudio *in vivo* de la acción sinérgica del LPS en la respuesta secundaria, administrado conjuntamente con el antígeno, en el modelo hemáticas de cordero en el ratón. *Immunología* 1983; 2:18-24.

62. Mäkelä O, Seppälä IJT, Vaara M. LPS greatly enhances the antibody response to hapten-polysaccharide conjugates, but not to protein conjuga-



tes. Ann Immunol (I. Pasteur) 1983; 134:25-36.

63. Hedrick SM, Nielson EA, Kaveler J, Cohen DJ, Davis MM. Sequence relationships between T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins. Nature 1984; 308:153-158.

64. Yanagi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark JP, Aleksander I, Mack TW. A human T-cell specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. Nature 1984; 308:145-149.

65. Sin G, Clark SP, Yoshikai Y, et al. The human T-cell antigen receptor is encoded by variable diversity and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. Cell 1984; 37:381-391.

66. Rabbits TH, Sims J, Smith W, Tunncliffe A. Human T-cell receptor  $\beta$ -chain genes. Ann Immunol (I. Pasteur) 1985; 136C:131-141.

67. Williams AF, Barclay AN, Clark MJ, Gagnon J. Cell surface glycoproteins and the origins of immunity. Ann Immunol (I. Pasteur) 1985; 136C:283-290.

68. Williams AF. Immunoglobulin related domains for cell surface recognition. Nature 1985; 314:579-580.

69. Pressman D. A cross-reaction between microglobulin and  $\alpha$ -light chains. J Immunol 1977; 119:2.001-2.004.

70. Paul WE, Shevach MM. Genetic regulation of lymphocyte inactivation and activation. En: Cooper AD, Dayton DH, ed. Development of host defences. Nueva York, Raven Press. 1977; 141.

71. López de Castro JA. Estructura y polimorfismo molecular de los antígenos de histocompatibilidad. Immunología 1982; 1:93-102.

72. Klein J, Figueroa F, Nagy ZA. Genetics of the major histocompatibility complex: the final act. Ann Rev Immunol 1983; 1:119-142.

73. Bevan MJ. The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T-cells directed against minor histocompatibility antigens. J Exp Med 1975; 142:1.349-1.364.

74. Zinkernagel RM, Doherty PC. H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells injected with lymphocytic choriomeningitis virus: different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded from H-2KN H-2D. J Exp Med 1975; 141:1.427-1.436.

75. Morrissey PH, Bradley D, Sharrow SD, Singer A. T cell tolerance to non-H-2-encoded stimulatory is indu-

ced intrathymically but not prethymically. J Exp Med 1983; 158:365-377.

76. Singer A, Hatchcock KS, Hodes RJ. Self recognition in allogenic thymic chimeras. Self recognition by T-helper cells from thymus engrafted nude mice is restricted to the thymic H-2 haplotype. J Exp Med 1982; 155:339-344.

77. Blanein RV, Ada GL. A dual recognition model for cytotoxic T cells based on thymic selection of precursors with low affinity for self-H-2 antigens. Scand J Immunol 1978; 7:181-186.

78. Benacerraf BA. Hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity I-region specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. J Immunol 1978; 120:1.809-1.812.

79. Tucker MJ, Bretscher PA. Cells cooperating in the induction of delayed type hypersensitivity act via the linked recognition of antigenic determinants. J Exp Med 1982; 155:1.037-1.049.

80. Harris DT, McDonald HR, Cerottini JCh. Antigen recognition by H-2-restricted cytolytic T-lymphocytes is not mediated by two independent receptors. J Exp Med 1984; 159:330-335.

81. Waal LP, Nathenson SG, Melief CJG. Direct demonstration that cytotoxic lymphocytes recognize conformational determinants and not primary amino acid sequences. J Exp Med 1983; 158:1.720-1.726.

82. Hünig TR, Bevan MJ. Antigen recognition by cloned cytotoxic T-lymphocytes follows rules predicted by the altered-self hypothesis. J Exp Med 1982; 155:111-125.

83. Parham P. Changes in conformation with loss of alloantigen determinants of a histocompatibility antigen (HLA-B7) induced by monoclonal antibodies. J Immunol 1984; 132:2.975-2.983.

84. Kimura A, Ersson B. Activation of T lymphocytes by lectins and carbohydrate-oxidizing reagents viewed as an immunological recognition of cell surface modifications seem in the context of "self" major histocompatibility complex antigens. Eur J Immunol 1981; 11:475-483.

85. McDevitt HD. Speculations on how Ia antigens (Ir genes) influence the specificity of the immune response. Ann Immunol (I. Pasteur) 1984; 135D:227-236.

86. Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomosis between bovine twins. Science 1945; 102:400-402.

87. Stormont C, Weir WC, Lane LL. Erythrocyte mosaicism in a pair of sheep twins. Science 1953; 118:695-696.

88. Dunsford J, Bowley CC, Hutchinson AM, Thompson JJ, Sanger R, Race RR. A human blood group chimera. Br Med J 1957; 1:1.456-1.458.

89. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature 1953; 172:603-605.

90. Felton LD, Ottinger EJ. *Pneumococcus polysaccharide* as a paralyzing agent in the mechanism of immunity in white mice. J Bacteriol 1942; 43:94-95.

91. Gras J. Inhibición de anticuerpos circulantes en los sistemas proteína-antiproteína por hiperinmunización. Rev Esp Fisiol 1956; 12:251-258.

92. Gras J. Le phénomène de l'inhibition d'anticorps circulants par hyperimmunisation. Rev Immunol 1960; 24:354-366.

93. Gras J, Woessner S. Studies on the inhibition by hyperimmunisation of circulating antibodies. Effect of suppression or variation of antigenic stimulus at the time of maximal production of circulating antibodies in the hyperimmunized (hyperstimulated) animal. Pathol Microbiol 1963; 26:439-454.

94. Gras J, Dalmau M. Estudio sobre el fenómeno de la inhibición de anticuerpos por hiperinmunización (producción del fenómeno con hemáticas humanas en el conejo, administrado a dosis mínimas como estímulo antigénico). Rev Clin Esp 1968; 96:90-93.

95. Gras J, Roca M, Ayats R, Castro R, Durán F. Inhibition of antibody formation during continual stimulation with a strong immunogen. Immunology 1974; 26:759-767.

96. Gras J. L'équilibre immunologique entre l'estimulation antigénique persistante a niveaux constante et la réponse en anticorps. Rev Fr Clin Biol 1968; 14:520-529.

97. Gras J. Homeostase et tolerance immunitaire. Ann Inst Pasteur 1970; 118:422-447.

98. Gras J, Bolós C, García P. Conditions of antigenic stimulation necessary for the termination of the IgM response and the appearance of a single and persistent IgG response. The change form IgM to IgG is a biological expansion of the response. Allergol Immunopathol (Madr) 1981; 9:343-350.

99. Gras J, Dalmau M. Antibody inhibition by a minimal dose of antigen and response to a sudden increase of the dose. Nature 1966; 210:430-431.

100. Barbary JR, Gras J. Kinetics of IgM and IgG responses in repeated immunization of rabbits with sheep erythrocytes. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1978; 6:497-506.
101. Castro MR, Gras J. Cinética de la respuesta no específica en ratones estimulados con una dosis única o con dosis persistentemente repetidas de hemáticas de certero. *Immunología* 1982; 1:111-147.
102. Castro MR, Gras J. Importancia del ritmo de administración de la dosis antigénica en la cinética de las respuestas en IgM e IgG. *Immunología* 1984; 3:157-160.
103. Gras J, Roca M. Inhibition of IgM and IgG formation during continual stimulation with a weak immunogen. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1974; 2:309-404.
104. Gras J, Tilló T. Temporal relationship between primary injection and cyclophosphamide administration necessary for the inhibition of the priming for a secondary response. *Ann Immunol (I. Pasteur)* 1983; 134D:181-189.
105. Tilló T, Gras J. Relación temporal entre la dosis primaria y la administración de hidroxiaurea necesaria para la inhibición del priming para la respuesta secundaria. *Immunología* 1983; 4:170-175.
106. Gras J, Bolós C. Effect of cyclophosphamide on the specific IgM and IgG response and on its recovery, during the various stages of persistent immunization in the *Brucella*-rabbit model. *Ann Immunol (I. Pasteur)* 1983; 134D:181-189.
107. Sterzl J, Sima P, Medlin H, Tiaskalova L, Mandel L, Nordin AA. Induction of the primary response, preparation of the secondary response and tolerance. En: Sterzl J, Riha J, ed. Developmental aspects of antibody generation and structure, vol. 2. Nueva York, Academic Press, 1970.
108. Kearney JF, Lawton AR. B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J Immunol* 1975; 115:671-676.
109. Zauderer M, Askonas BA. Several proliferative phases precede maturation of IgG-secreting cells in mitogen-stimulated cultures. *Nature* 1976; 260:611-613.
110. Andersson J, Coutinho A, Melchers F. The switch from IgM to IgG secretion in single mitogen-stimulated B-cell clones. *J Exp Med* 1978; 147:1:744-1754.
111. Andersson J, Coutinho A, Melchers F. Stimulation of murine B lymphocytes to IgG synthesis and secretion by the mitogens lipopolysaccharide and lipoprotein and its inhibition by anti-immunoglobulin antibodies. *Eur J Immunol* 1978; 8:336-343.
112. Severinsson-Gronowicz F, Doss C, Assisi F, Vitetta E, Coffman RL, Strober S. Surface Ig isotypes on cells responding to lipopolysaccharide by IgM and IgG secretion. *J Immunol* 1979; 123:2:049-2.056.
113. Severinsson-Gronowicz E, Bergstedt-Lindqvist S, Van der Loo W, Fernández C. Characterization of the IgG response induced by Polyclonal B cell activation. *Immunol Rev* 1982; 67:73-85.
114. Bretscher PA. Requirement for antigen in lipopolysaccharide dependent induction of B cells. *Eur J Immunol* 1978; 8:534-537.
115. McKearn JP, Paslay JW, Slack J, Baum C, Davie JM. B cell subsets and differential responses to mitogens. *Immunol Rev* 1982; 64:5-23.
116. Melchers F, Corbel C. Studies on B cell activation *in vitro*. *Ann Immunol (I. Pasteur)* 1983; 134D: 63-73.
117. Vidal J. The lipopolysaccharide response is a function of the background response. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1985; 13:41-44.
118. Tilló T, Gras J. Estudio *in vivo* de la acción sinérgica del LPS en la respuesta secundaria, administrado conjuntamente con el antígeno, en el modelo hemáticas de cordero en el ratón. *Immunología* 1983; 2:18-24.
119. Owen JTT, Wright DE, Habu S, Raff MC, Cooper MD. Studies on the generation of B lymphocytes in fetal liver and bone marrow. *J Immunol* 1977; 118:2:067-2.072.
120. Abney ER, Cooper MD, Kearney JF, Lawton AR, Parkhous RME. Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity. *J Immunol* 1978; 120:2:041-2.049.
121. Campana D, Janossy G, Bofill M, et al. Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue. *J Immunol* 1985; 134:1:524-1.529.
122. McKearn JP, Rosenberg N. Mapping cell surface antigens on mouse pre-B cell lines. *Eur J Immunol* 1985; 15:295-298.
123. Tedder TF, Clement LT, Cooper M. Human lymphocyte differentiation antigens HB-10 and HB-11. I. Ontogeny of antigen expression. *J Immunol* 1985; 134:2:983-2.989.
124. Bazin H, Platteau B, MacLernan ICM, Johnson GD. B cell production and differentiation in adult rats. *Immunology* 1985; 54:79-88.
125. Lala PK, Johnson GR, Battye FL, Nossal GJV. Maturation of B lymphocytes. I. Concurrent appearance of increasing of Ig, Ia and mitogen responsiveness. *J Immunol* 1979; 122:334-341.
126. Landreth KS, Kincade PW, Lee G, Meddlock ES. Phenotypic and functional characterization of murine B lymphocyte precursors isolated from fetal and adult tissues. *J Immunol* 1983; 131:572-580.
127. Opstelten D, Osmond DG. Regulation of pre-B cell proliferation in bone marrow: immunofluorescence stathokinetic studies of cytoplasmic  $\eta$  chain-bearing cells anti-IgM-treated mice, hematologically deficient mutant mice and mice given sheep red blood cells. *Eur J Immunol* 1985; 15:599-605.
128. Cunningham AJ, Sercarz EE. The asynchronous development of immunological memory in helper (T) and precursor (B) cell clones. *Eur J Immunol* 1971; 1:413-421.
129. McMichael AJ, Williamson AR. Clonal memory. I. Time proliferation course of B-memory cells. *J Exp Med* 1974; 139:1:361-1.367.
130. Van der Loo, Severinsson-Gronowicz E, Stuber S, Herzenberg LA. Cell differentiation in the presence of cytochalasin B: studies on the "switch" to IgG-secretion after polyclonal B cell activation. *J Immunol* 1979; 122:1:203-1.208.
131. Severinsson-Gronowicz E, Doss C, Schröder J. Activation to IgG secretion by lipopolysaccharide requires several proliferative cycles. *J Immunol* 1979; 123:2:057-2.061.
132. Severinsson-Gronowicz E, Bergstedt-Lindqvist S, Van der Loo W, Fernández C. Characterization of the IgG response induced by polyclonal B cell activators. *Immunol Rev* 1982; 67: 73-85.
133. Pike BL, Nossal GJV. Mechanisms of clonal abortion/tolerance. III. Antigen abrogates functional maturation of surface immunoglobulin-negative adult bone marrow lymphocytes. *Eur J Immunol* 1979; 9:708-714.
134. Nossal GJV, Pike BL. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:1:602-1.606.
135. Nossal GJV. Cellular mechanisms of immunological tolerance. *Ann Rev Immunol* 1983; 1:33-62.