

TRABAJOS ORIGINALES

Rev. Chil. Pediatr. 56(5): 303-315, 1985

Glomerulitis Inducida en Ratones Mediante Inmunocomplejos (IC). Efecto del Líquido Amniótico (LA) Sobre la Depuración de IC y la Histopatología Renal

Dr. Jorge Cerda, M.D.¹; Dr. Rodrigo Urizar E., M.D.²; Dr. John Kaplan, Ph. D.²;
Dr. Gerald K. Mizejewski, Ph. D.²; Dr. Robert J. Simon, B.S.².

Glomerulitis Induced by Experimental Injection of Immune Complexes (I.C.) in Rats. The Effects of Amniotic Fluid on IC Clearance.

A normal clearance of immune complexes (IC), measured as phagocytic index, was observed in C57L/J mice 10 min after one dose of ¹²⁵I-IC. Similarly, tissue uptake of radioactivity (percent of dose) was within normal limits when evaluated 15 and 120 min after injection. Daily dose of IC (for 5 days) or pretreatment of mice with amniotic fluid containing alpha-fetoprotein (MAF/AFP) reduced significantly ($p < 0.01$) both phagocytic index and percent of dose at 15 min when only one dose of IC was given. Conversely, at 120 min the percent of dose in liver and kidney was increased ($p < 0.01$). In untreated mice the percent of dose was low at 120 min. Pretreatment with AFP-poor MAF had no effect upon clearance or percent of dose. Multiple injections⁵ of IC induced mesangial hyperplasia and infiltration with polymorphonuclear and mononuclear leukocytes. Distinct granular-nodular fluorescent deposits developed in mesangium and peripheral capillary loops which correlated well with the electron dense material localized in mesangium. Pretreatment with MAF/AFP decreased significantly or prevented these lesions. Pretreatment with AFP - poor - MAF did not modify the immunohistopathology. These previously unreported effects of MAF/AFP may represent inhibition of the reticuloendothelium. It is postulated that the increased radioactivity detected at 120 min may reflect reduced degradation of IC as opposed to increased uptake.

(Key words: Alpha-fetoprotein. Amniotic fluid. Induced Glomerulitis. Immune Complexes. Immunohistopathology. Immune complex's Clearance. Reticuloendothelial system inhibition by amniotic fluid).

En la mayoría de las glomerulonefritis (GN), el mecanismo desencadenante envuelve la producción de Inmuno-complejos (IC)¹⁻⁷. Ya sea que los IC se formen en la circulación o "in situ" se desarrolla evidencia clínica e histopatológica de GN si la dosis del antígeno, la formación de anticuerpos por el huésped y los procesos que facilitan la localización de antígenos o de IC son adecuados^{1 - 7 - 9 - 11 - 13 - 14}.

La administración de IC preformados es capaz de desencadenar GN, aunque sus resultados no son tan reproducibles como los obtenidos con inmunización activa en el animal experimental^{1 - 7 - 12}. La activación del sistema reticuloendotelial (SRE), que fagocita y depura los IC, puede,

en forma efectiva, evitar que éstos se depositen en los tejidos¹⁵⁻¹⁸. Sin embargo no se ha establecido claramente si la inhibición del SRE facilita o disminuye el depósito de IC en el riñón^{1 - 19 - 20}. Aún más, la interpretación de la histopatología renal en roedores se complica debido a que estos animales desarrollan espontáneamente lesiones glomerulares con inmunofluorescencia que sugiere un fenómeno mediado por la localización capilar de IC^{1 - 4 - 21 - 28}.

Los objetivos del presente estudio evalúan, primero: la función del SRE, la inmunohistopatología y ultraestructura renal de ratones C57L/J inyectados con IC preformados. Segundo, el efecto del LA (Líquido Amniótico) que contiene alfafetoproteína (AFP, LA/AFP), una substancia posiblemente inmunosupresora²⁹ sobre la función depuradora de IC del SRE. Por último, se realizaron estudios morfométricos y longitudinales, a través de varias edades, en ratones C57L/J con el objeto de comparar las alteraciones glomerulares espontáneas con aquellas inducidas por los IC.

1. Departamento de Fisiología y Medicina Interna, Universidad de la República, Montevideo Uruguay.
2. New York State Department of Health, Wadsworth Center for Laboratories and Research, Albany, N.Y. 12201, and Departments of Pediatrics and Physiology, Albany Medical College, Albany, N.Y. 12208, U.S.A.

MATERIAL Y METODO

Se prepararon y purificaron anticuerpos radioactivos anti-seroalbúmina bovina (SAB) desde suero de conejo anti-SAB preparado comercialmente, mediante cromatografía de columna³⁰⁻³¹, obteniéndose una concentración final de 5.5 mg. de proteína/ml. Mediante inmunodifusión en agar, se determinó la pureza del anticuerpo de conejo contra SAB, utilizando varios anticuerpos anti-Ig de conejo y una solución de SAB (40 mg/ml). En todos los casos se obtuvo una banda única de precipitación.

Se yoduró el anticuerpo anti-SAB usando una modificación del procedimiento de la lactoperoxidasa-glucosidasa³²⁻³³ (New England Nuclear, Boston, MA, USA); con este objeto, 200 μ l de anticuerpo (de conejo) anti-SAB se mezclaron con 2 mCi de I^{125} (20 μ l, pH 8-10) y 50 μ l de una solución al 1% (peso/vol) de glucosa BD. El producto final demostró 0.4 mg de proteína por ml. Esta solución fue dializada en BPS (pH 7.4) y en la solución obtenida se observó una radioactividad de 0.5 mCi/ml con una actividad específica de 1.25 mCi/mg de proteína.

La preparación y yoduración de los IC se realizó precipitando un liofilizado de anticuerpo de conejo anti-SAB (2.2 mg. anticuerpo/ml) en equivalencia con antígeno SAB. Los IC así formados se disolvieron agregando un exceso de antígeno correspondiente a 2 veces la cantidad utilizada para producir la precipitación. El pH se redujo a 3.0¹² y los IC disueltos en exceso de antígeno se inyectaron dentro de un período de 24 hrs. A estos IC se les agregó 40 μ l del anti-SAB marcado con I^{125} (0.016 mg proteína y 20 mCi/ratón); la mezcla, se agitó vigorosamente inmediatamente antes de su inyección.

Para la obtención del LA y preparación de un estándar de alfafetoproteína (AFP), se puncionó el saco amniótico de ratones NYS/Nular con embarazo de 15 a 18 días, y el LA obtenido se procesó como describieran Mizejewski y colaboradores³⁴.

La concentración de AFP medida con inmunodifusión radial³⁵, fue de 1.0 mg/ml mientras que la concentración de proteína total usando el procedimiento de Lowry³⁶, fue de 2,75 mg/ml. La preparación del estándar de AFP se llevó a cabo usando anticuerpo anti-AFP a través de los procedimientos publicados por Mizejewski y colaboradores³⁷⁻³⁸. La concentración de AFP del estándar (inmunodifusión y electroforesis) fue de 100 μ g/ml. La pureza de la AFP usada para la preparación del anticuerpo fue documentada por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida³⁹, mientras que la monoespecificidad del

estándar de AFP se controló verificando su reactividad con el antígeno purificado y con anticuerpo monoespecífico de conejo anti transferrina, IgG y albúmina de ratón. Se obtuvo LA con cantidades mínimas de AFP pasándolo a través de una columna cromatográfica que contenía estradiol (E_2 , separación de la AFP por cromatografía de afinidad)⁴⁰.

Estudio experimental A. Evaluación del efecto del LA sobre la depuración (clearance) y distribución tisular de IC. Con este objeto se utilizaron ratones machos de 2 meses de edad (25 a 30 gr), alimentados con dieta estándar de animal de laboratorio y libre acceso a agua.

La depuración de IC- I^{125} se estudió en 79 ratones separados en 5 grupos: Treinta y tres ratones se inyectaron por vía endovenosa con 0,1 ml, de una solución de IC (2 x exceso de antígeno) conteniendo 20 μ Ci de I^{125} ; 17 de ellos recibieron sólo esta inyección; los 16 restantes recibieron IC no marcados —una inyección diaria— por 4 días, mientras que la quinta inyección fue de IC- I^{125} en las dosis mencionadas antes (Grupos IC₁ sin LA y Grupos IC₅ sin LA). Otros 31 ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 10 μ l de LA 3 veces por semana durante 4 semanas (12 inyecciones de LA); aproximadamente una hora después de la última inyección, 15 ratones recibieron una dosis de IC- I^{125} (Grupo IC₁ + LA) en tanto que los 16 restantes fueron inyectados diariamente con una dosis de IC no marcados por 4 días y al quinto día se le inyectó con IC- I^{125} (Grupo IC₅ + LA). Finalmente, el último grupo de 15 ratones fue tratado durante cuatro semanas con LA sin AFP y se les dio al final de este período una inyección de IC- I^{125} (Grupo IC₁ + E_2 /LA). 2, 4, 6, 8 y 10 min. después de la dosis de IC- I^{125} se extrajeron 10 μ l de sangre. La mitad de los animales de cada grupo fue sacrificada a los 15 minutos y la otra mitad a los 120 minutos. El hígado, el bazo, los pulmones y los riñones fueron extraídos, secados y pesados; una muestra de sangre fue obtenida y también fue pesada. La radioactividad de la sangre, el estándar y los tejidos se midió en un contador analítico. La evaluación de la depuración de los IC- I^{125} se realizó en las muestras obtenidas en los primeros 10 minutos mientras que el conteo de los tejidos se hizo a los 15 y 120 minutos. La dosis de radioactividad se calculó a partir de los estándar. La pendiente e intersección y el coeficiente de correlación de la curva de depuración se calculó mediante análisis regresivo del logaritmo de la radioactividad sanguínea versus tiempo, la constante k ($k = \text{min}^{-1}$) o índice fagocítico y la intersección extrapolada al tiempo 0 ($t = 0$) como 10^{-5} unidades de radioactividad por minuto por ml de sangre. La radioactividad

de los tejidos se calculó pesando 2 muestras del órgano en particular obteniéndose la radioactividad por gramo tejido. Este resultado fue multiplicado por el peso del órgano para indicar la radioactividad total del órgano. Con este valor se calculó, el porcentaje de la dosis inyectada, proporción que se usó para expresar los resultados a los 15 y a los 120 min.

Detección de IC no marcados: 42 ratones C57L/J (machos) de 2 meses de edad se trataron con IC no yodurados, con LA y con LA sin AFP como se detalló antes. Los grupos IC₁ sin LA, con LA y con LA sin AFP contenían 7 animales cada uno, mientras que los grupos IC₃ sin LA y con LA tenían 11 a 9 ratones respectivamente. Los animales fueron sacrificados 2 hrs. después de la última inyección de IC obteniéndose muestras de riñón para su estudio por microscopía de luz (ML), microscopía de fluorescencia (MIF) y microscopía electrónica (ME).

La detección de IC circulantes se realizó mediante el uso de las pruebas de precipitación con polietilenglicol (PEG) y de agregación plaquetaria (AP).

Para la precipitación con PEG (peso molecular 6000) este se usó en una concentración final de 2.5%⁴¹. Las inmunoglobulinas G y M y C₃ del ratón fueron evaluadas en duplicado en el precipitado inducido por el PEG, usando anticuerpos mono-específicos preparados en conejos. Los resultados se consideraron positivos (indicando presumiblemente la presencia de IC circulantes) cuando se detectó una línea única de precipitación por lo menos en 2 de las tres proteínas investigadas. Como control positivo se utilizaron una solución de IC preparados en exceso de antígeno y una solución de IgG humana agregada mediante calor. Los controles negativos fueron muestras de suero humano y murino normales.

Agregación Plaquetaria⁴²: Se prepararon suspensiones de plaquetas humanas utilizando muestras de 25 ml de sangre (anticoagulada con ACD) extraída de dadores normales. La concentración plaquetaria final fue de 2×10^5 y la suspensión se empleó dentro de 6 hrs. de su preparación. Las muestras séricas a evaluar (100 μ l) fueron diluidas 1:4 y sucesivamente hasta 1:1.024 e incubadas en placas de microtitulación. Se mantuvieron por 12 hrs. a 40°C antes de ser leídas. La presencia de una capa uniforme de plaquetas sedimentadas en dilución de 1:16 o mayor se consideró positiva, mientras que los "Rouleau" o un botón claramente definido correspondió a un resultado negativo. Como control positivo se usó IgG humana agregada (que produce precipitación en diluciones hasta 1:1.024); como control negativo una solución de plaquetas en tampón fosfato/glucosa.

En el momento de sacrificar a los animales se realizó un examen urinario de rutina (Dipstix) y microscópico en muestras obtenidas directamente de la vejiga.

Para los estudios morfológicos con Microscopía de luz (ML) (n = 41), las muestras de tejido renal se procesaron y estudiaron semicuantitativamente como se publicara antes⁴³. La Glomeruloesclerosis y las lesiones de la pared capilar, de la membrana basal capilar y del mesangio se clasificaron como ausentes (0); mínimas (1+); moderadas (2+) y severas (3+). Las lesiones tisulares que comprometían algunos o 75% o más de los glomérulos se definieron como focales o difusas respectivamente, mientras que aquellas que envolvían algunas áreas o 75% o más del ovillo glomerular se les consideró segmentarias o globales respectivamente. El número de PMN en los glomérulos se evaluó en forma semicuantitativa. La microscopía electrónica (ME) (n = 20) se realizó de acuerdo con procedimientos rutinarios previamente publicados⁴³⁻⁴⁴ en 3 a 4 glomérulos de 5 a 6 ratones de cada grupo. Microscopía de inmunofluorescencia (MIF) (n = 39): Usando el procedimiento directo, se detectó IgG, IgM e IgA de ratón; para demostrar C₃, se empleó la técnica indirecta (anticuerpo mono-específico preparado en conejo y anticuerpo anti-Ig de conejo preparado en cabra); la especificidad del antisuero se determinó mediante inmunodifusión doble, inmunoelectroforesis y pruebas de inhibición. La intensidad y distribución de la fluorescencia se evaluaron como se detalló antes.

Los resultados de este estudio y los del estudio B, fueron sometidos a análisis estadístico. Los resultados individuales y por grupos etarios se compararon mediante análisis de X²⁴⁵. Los promedios y las desviaciones estándar del espesor de la membrana basal fueron calculados para animales individuales y para los distintos grupos usando pruebas t⁴⁶.

Estudio experimental B: La evaluación de la glomerulopatía espontánea de la cepa C57L/J se realizó de manera funcional y morfométrica en 67 ratones (machos) que se distribuyeron en la siguiente forma: Grupo 1, de 1 a 4 meses de edad (n = 7); Grupo 2, 6 a 9 meses (n = 26); Grupo 3, 12 a 15 (n = 11); y Grupo 4, 18 a 24 meses de edad (n = 13). Los ratones anestesiados fueron sometidos a extracción sanguínea total: ambos riñones fueron extirpados y las muestras procesadas como se señaló antes para ML, MIF, y ME. El grosor de la membrana basal se midió de acuerdo con procedimientos publicados anteriormente, en 5 a 10 capilares glomerulares de 4 a 8 ratones de cada grupo⁴⁴. La creatinina sérica se evaluó en un total de 40 muestras de los 4 grupos usando autoanalizador.

RESULTADOS

Estudio Experimental A: Depuración de IC- 125 (Tabla 1): los animales que recibieron una inyección de IC- 125 (IC₁ sin LA) mostraron una depuración de 0.0121 min⁻¹ correspondiente a un tiempo medio de aproximadamente 25 min. Los ratones inyectados con LA (IC₁ + LA) presentaron una depuración significativamente reducida. La depuración se mantuvo normal cuando el líquido amniótico (LA) usado para tratamiento previo a la inyección de IC- 125 contenía cantidades mínimas de AFP (IC₁ + E₂/LA). Los ratones inyectados con 5 dosis de IC sin LA (IC₅ sin LA) o con AFP (IC₅ x LA) presentaron una reducción semejante de la depuración de IC- 125 de la sangre.

La radioactividad de los órganos (Tabla 1) estaba considerablemente disminuida a los 15 min. en el grupo tratado con LA (IC₁ + LA) pero no fue modificada por el tratamiento con LA sin AFP (IC₁ + E₂/LA). En contraste con estos resultados, a los 120 min, el grupo que recibió LA, demostró un aumento considerable en el porcentaje de radioactividad. En los grupos de control (IC₁ sin LA y IC₁ + E₂/LA) con radioactividad renal alta (y depuración normal) a los 15 min, se observó una notable disminución a los 120 min, mientras que aquellos con reducción de la depuración (IC₁ + sin LA y IC₅ + LA) y radioactividad baja en los riñones hubo por una elevación significativa de ésta a los 120 min. El coeficiente de correlación entre la depuración de IC- 125 y la localización de IC en el riñón, fue de alta significación estadística (r = 0.92, p < 0.01). Esta

correlación fue negativa (r = 0.86, p < 0.01) cuando la depuración se comparó con la localización a los 120 min.

La creatinina sérica se mantuvo normal en todos los grupos, pero la excreción de eritrocitos aumentó considerablemente en ratones, inyectados con 5 dosis de IC. Las pruebas de precipitación de PEG y de AP en grupos IC₁ sin LA, IC₅ sin LA y IC₅ + LA revelaron IC circulantes o sustancias semejantes a ellos en cantidades significativas, sin embargo los títulos de AP fueron estadísticamente mayores en ratones del grupo IC₅ sin LA que en aquellos que recibieron LA (p < 0.01, resultados no incluidos).

En la Microscopía de luz (41 ratones, 2 meses de edad, Tabla 2, Figura 1): Una inyección de IC no marcados (Grupo IC₁ sin LA), produjo expansión de la matriz mesangica, proliferación segmentaria del mesangio con 1 ó 2 PMN (y MN ocasionales) visibles en el glomérulo, sin edema o aumento del tamaño glomerular. Cinco inyecciones de IC (Grupo IC₅ sin LA) indujeron una mesangiopatía caracterizada por aumento de la matriz e hiper celularidad. Los PMN aumentaron considerablemente de 5 a 8 y ocasionalmente hasta 12 leucocitos por glomérulo; los MN aumentaron pero en menor escala que los anteriores; los glomérulos se veían edematizados y aumentados de tamaño. Los ratones tratados previamente con LA antes de la dosis de IC (IC₁ + LA y IC₅ + LA) mostraron lesiones mínimas o ausencia de ellas.

En la microscopía electrónica (20 ratones, 2 meses de edad, Tabla 2, Figura 1) se confirmaron los hallazgos histológicos, encontrándose ausen-

Tabla 1.

Efecto de la alfafetoproteína sobre la depuración vascular (Índice Fagocítico) y la localización en Hígado y Riñón de los inmuno complejos inyectados (recuento por Min/Mg y porcentaje de la dosis ± error estándar (Estudio A)

GRUPO	Índice Fagocítico K (mín) - 1 (+ES)	n	RIÑONES						HIGADO					
			15 min.			120 min.			15 min.			120 min.		
			cpm/mg (+ES)	% dosis (+ES)	n	cpm/mg (+ES)	% dosis (+ES)	n	cpm/mg (+ES)	% dosis (+ES)	n	cpm/mg (+ES)	% dosis (+ES)	n
IC ₁ (sin LA)	0.0121 (0.0027)	8	2.6 (0.3)	3.3 (0.1)	9	273 (14)	2.6 (0.5)	8	4.51 (0.13)	22.3 (0.8)	9	248 (9)	8.3 (0.8)	
IC ₁ + LA FR	0.0071 (0.0012)	8	2.0 (0.2)	2.7 (0.3)	7	281 (35)	3.7 (1.4)	8	3.78 (0.16)	21.4 (0.7)	7	230 (28)	9.8 (3.1)	
IC ₁ + E ₂ /LA	0.0167 (0.0020)	8	2.2 (0.1)	3.5 (0.1)	7	165 (14)	2.4 (0.2)	8	3.21 (0.13)	18.9 (0.2)	7	135 (9)	7.1 (0.3)	
IC ₅ (sin LA)	0.0082 (0.0014)	8	1.3 (0.08)	2.5 (0.16)	8	231 (32)	3.9 (1.05)	8	3.39 (0.24)	34.7 (2.09)	8	298 (43)	14.7 (5.80)	
IC ₅ + LA	0.0060 (0.0009)	8	1.3 (0.2)	2.5 (0.3)	8	326 (18)	3.7 (0.7)	8	3.34 (0.30)	21.0 (2.1)	0	367 (75)	14.5 (2.5)	

Grupos IC₁ (sin LA) vs. IC₁ + LA, IC₁ (sin LA) vs. IC₅, IC₁ + LA vs. IC₁ + E₂/LA, p < 0.01

Grupos IC₁ (sin LA) vs. IC₁ + E₂ / LA y IC₅ (sin LA) vs. IC₅ + LA, p > 0.05

cia de lesiones o lesiones mínimas en el Grupo IC₁ con LA. Los ratones que recibieron 5 inyecciones de IC (IC₅ sin LA) presentaron depósitos densos focales y segmentarios en el mesangio y el subendotelio, con la expansión de la matriz y la proliferación celular antes descrita. PMN y MN fueron fácilmente identificados, observándose ocasionalmente trombos con fibrina y plaquetas en los lúmenes capilares. Los ratones tratados previamente con LA (IC₅ + LA) no desarrollaron lesiones significativas.

En el examen con microscopía de inmunofluorescencia (39 ratones, 2 meses de edad, Tabla 2, Figura 1) todos los grupos presentaron depósitos mesangiales espontáneos de IgG e IgM de intensidad mínima (1+/2+). La fluorescencia indirecta demostró depósitos de IgG de conejo anti SAB en mesangio y capilares periféricos en los grupos IC₁ sin LA y IC₁ + E₂/LA, mientras que los depósitos en esas localizaciones eran intensamente positivos en el grupo IC₅ sin LA. El tratamiento con LA redujo considerablemente la intensidad y extensión de la fluorescencia (Grupos IC₁ LA y IC₅ + LA). El Antígeno o SAB (seroalbúmina bovina) no se detectó en ninguno de los grupos.

Estudio Experimental B: La creatinina sérica se mantuvo normal (0.5 a 0.6 mg/ml) en todos los grupos. El examen de orina de ratones jóvenes (2 meses) demostró proteinuria mínima (trazas a 1+) mientras que en ratones de 12 a 24 meses de edad se detectó consistentemente en concentra-

ciones de 2+ o más. La prueba de precipitación con PEG fue positiva en 4 de 10 y 16 de 19 ratones en los grupos 1 y 3 respectivamente; el contenido de IgG, IgM, y C₃ fue mayor (p < 0.01) en el grupo 3 (resultados no incluidos). La prueba de AP fue positiva en todos los ratones, sin diferencias significativas en ninguno de los grupos mayores comparados con animales jóvenes (Grupo 1).

En la microscopía de luz (67 ratones, Tabla 3, Figura 2) el Grupo 1 (1-4 meses) no presentó lesiones o mostró sólo cambios mínimos (hiperplasia focal segmentaria cerca de 6 en el hilio glomerular. En el grupo 2 (6-9 meses) se comprobó hiperplasia mesangica y algunas protuberancias argirofílicas en las membranas basales. En el grupo 3 (12-15 meses) se observó proliferación segmentaria del endotelio y epitelio, hiperplasia mesangica, hialinización y aumento del grosor de la pared capilar (severidad 2+). La membrana basal glomerular (mbg) aparecía estructuralmente normal. Algunos focos de infiltración mononuclear intersticial o periglomerular se observaron con cierta frecuencia. El Grupo 4 (18-24 meses) demostró aumento de estas lesiones (3+) con expansión periférica del mesangio formando contornos capilares dobles. La hialinización fue mayor pero siguió siendo focal y segmentaria. Algunas paredes capilares aparecían engrosadas y arrugadas mientras que las protuberancias de la mbg aumentaron considerablemente en número y tamaño.

Tabla 2.
Resultados histopatológicos en ratones C57L/J inyectados con inmunocomplejos SAB-ANTI SAB, con y sin tratamiento con AFP (Estudio A)

Grupo	MICROSCOPIA DE LUZ				ULTRAESTRUCTURA				*INMUNOFLORESCENCIA		
	n	Pared Capilar	Mesangio	PMN/ GLOM	n	Mesangio	Depositos	PMN	n	IgG de Conejo (antisuero de cabra)	BSA (antisuero de conejo)
IC ₁ (o LA**)	7	0	1+ expansión focal y segmentaria de la matriz	2	4	Expansión segmentaria y focal leve endotelial	Ocasionalmente en mesangio y	Ocasional	7	2- focal y segmentario en mesangio y periferia	Negativo
IC ₁ - La	7	0 (distendida)	0 a 1+ Expansión segmentaria ocasional	0 a 1	4	Expansión segmentaria y focal, disminución de	Ocasionalmente en mesangio y subendotelial	Ocasional	8	1 a 2 mesangial difuso	Negativo
IC ₁ + E ₂ /LA	7	0	1+ Expansión segmentaria focal	0 a 1	4	Leve, focal	Ocasional mesangial	Ocasional	8	Negativo a 1+ mesangial segmentario	Negativo
IC ₅ (o LA)	11	1+ a 2+ distendida y lumen disminuido	2+ expandido más difuso, proliferación segmentaria	5, Ocasional hasta 12	4	Expandido celularidad mononuclear	Frecuente mesangial y subendotelial	Frecuente algunos eosinófilos	8	3+ difuso mesangial segmentario a global	Negativo
IC ₅ + LA	9	0 a 1+ distendida y engrosada	0 (disminuida densidad de la matriz, celularidad normal)	0 a 1	4	Normal o expansiones segmentarias infrecuentes matriz setulosa	Subendotelial mesangial	Ocasional	8	Negativo a 1- mesangial focal segmentario	Negativo

* IgG e IgM fueron detectadas con intensidades entre ++ a +++ en la mayoría de las muestras evaluadas.
** LA + líquido amniótico.

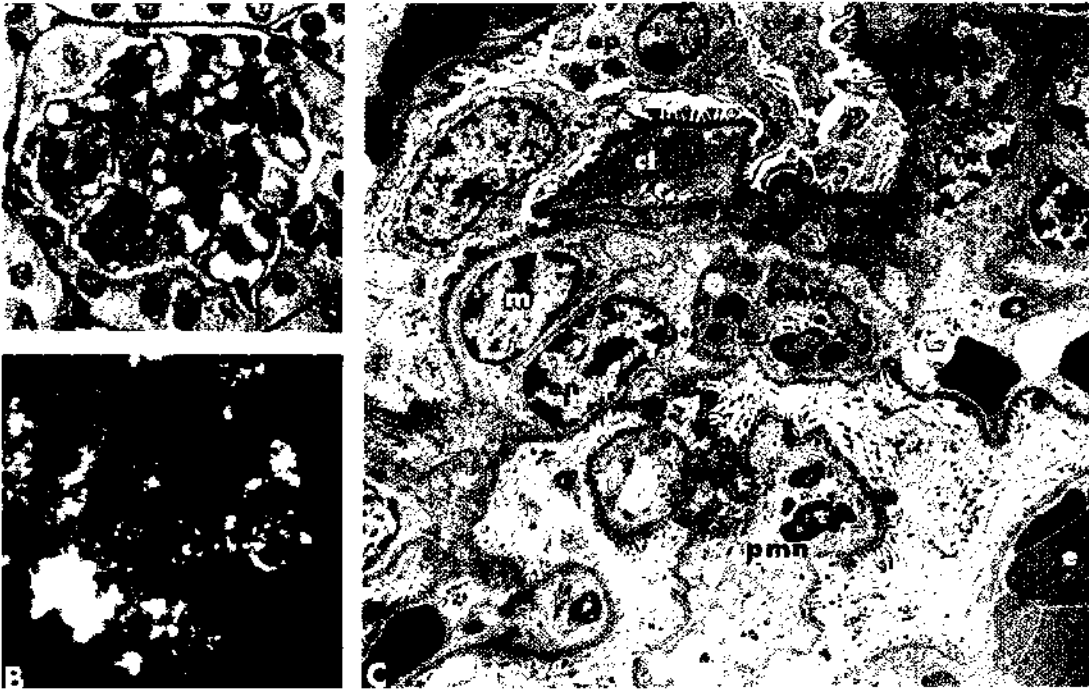


Figura 1. Composición microfotográfica de la microscopía de luz, fluorescencia y electrónica que documenta la glomerulonefritis iniciada por inyecciones múltiples de IC (grupo IC₅ sin LA) en ratones C57L/J.
A. Expansión mesangica con aumento celular. Impregnación argéntica 120 X.
B. Depósitos abundantes de anticuerpo anti-IgG de conejo (preparado en cabra), en mesangio e hilo glomerulares, 250 X.
C. Hiperplasia mesangica (m), depósitos electrónicos densos (flecha). La pared capilar y los pedicelos aparecen normales. El epitelio (ep) y endotelio (en) están edematizados. Los lúmenes capilares (Cl) están abiertos y contienen proteínas y eritrocitos (e). El extremo inferior derecho muestra una cintura mesangica, leucocitos (pmn y mo) y una célula endotelial (en). Acetato de uranilo y citrato plúmbico, 6000 X.

Tabla 3.

Resultados histopatológicos en varios grupos etarios de ratones normales C57L/J (Estudio B)

Grupo	Edad (meses)	n	Microscopía de Luz	Ultraestructura	Inmunofluorescencia
1	(1 - 4)	17	tra 1 +. Mesangial, focal y segmentaria. Hiperplasia hilar.	0 a 1 +. Adelgazamiento del mesangio. Hilo y mbg normal.	1 +. Depósitos granulares mesangiales de IgG e IgM de ratón; C ₃ mínimo o ausente.
2	(6 - 9)	26	1 + a 2 + acentuación de las lesiones, mbg permanece normal. Aparecen protrusiones argirofílicas.	1 + a 2 +. Aumento de la matriz con pocos depósitos densos.	2 +. Con acentuación hilar.
3	(12 - 15)	11	2 + a 3 +. Esclerosis del mesangio. Engrosamiento de la pared capilar	2 + a 3 +. Escasa hialinización aumento de depósitos densos intramesangial y subendoteliales.	2 + a 3 +. Mayores depósitos que en algunas áreas son francamente nodulares.
4	(18 - 24)	13	3 +. Hialinización y expansión periférica mesangial. Engrosamiento de la pared capilar y de mbg. Aumento de protrusiones argirofílicas.	3 +. Espesamiento mesangial y esclerosis, expansión con capilares con doble contorno y protrusiones de la gbm. aumentados.	3 +. Marcadamente mesangial y a veces depósitos nodulares granulares en la periferia.

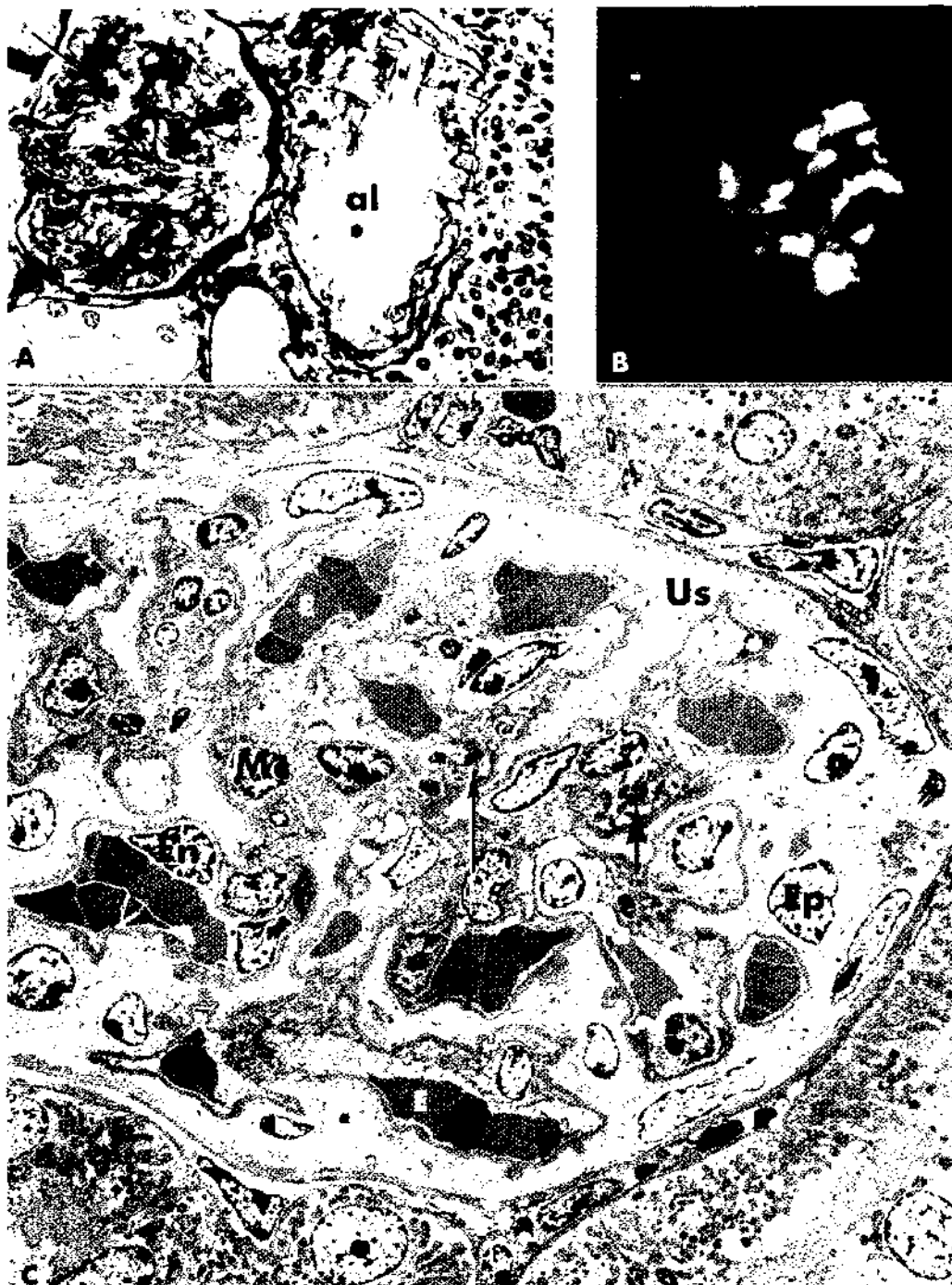


Figura 2. Composición microfotográfica (ML, MIF y ME) que muestra la histopatología glomerular de ratones de edad avanzada (machos) de la cepa C57L/J.

A. Esclerosis mesangica, difusa, moderadamente avanzada (flecha) y con acentuación hiliar. Nótese las proyecciones sésiles de la membrana basal (punta de flecha) y el infiltrado inflamatorio mononuclear periglomerular (al = lumen arteriolar). Impregnación Argéntica, 180 X.

B. Depósitos mesangiales espontáneos, nodulares y granulares. Anticuerpo de conejo, anti-IgM de ratón, 100 X.

C. Vista panorámica de un glomérulo que destaca la expansión difusa y la esclerosis mesangica. Las flechas indican depósitos densos intramembránicos y endoteliales. E = eritrocitos; Ep = epitelio; aa = arteriola aferente; Us = espacio urinario.

Nótese los engrosamientos o proyecciones sésiles y pedunculadas de la mbg.

Acetato de uranilo y citrato plúmbico, 3000 X.

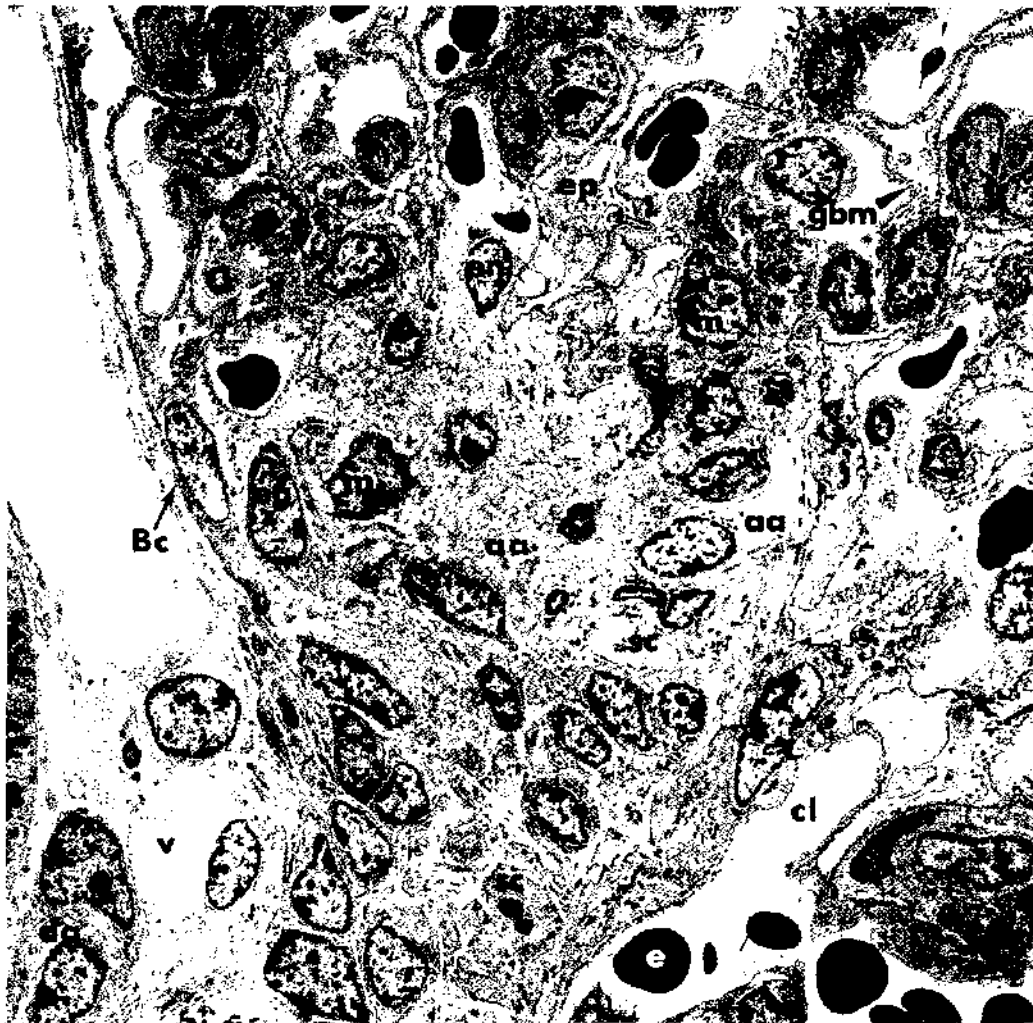


Figura 3. Esta microfotografía electrónica de bajo aumento (ratón de un mes de edad) destaca la capilarización arteriolar a nivel del hilio glomerular; aa, arteriola aferente; m, mesangio; cl, lumen capilar; sc, músculo liso; v, vénula; e, eritrocitos; ep, epitelio; gbm, membrana basal glomerular; Bc, cápsula de Bowman. Se destaca claramente en esta ilustración, la juxtaposición de las células mesangicas y musculares, a medida que se forma el mesangio intraglomerular.

Acetato de uranilo y citrato plúmbico, 3000 X.

En la microscopía electrónica (23 ratones, Tabla 3, Figuras 2 y 3) la estructura hiliar del Grupo 1 aparecía normal, en el Grupo 2 se observaron zonas transicionales entre células musculares y el mesangio extraglomerular con aumento de la cantidad de matriz mesangica. Los Grupos 2, 3 y 4 mostraron expansión progresiva del mesangio, depósitos intramesangiales y subendoteliales segmentarios, granulares o esponjosos. Las protrusiones pedunculadas y sésiles de la mbg estaban aumentadas de tamaño. No se encontraron depósitos subepiteliales y los pedicelios eran normales. En el Grupo 4 la proliferación y fibrosis mesangica fueron mayo-

res con engrosamiento de la pared capilar y de la mbg.

El grosor de la mbg (Tabla 4) fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en los Grupos 4 y 3 que en el Grupo 1.

En la microscopía de inmunofluorescencia se detectaron depósitos mesangiales de IgG e IgM en todas las edades, particularmente en Grupos 3 y 4. Estos eran generalmente granulares o extendidos y comprometían la mayoría de los glomérulos y la mayor parte del mesangio. La concentración C_3 fue mínima o negativa en todos los Grupos.

Tabla 4.

Grosor de la membrana basal glomerular medida
en varios grupos de edades de ratones normales
C57L/J

Membrana Basal Glomerular				
Grupo	n	Grosor (A)	PSDA ^a	p < 0.05
1	8	1526	248	
2	4	1808	323	(-)
3	6	2572	522	(+)
4	5	2810	644	(+)

^a Desviación estándar acumulada.

DISCUSION

La depuración de IC en ratones es un fenómeno variable, dependiente de la cepa de animales y modulado en gran parte por la actividad del SRE⁴⁷⁻⁴⁹. Una depuración acelerada resulta en escasos depósitos tisulares de IC en tanto que la persistencia de estos en la circulación (tránsito prolongado o depuración insuficiente) permite, aparentemente, que grandes cantidades de IC se depositen en los tejidos. Dosis altas de IC o inyecciones múltiples de cantidades relativamente pequeñas saturan o bloquean el SRE y deprimen la depuración de IC⁵⁰⁻⁵³. Los estudios que presentamos están de acuerdo con los trabajos recién mencionados al demostrar la relación inversa que existe entre la depuración de IC y su localización estudiada a las 2 hrs de inyectados. Sin embargo nuestros resultados están en desacuerdo con los anteriores cuando la evaluación se realiza a los 15 minutos, ya que indican una relación directa caracterizada por una disminución significativa de la depuración de IC y de la radioactividad de los tejidos, particularmente del riñón. Nuestros resultados sugieren que el aumento de la radioactividad en los tejidos en presencia de una depuración subnormal de IC se debe posiblemente a una falla del catabolismo local de los IC.

Otro hallazgo importante del presente estudio indica que el tratamiento con LA previo a la administración de IC¹²⁵, reduce considerablemente la depuración de IC, lo que no ocurre cuando se ha extraído toda o la mayor parte de la AFP contenida en el LA. De este modo, debido a una destrucción local reducida, los IC permanecen intactos en el riñón permitiendo detectar más tarde cantidades mayores de radioactividad. Es posible por lo tanto que los aumentos de radioactividad (IC) detectados en otros trabajos pudieran explicarse a través de este fenómeno.

Hasta ahora no se conocen claramente los mecanismos por los cuales los IC se depositan en las estructuras glomerulares y como los glomérulos se deshacen de estos elementos proinflamatorios. Las células mesangicas consideradas como parte del SRE podrían participar activamente en la degradación de IC o de otras partículas⁹. Existe información reciente que sugiere que los IC se catabolizarían a través de procesos fagocíticos no relacionados con las células mesangicas^{19 - 54 - 57}. La fagocitosis de IC por leucocitos MN localizados en el mesangio ha sido demostrada por varios autores⁵⁷⁻⁵⁸, lo que respaldaría nuestro hallazgo de PMN y MN circulantes ubicados en el glomérulo en ratones inyectados con dosis múltiples de IC. Estos hallazgos histopatológicos eran mínimos o estaban ausentes en ratones tratados con LA antes de la inyección de IC. A pesar de los extensos trabajos de Murgita⁵⁹⁻⁶² y de Tomasi^{29 - 63 - 64} acerca de la posible influencia del LA/AFP sobre el sistema inmunitario, poco se sabe de la influencia que estas sustancias podrían tener en la función del SRE. Los resultados presentados sugieren que el SRE es inhibido por el LA/AFP y esta inhibición se manifestaría por una depresión de la depuración y del catabolismo de IC. Es posible que AFP en cierto modo module la respuesta inmunológica, tal vez en la actividad macrofágica como lo han sugerido trabajos preliminares publicados recientemente⁶⁵. Desde un punto de vista morfológico, la mesangeítis proliferativa, con inmunofluorescencia positiva y los depósitos electrónicos densos se redujeron considerablemente en ratones tratados de acuerdo con el protocolo propuesto en este estudio y que utiliza líquido amniótico (LA) con contenido intacto de AFP. Esta histopatología mínima se debe posiblemente a disminución de la reacción inflamatoria aguda del mesangio y a un "bloqueo" de la localización de leucocitos circulantes (PMN y MN) en los glomérulos, características de la glomerulitis inducida de acuerdo a los procedimientos de McCluskey y Benacerraf¹². Aún más, los glomérulos de los animales tratados por 4 semanas con LA/AFP, mostraron una histopatología no descrita hasta ahora y que consistía en una atenuación de la estructura glomerular, disminución de la extensión del mesangio, distensión capilar y adelgazamiento de la pared capilar. Una estimación semicuantitativa sugirió una disminución del número de células presentes en los glomérulos. Estos hallazgos se correlacionaron estrechamente con la disminución o ausencia de depósitos inmunofluorescentes y densos en el mesangio, cuya matriz aparecía reducida. Estos cambios, sin embargo, requerirán confirmación y prueba de su reproducibilidad en otras cepas y especies. Es

posible que las supuestas propiedades inmunosupresoras atribuidas a la AFP contenida en el LA hayan modulado la respuesta inflamatoria o inmunológica; sin embargo, el sitio de acción, local o sistémico, aún no ha sido determinado²⁹ - 60 - 61 - 64.

Los estudios morfométricos en los grupos etarios descritos, documentaron la progresión de la mesangiopatía esclerosante y están de acuerdo con la información publicada por otros en ésta y otras cepas u otras especies de roedores⁴ - 13 - 23 - 24 - 26 - 28 - 59. La esclerosis mesangial, acompañada inicialmente de hiperplasia, constituyó una lesión bien definida, alcanzó su máximo entre 9 y 12 a 14 meses de edad con progresión lenta a partir de este punto. Hubo una buena correlación entre los depósitos de IgG-IgM del mesangio e hilo glomerulares con los depósitos electrónicos densos. Debido a que un número importante de ratones de edad avanzada tenían IC circulantes, o sustancias que de acuerdo con los procedimientos utilizados para su detección se comportaban como tales, es posible que estos participen en el desarrollo y progresión de la hiperplasia-esclerosis.

Estos resultados sugieren que se indujo una glomerulitis aguda en ratones jóvenes (machos) de la cepa C57L/J mediante la inyección de IC solubles preformados, preparados en exceso de antígeno. Además, que la depuración de IC por el SRE estaba comprometida (disminuída) significativamente por el pretratamiento de los animales con LA que contenía AFP. Tercero, que el uso de LA del cual la mayor parte de la AFP había sido extraída, no modificó la depuración de los IC. Cuarto, que posiblemente este efecto se deba a inhibición (directa o indirecta) del SRE, que no se asoció, como se esperaría, con una abundancia de IC en los tejidos. Aparentemente, la persistencia de los IC "in situ" no fue seguida de mayor acumulación sino que de degradación significativamente menor, que permitió detectar un aumento de la radioactividad tardía (2 hrs). Finalmente, estos estudios sugieren que el LA que contiene AFP protegió al riñón del efecto pro-inflamatorio de los IC; el mecanismo de esta acción, que probablemente resida en la AFP, no está aclarada.

REFERENCIAS

1. *Cochrane, C.G.; Koffler, D.*: Immune complex disease in experimental animals and man. *Adv. Immunol.* 16: 185, 1973.
2. *Germuth, F.C.; Rodríguez, E.*: Immunopathology of the Renal Glomerulus, Little Brown and Company, Boston, 1973.
3. *Glasscock, R.J.; Bennett, C.M.*: The glomerulopathies. IN: *The Kidney*, Brenner B.M., Rector F.C., Jr., editors, p. 941, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1976.
4. *Markham, R.V., Jr.; Sutherland, J.C.; Mardiney, M.R.*: The ubiquitous occurrence of immune complex localization in the renal glomeruli of normal mice. *Lab. Invest.* 29: 111, 1973.
5. *Nyedegger, U.E.*: Biological properties and detection of immune complexes in animal and human pathology. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.* 185: 63, 1979.
6. *Stensgaard, J.; Johansen, A.S.*: Biochemical aspects of immune complex formation and immune complex disease. *Allergy* 35: 457, 1980.
7. *Urizar, R.E.; Gilboa, N.; Largent, J.A.*: Immunologic mechanisms of childhood renal diseases. *Paediatrician* 10: 254, 1981.
8. *Couser, W.G.; Salant, D.J.*: In situ immune complex formation and glomerular injury. *Kidney Int.* 17: 1, 1980.
9. *Fleuren, G.; Grond, J.; Hoedemaeker, P.J.*: In situ formation of subepithelial glomerular immune complexes in passive serum sickness. *Kidney Int.* 17: 631, 1980.
10. *Gallo, G.; Caulin-Glasser, T.; Lamm, M.E.*: Charge of circulating immune complexes as a factor in glomerular basement membrane localization in mice. *J. Clin. Invest.* 67: 1305, 1981.
11. *Theophilopoulos, A.; Dixon, F.J.*: Immune complexes in human disease. *Am. J. Pathol.* 100: 529, 1980.
12. *McCluskey, R.I.; Benacerraf, B.*: Localization of colloidal substances in vascular endothelium. A mechanism of tissue damage. II. Experimental serum sickness with acute glomerulonephritis induced passively in mice by antigen-antibody complexes in antigen excess. *Am. J. Pathol.* 35: 275, 1959.
13. *Couser, W.G.; Stillmant, M.D.*: Mesangial lesions and focal glomerular sclerosis in the aging rat. *Lab. Invest.* 33: 491, 1975.
14. *Mannik, M.*: Physicochemical and functional relationships of immune complexes. *J. Invest. Dermatol.* 74: 333, 1980.
15. *Barcelli, V.; Rademacher, R.; Ooi, Y.M.; Ooi, B.S.*: Modification of glomerular immune complex deposition in mice by activation of the reticuloendothelial system. *J. Clin. Invest.* 67: 20, 1981.
16. *Benacerraf, B.; Sebastyrn, M.; Cooper, N.S.*: The clearance of antibody complexes from the blood by the reticuloendothelial system. *J. Immunol.* 82: 131, 1959.
17. *Finblood, D.S.; Abeles, D.; Rifai, A.; Plotz, P.H.*: The specificity of uptake of model immune complexes and other protein aggregates by the murine reticuloendothelial system. *J. Immunol.* 125: 1060, 1980.
18. *Finblood, D.S.; Lotz, P.H.*: Studies of reticuloendothelial function in the mouse, with model immune complexes. I. Serum clearance. *J. Immunol.* 123: 1594, 1979.
19. *Michael, A.F.; Keane, W.F.; Raji, L.; Mauer, S.M.*: The glomerular mesangium. *Kidney Int.* 17: 141, 1980.
20. *Raji, L.; Sibley, R.K.; Keane, W.*: Mononuclear phagocytic system stimulation. Protective role for glomerular immune complex deposition. *J. Lab. Clin. Med.* 98: 558, 1981.
21. *Bolton W.K.; Benton F.R.; MacLay J.S.; Sturgill B.S.*: Spontaneous glomerular sclerosis in aging Sprague-Dawley rats. I. Lesions associated with

- mesangial IgG deposits. *Am. J. Pathol.* 85: 277, 1976.
22. *Bolton W.K., Stugill B.C.*: Spontaneous glomerular sclerosis in aging Sprague-Dawley rats. II. Ultrastructural studies. *Am. J. Pathol.* 98: 339, 1980.
 23. *Elema J.D., Arends A.*: Focal and segmental glomerular hyalinosis and sclerosis in the rat. *Lab. Invest.* 33: 554, 1975.
 24. *Gutman P.H., Wepper K.D., Fudenberg H.H.*: On the presence of IgG and B1c globulins in renal glomeruli in aging and neonatally irradiated mice. *Vox Sang* 12: 329, 1967.
 25. *Kreisberg J.I., Karnovsky M.J.*: Focal glomerular sclerosis in the fawn hooded rat. *Am. J. Patol.* 92: 637, 1978.
 26. *Linder E., Pasternack A., Edgington T.S.*: Pathology and immunology of age-associated disease of mice and evidence for an autologous immune complex pathogenesis of the associated renal disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1: 104, 1972.
 27. *Peter C.P.*: Possible immune origin of age-related pathological changes in long-lived mice. *J. Gerontol.* 28: 265, 1973.
 28. *Porter D.D., Porter H.G., Cos N.A.*: Immune complex glomerulonephritis in one year old C57L/J mice induced by endogenous murine leukemia virus. *J. Immunol.* 111: 1626, 1973.
 29. *Tomasi T.B., Jr., Datweyler R.J., Murgueta R.A., Keller R.H.*: Immunosuppression by alphafetoprotein. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 88: 293, 1975.
 30. *Himmelhoch S.R.*: Chromatography of proteins on ion-exchange adsorbents. *Meth. Enzymol.* 22: 273, 1971.
 31. *Peterson E.A., Sober H.A.*: Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbent. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 751, 1956.
 32. *Hubbard A.L., Cohn Z.A.*: The enzymatic iodination of the red cell membrane. *J. Cell Biol.* 55: 390, 1972.
 33. *Marchalonis J.J.*: An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem J.* 113: 299, 1969.
 34. *Mizejewsky G.J., Plummer J.M., Blanchette K.A., Vonnegut M., Jacobsen H.I.*: Alphafetoprotein: Immunoreactivity of the major estrogen-binding component in mouse amniotic fluid. *Immunol.* 36: 685, 1979.
 35. *Ouchterlony O.*: Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis (1st edition), Ann Arbor Science, Ann Arbor, M.I., pp. 21-31, 1968.
 36. *Lowry O.H., Rosebrough N.F., Farr A.L., Randall R.J.*: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
 37. *Mizejewsky G.J., Allen R.P.*: Immunotherapeutic suppression in transplantable solid tumors. *Nature (London)* 250: 50, 1974.
 38. *Mizejewsky G.J., Young R., Allen R.P.*: Alpha-fetoprotein: Effect of heterologous antiserum on hepatoma cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 54: 1361, 1975.
 39. *Joshi S.V., Ebert K.M.*: Effects of progesterone on labelling of soluble proteins and glycoproteins in rabbit endometrium. *Fertil Steril* 27: 730, 1976.
 40. *Mizejewsky G.J., Vonnegut M., Simon R.*: Estradiol affinity chromatography. Application to purification of murine alphafetoprotein. *J. Chromatography* 202: 113, 1980.
 41. *Creighton W.D., Lambert P.H., Miescher P.A.*: Detection of antibodies and soluble antigen-anti-body complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J. Immunol.* 111: 1219, 1973.
 42. *Mylyala G.*: Aggregation of human blood platelets by immune complexes in the sedimentation pattern test. *Scand. J. Hematol. (Suppl)* 19: 1-56, 1973.
 43. *Urizar R.E., Sherer G., Tartaglai A., et al.*: Disseminated intravascular coagulation induced by liquoid in the rat. I. Correlation of hematologic and complement abnormalities with renal lesions studied by light fluorescence and electron microscopy. *Lab. Invest.* 32: 270, 1975.
 44. *Urizar R.E., Tinglof B.D., Smith F.G., et al.*: Persistent asymptomatic proteinuria in children. Functional and ultrastructural evaluation with special reference to glomerular basement membrane thickness. *Am. J. Clin. Pathol.* 62: 461, 1974.
 45. *Taylor R.N., Juong A.Y., Fulford K.M.*: Quality control for immunologic tests. USDHHS publication (CDC) 79: 8379, 1979.
 46. *Fleiss J.*: Statistical methods for rates and proportions. J. Wiley and Sons, New York, 1973.
 47. *Ford P.M.*: Glomerular localization of aggregated protein in mice: Effect of strain differences and relationship to systemic macrophage function. *Br. J. Exp. Pathol.* 56: 307, 1975.
 48. *Ford P.M.*: Passive serum sickness in the mouse: Effect of interstrain differences on glomerular deposition of immune complexes. *Br. J. Exp. Pathol.* 56: 199, 1975.
 49. *Hoffsten P.E., Swerdlin A., Bartell M., Hill C.L., Venverloh J., Brotherson K., Klahr S.*: Reticuloendothelial and mesangial function in murine immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int.* 15: 144, 1979.
 50. *Haakenstad A.O., Mannik N.*: Saturation of the reticuloendothelial system with soluble immune complexes. *J. Immunol.* 112: 139, 1974.
 51. *Haakenstad A.O., Case J.B., Mannik M.*: Effect of cortisone on the disappearance kinetics and tissue localization of soluble immune complexes. *J. Immunol.* 114: 1153, 1975.
 52. *Shvil Y., Michael A.F., Mauer S.M.*: Uptake of aggregated immunoglobulin by the mouse kidney. I. Effect of endotoxin. *Br. J. Exp. Pathol.* 61: 22, 1980.
 53. *Shvil Y., Mauer S.M., Michael A.F.*: Uptake of aggregated immunoglobulin by the mouse kidney. II. Effect of hydrocortisone. *Br. J. Exp. Pathol.* 61: 30, 1980.
 54. *Elema J.D., Hoyer J.R., Vernier R.L.*: The glomerular mesangium: Uptake and transport of intravenously injected colloidal carbon in rats. *Kidney Int.* 9: 396, 1976.
 55. *Lee S., Vernier R.L.*: Immunoelectron microscopy of the glomerular mesangial uptake and transport of aggregated human albumin in the mouse. *Lab. Invest.* 42: 44, 1980.
 56. *Mauer S.M., Fish A.J., Blau E.D., Michael A.F.*: The glomerular mesangium. I. Kinetic studies of macromolecular uptake in normal and neoplastic rats. *J. Clin. Invest.* 51: 1092, 1972.
 57. *Striker G., Mannik M., Tuay M.Y.*: Role of marrow derived monocytes and mesangial cells in removal of immune complexes from renal glomeruli. *J. Exp. Med.* 149: 127, 1979.
 58. *Okumura K., Kondo Y., Tada T.*: Studies on passive serum sickness. I. The glomerular fine structure of serum sickness nephritis induced by preformed antigen-antibody complexes in the mouse. *Lab. Invest.* 24: 383, 1971.

59. *Murgita R.A., Tomasi T.B., Jr.*: Suppression of the immune response by alphafetoprotein. I. Effect of mouse alphafetoprotein in the primary and secondary antibody response. *J. Exp. Med.* 141: 269, 1975.
60. *Murgita R.A., Tomasi T.B., Jr.*: Suppression of the immune response by alphafetoprotein. II. The effect of mouse alphafetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen induced lymphocyte transformation. *J. Exp. Med.* 141: 440, 1975.
61. *Murgita R.A., Goidl E.A., Kontiainen S., Beverley P.C.L., Wigzell H.*: Alphafetoprotein induces suppressor T-cells *in vitro*. *Nature* 267: 257-259, 1977.
62. *Murgita R.A., Andersson L.C., Sherman M.S., Bennich H., Wigzell H.*: Effects of human alphafetoprotein on human B and T lymphocyte proliferation *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* 33: 347, 1978.
63. *Tomasi T.B., Jr.*: Structure and function of alphafetoprotein. *Ann. Rev. Med.* 28: 453, 1977.
64. *Tomasi T.B., Jr.*: Suppressive factors in amniotic fluid and newborn serum: Is alphafetoprotein involved? *Cell. Immunol.* 37: 459, 1978.
65. *Yazova A., Suslov A.P., Bronz B.D.*: Termination of natural tolerance to alpha-fetoprotein in rats: Study of cell-mediated immunity in the macrophage migration inhibition test. (T-B cell separation/peritoneal exudate cells.) *Folia Biologica (Praha)* 24: 81, 1978.