R. esp. Fisiol, 12, n.° 4, págs. 251 a 258. 1956.

Departamento de Investigación del Hospital Municipal de Infecciosos
Sección Inmunoquímica. - Barcelona
(Dr. J. Gras)

Inhibición de anticuerpos circulantes en los sistemas proteína-antiproteína por hiperinmunización

por
J. Gras

(Recibido para publicar el 19 de octubre de 1956)

Recientemente desarrollamos una hipótesis acerca de la naturaleza y significación biológica de los anticuerpos (1), a los que consideramos como apofermentos de un sistema encargado de la metabolización de los substratos macromoleculares extracelulares, junto con cofermentos existentes normalmente intra y extracelularmente (complemento). Los substratos homólogos (antígenos de los hematíes, proteínas plasmáticas) se encuentran circulantes en cantidad y de manera constante por la sangre y líquidos intersticiales, además de llegar ya a dicho sistema durante la vida intraembrionara La posible disminución de la capacidad de formación de anticuerpos durante la vida adulta frente a determinado antígeno cuando se ha tenido contacto prenatal con el mismo, la investigamos en otro trabajo (2).

Postulamos la existencia de un equilibrio entre antígeno circulante y apofermentos intracelulares, equilibrio que daría lugar a que éstos no apareciesen en la circulación (anticuerpos) cuando el antígeno circula en cantidad. Se ha señalado que una dosis única excesiva de polisacárido neumocócico inhibe la formación de anticuerpos, fenómeno al que FELTON denominó «parálisis inmunológica» (4). También se ha indicado que no aparecen anticuerpos circulantes hasta que el antígeno desaparece de la circulación. Por ello y por el valor teórico y práctico que el hecho puede tener decidimos estudiar la posibilidad de que una dosis de antígeno óptima, administrada al ritmo también

óptimo para la formación de anticuerpos circulantes, pueda dar lugar a la inhibición de los mismos si se mantiene por un tiempo suficientemente prolongado. Esta posibilidad la hemos confirmado, al parecer, en el sistema globulina gamma humana-antiglobulina gamma de conejo.

Material y métodos

Se ha utilizado como antígeno globulina gamma obtenida por precipitación mediante hiposulfato sódico y control electroforético (3) procedente de un suero humano normal, de una mezcla de sueros humanos normales y del suero de un enfermo de Kala-Azar. Como animal de inmunización se ha empleado el conejo, y como vía de administración la subcutánea. Las dosis aisladas han oscilado de 7,32 a 11,7 mg., inyecciones que se han administrado al ritmo de tres por semana. Las sangrías para el estudio de los anticuerpos circulantes se han practicado después de cada número de inyecciones de antígeno correspondiente a una dosis global del mismo de unos 40 a 60 mg. en las series II y III. Las dosis totales y ritmo exacto para cada animal se presentan en los correspondientes cuadros.

El estudio de la reacción antígeno-anticuerpo se ha llevado a cabo por la técnica de OUCHTERLONY (5) de doble difusión en agar, utilizando agar al 0,15 % con mertiolato al 0,01 %, colocando 30 c. c. del mismo por cada placa de Petri de 10 cm. de diámetro, lo que da un espesor de 10 mm. Se han excavado con un sacabocados cinco pocillos por placa de una cabida de 0,15 c.c. cada uno, uno central para el antisuero y cuatro periféricos, a una distancia de 15 mm. del central, para las soluciones de antígeno.

Los resultados los expresamos por el número de líneas de precipitación que se observan a las diversas diluciones del antígeno, así como por la intensidad de las mismas que es distinta en las diversas extracciones. Estas diferencias y la individualización de líneas de precipitación muy próximas entre sí es difícil a veces de conseguir fotográficamente, por lo que presentamos los resultados en cuadros y esquemas y únicamente fotografías demostrativas de los casos extremos.

Resultados

Estudiamos una primera serie expuesta en el cuadro I y figura 1. La primera extracción corresponde a los 92 días de

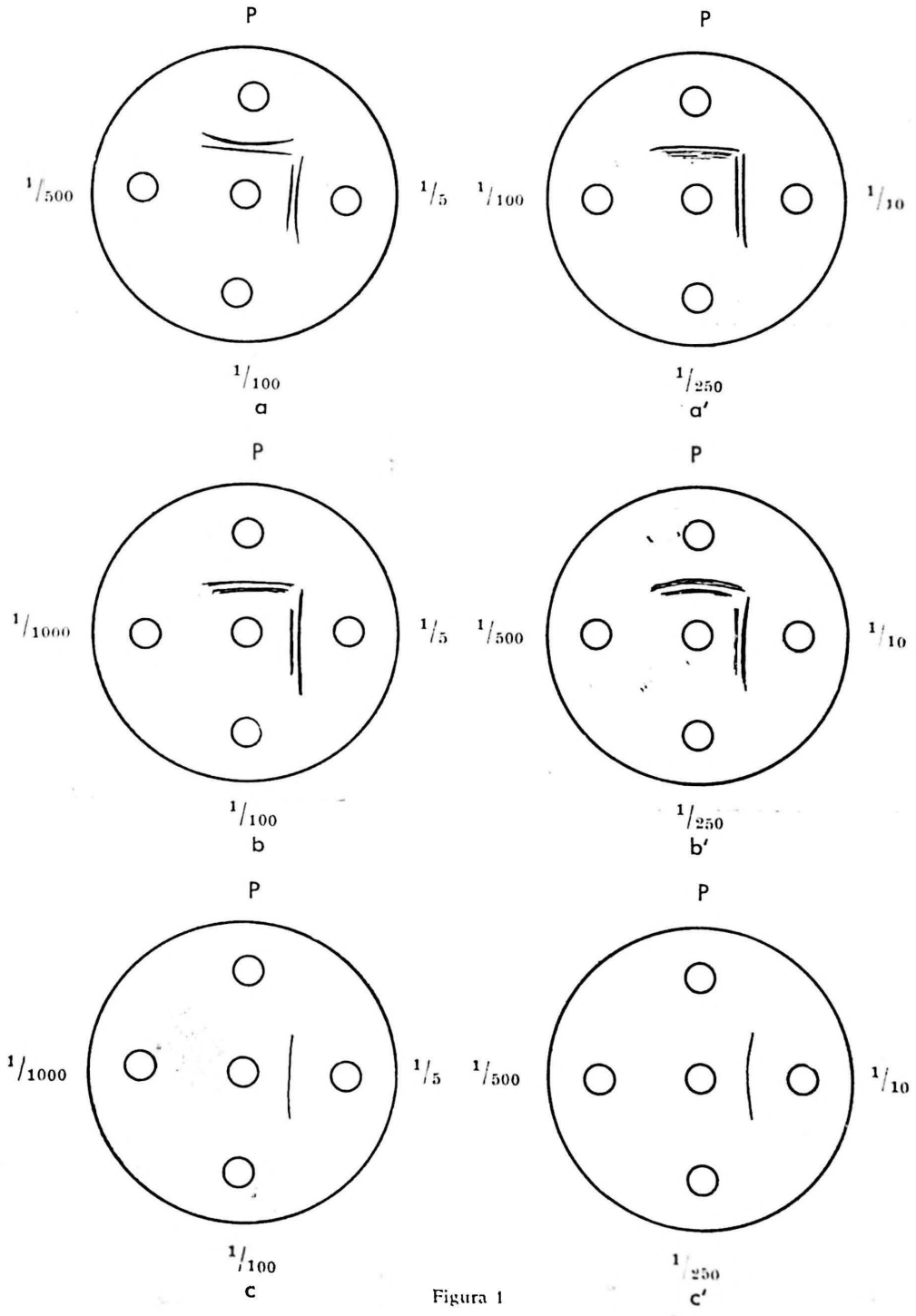

P
1/500
1/5
1/100
a
P
1/100
1/10
1/250
a'
P
1/1000
1/5
1/100
b
P
1/500
1/10
1/250
b'
P
1/1000
1/5
1/100
c
P
1/500
1/10
1/250
c'

Figura 1

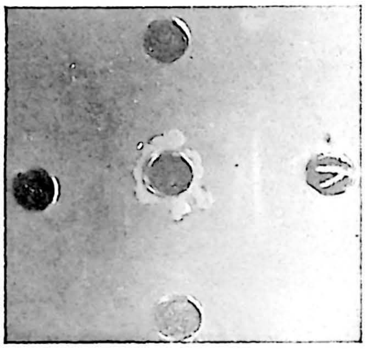
P

1/500 — 1/5

1/100

a

P



1/1000 — 1/10

1/250

a'

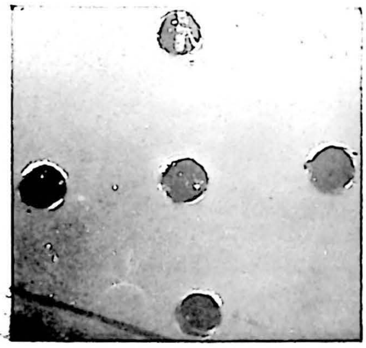
P

1/500 — 1/5

1/100

b

P



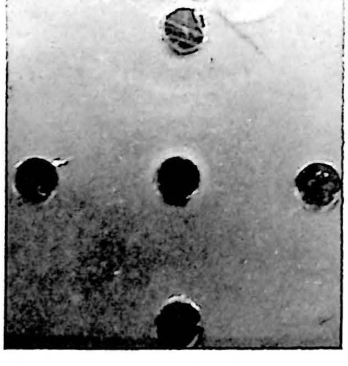
1/1000 — 1/10

1/250

b'

Figura 2

P

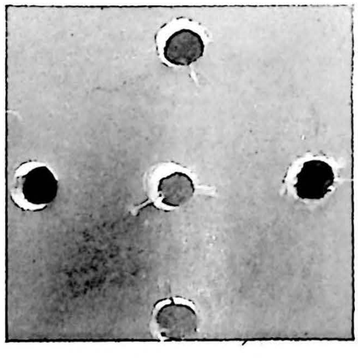


1/1000 — 1/10

1/250

a

P



1/500 — 1/5

1/100

a'

Figura 3

CUADRO I

Serie I. Globulina gamma normal. Anti-gamma conejo A-51 (1)

Días	Dosis total antígeno mg. (2)	Diluciones antígeno						
		P (3)	1/5	1/10	1/100	1/250	1/500	1/1000
92	304,16	2	2	2	0	0	0	0
121	470,36	2	2	2	0	0	0	0
189	665,90	0	1	1	0	0	0	0

(1) Peso 2650 gr.
(2) Las dosis aisladas han oscilado entre 9,37 y 11,71 mg.
(3) Sol. 18,7 gr. por 1000.

CUADRO II

Serie II. Globulina gamma mezcla sueros normales. Anti-gamma conejo B-1 (1)

Días	Dosis total antígeno mg. (2)	Diluciones antígeno						
		P (3)	1/5	1/10	1/100	1/250	1/500	1/1000
16	64,05	2	2	2	0	0	0	0
37	136,05	4	3	3	0	0	0	0
51	179,80	4	3	2	0	0	0	0
64	231,50	4	3	—	0	0	0	0
79	284,00	— (4)	0	0	0	0	0	0
91	336,00	— (4)	0	0	0	0	0	0
106	398,4	0	0	0	0	0	0	0

(1) Peso 2120 gr.
(2) Las dosis aisladas han oscilado entre 8,75 a 10,4 mg.
(3) Sol. al 13.85 gr. por 1000.
(4) El cruzamiento indica que la línea de precipitación es apenas visible.

CUADRO III

Serie III. Globulina gamma y Kala-azar. Anti-gamma conejo B-2 (1)

Días	Dosis total antígeno mg. (2)	Diluciones antígeno						
		P (3)	1/5	1/10	1/100	1/250	1/500	1/1000
16	58,17	2	1	0	0	0	0	0
38	124,65	2	1	1	0	0	0	0
51	166,20	2	4	3	0	0	0	0
64	216,56	2	2	2	0	0	0	0
79	265,92	3	2	2	0	0	0	0
91	302,52	3	— (4)	2	0	0	0	0
106	346,44	— (4)	— (4)	0	0	0	0	0

(1) Peso 2020 gr.
(2) Las dosis aisladas han oscilado entre 7,32 a 8,31 mg.
(3) Sol. 27,3 gr. por 1000.
(4) El cruzamiento indica menor intensidad en las líneas de precipitación.

administración del antígeno (dosis total 304,16 mg.), la segunda a los 121 días (dosis total 470,36 mg.) y la tercera a los 189 días (dosis total 665,9 mg.). En las dos primeras extracciones se presentan dos líneas de precipitación frente al antígeno puro (sol. 18,7 g. $^0/_{00}$) y a las diluciones al 1/5 y al 1/10, si bien en la segunda extracción las líneas de precipitación correspondientes al antígeno puro son más débiles. En la tercera extracción sólo se observa una línea de precipitación a las diluciones de 1/5 y 1/10 y además muy débil.

La segunda serie, cuadro II y figura 2 corresponde a una globulina gamma precipitada de una mezcla de tres sueros humanos normales. Las extracciones se han hecho más graduales de manera a poder seguir paso a paso el fenómeno. Como se observa, las líneas de precipitación y su intensidad aumentan hasta alrededor de los 200 mg. (60 días de inmunización) para después disminuir, llegando casi a desaparecer de una manera bastante brusca. El problema del número de líneas de precipitación en relación con la pluralidad o unidad inmunológica de la globulina gamma o sus posibles impurezas no nos interesa en este momento y será considerado en otro trabajo. El estudio de esta serie se repitió partiendo de soluciones de antígeno de una concentración de 2 g. $^0/_{00}$, diluyendo el antisuero a la mitad o situando los pocillos periféricos a menor distancia del central, habiéndose obtenido iguales resultados de manera global, pero siendo menos manifiestas las líneas de precipitación.

La tercera serie (cuadro III y fig. 3) corresponde a una globulina gamma procedente de un suero de Kala-Azar. Se observa también cómo el número de antígenos y su intensidad de preciptación aumentan hasta los 166 mg. (50 días de inmunización) para descender después de una manera lenta. El estudio de esta serie se ha repetido también en las condiciones expuestas para la serie anterior, confirmándose los resultados obtenidos.

Discusión

En las tres series se observa cómo el número de anticuerpos precipitantes y su intensidad precipitante, a juzgar por el número e intensidad de las líneas de precipitación, disminuye. En los dos últimos animales ello ocurre entre los 200 a 300 mg. de antígeno administrados, lo que hace pensar que en el primer animal empezamos a estudiar la presencia de anticuerpos circulantes precisamente en la fase de declinación. No obstante, las relaciones cuantitativas del fenómeno no podrán precisarse has-

ta estudiar un lote mayor de animales y de antígenos para evitar posibles peculiaridades individuales, como podría ser el caso en el conejo B.-1. En general, y dejando aparte el que exprofesamente no hemos utilizado coadyuvantes para la obtención de los antisueros, las dosis por inyección que se utilizan son algo más pequeñas y la total oscila entre los 60 a 150 mg.; algunos autores al llegar a estas dosis cesan la administración pero hacen una nueva inyección de antígeno al cabo de algunos días, como dosis reactivante.

Los títulos obtenidos son bajos y ello puede ser debido a la administración del antígeno por vía subcutánea o bien a la conocida similitud físicoquímica e inmunológica entre las globulinas gamma del conejo y del hombre. Esta última posibilidad viene corroborada por los títulos elevados obtenidos en otras series con suero de caballo y una macroglobulina humana, observaciones que serán presentadas en otro trabajo. El hecho de haber obtenido títulos bajos por esta similitud inmunológica es probable que sea una circunstancia que haya favorecido la manifestación del fenómeno de la inhibición del anticuerpo circulante.

Podría pensarse que esta inhibición de los anticuerpos precipitantes circulantes fuese debida a defecto de la técnica utilizada, a un exceso de antígeno circulante que inhibe la manifestación de la reacción «in vitro» o bien a una modificación en el tipo de anticuerpo circulante.

En cuanto a la primera posibilidad, podría haber ocurrido que el aumento en el número de anticuerpos circulantes hubiese desplazado la zona de óptima proporción entre antígeno y anticuerpo en forma que no la pudiésemos visualizar. Sin embargo, no creemos que sea ésta la explicación del fenómeno, por la concentración inicial de antígeno utilizada, por tratarse de antisueros de conejo y por haber repetido las determinaciones de las series con concentraciones menores del antígeno (2 g. $^{0}/_{00}$ de concentración inicial) y también diluyendo el antisuero a la mitad; probablemente utilizando otras técnicas o variantes para la reacción antígeno anticuerpo podría haber cambiado la expresión cuantitativa, pero no la curva del fenómeno, con su fase final de inhibición.

En cuanto al posible exceso de antígeno circulante, si nos fijamos en el conejo B-1, en el que la inhibición es muy marcada, y calculamos su volumen sanguíneo circulante como un 8 % de su peso, nos resulta igual a 169,6 c. c., que si consideramos aproximadamente un 50 % del mismo como plasma, da un volumen de plasma de 84,8 c. c. Suponiendo que todo el antígeno inyectado se encuentre en la circulación, cosa evidentemente inexacta, daría una concentración del mismo de 4,7 g. $^{0}/_{00}$, inferior netamente a las concentraciones utilizadas también en

los antisueros iniciales y que no inhiben la reacción ; por otra parte esto podría darnos un desplazamiento de la zona de óptima floculación, como se insinua en la serie I, pero no su anulación. El hecho de que este antígeno circulante se una «in vivo» con el anticuerpo y de esta forma lo separe de la circulación, es una manera de explicar precisamente el hecho que parece observarse de que el exceso de antígeno inhibe la circulación de anticuerpo. Esto podrá estudiarse fácilmente con antígenos particulados. No obstante, existen otras posibilidades para explicar que el equilibrio entre antígenos y anticuerpos circulantes se desplace en forma tal que elimine a éstos de la circulación o bien impida que pasen a ella.

La tercera posibilidad, es decir, que cambie el tipo de anticuerpos circulantes, pasando de anticuerpo polivalente a univalente (low-grade, inhibente, etc.) y por ello no visualizable con la técnica utilizada, la investigaremos mediante antígenos particulados por ser en ellos más fácil y dar una mayor seguridad. Aunque fuese así, restaría evidente el hecho de que una inmunización prolongada, llevada a cabo con dosis pequeñas y a intervalos, del antígeno, inhibe los anticuerpos precipitantes.

Si se confirma este hecho de la inhibición de los anticuerpos circulantes por una inmunización prolongada, equiparable al de la parálisis inmunológica producida por una dosis única excesiva de antígeno (4), resultará de un alto interés en la teoría inmunológica para el conocimiento de la naturaleza y significado biológico de los anticuerpos y porque podría explicar hechos como la ausencia de anticuerpos circulantes frente a los antígenos homólogos circulantes por el plasma (antígeno de los hematíes, proteínas plasmáticas), la posibilidad de que algunos procesos por autoanticuerpos fuesen debidos a la rotura de este equilibrio, explicarnos las desensibilizaciones en alergia, a más de que tendría posiblemente repercusión práctica. Creemos necesario para la segura confirmación del fenómeno proseguir este estudio con diversos antígenos disueltos y particulados, frente a distintas especies animales, diferentes vías de administración y mediante técnicas diversas para la demostración de la reacción antígeno anticuerpo, así como comprobar lo que ocurre al cesar en la administración del antígeno, una vez presentada la inhibición del anticuerpo circulante.

Agradecemos a la señorita Ana María Arce su valiosa cooperación en la realización práctica de este trabajo.

Resumen

Recientemente hemos formulado una hipótesis acerca de la naturaleza y significación biológica de los anticuerpos, en la cual los consideramos como apoenzimas de un sistema encargado de la metabolización de los substratos macromoleculares extracelulares, en unión con coenzimas existentes normalmente intra o extracelularmente (complemento). Postulamos la existencia de un equilibrio entre el antígeno circulante y los apoenzimas intracelulares, equilibrio que inhibe la entrada de éstos a la circulación (anticuerpos circulantes) cuando el antígeno se encuentra de una manera constante y en cantidad en la circulación. Se conoce que una dosis única excesiva de antígeno (polisacárido neumocócico), inhibe la formación de anticuerpos («parálisis inmunológica»). Por estas razones hemos investigado en este trabajo la posibilidad que una dosis óptima de antígeno, administrada a los intervalos oportunos, pueda producir una inhibición de los anticuerpos circulantes si su administración se prolonga durante largo tiempo.

Esta posibilidad ha sido confirmada, aparentemente, en conejos, utilizando como antígeno globulina gamma humana, dada subcutáneamente sin coadyuvantes, e investigando la reacción antígeno anticuerpo por el método de OUCHTERLONY de doble difusión en agar.

En un primer animal dosis de globulina gamma de 9,17 a 11,71 mg, administradas cada dos días durante 189 días, con un total de 665,9 mg, han producido una inhibición de los anticuerpos precipitantes circulantes.

En un segundo animal dosis de globulina gamma de 8,75 a 10,4 mg, dadas a los mismos intervalos hasta un total de 398,4 gm en 106 días, producen una inhibición total de los anticuerpos precipitantes demostrables.

En un tercer animal se han obtenido resultados equiparables con dosis de globulina gamma de 7,32 a 8,31 mg, mantenidos durante 106 días, llegando a un total de 346,4 mg.

Los resultados han sido los mismos al cambiar las condiciones de la reacción antígeno anticuerpo, diluyendo el antisuero a la mitad, utilizando diferentes concentraciones iniciales del antígeno y disminuyendo la distancia de difusión entre antígeno y anticuerpo.

Se discuten las posibilidades de errores técnicos, de una inhibición *in vitro* de la reacción y del cambio de tipo del anticuerpo, considerando que estos factores pueden modificar la expresión cuantitativa del fenómeno pero no invalidar su existencia real. Finalmente se expone el interés teórico y práctico de esta inhibición de los anticuerpos circulantes y la necesidad de un estudio más extenso del mismo.

Summary

Inhibition of circulating antibodies by hyperinmunization in a protein-antiprotein system

Recently we have formulated an hypothesis about the biological nature and significance of antibodies, in which they are considered as apoenzymes of a system in charge of the metabolization of extracelular macromolecular substrates, in connection with coenzymes normally existing intra or extracelullarly (complement). A equilibrium was postulated between circulating antigen and intracelullar apoenzymes, equilibrium which inhibits the entrance into circulation of these apoenzymes (circulating antibodies) when the antigen is maintained in quan-

tity and constantly in circulation. Is known that a single, too great dosis of antigen, inhibits the formation of antibodies (Inmunological paralysis). For these reasons we have investigated in this paper the possibility that and optimal dosis of antigen, given also in the best intervals, may produce and inhibition of circulating antibodies when its administration is mantained for a long time.

This possibility has been, apparently, confirmed in rabbits using as antigen human gamma globulin, given subcutaneously without adjuvants, and sturying the antigen-antibody reaction by OUCHTERLONY double diffusion in agar method.

In a first animal, dosis from 9.17 to 11.71 mg of human gamma globulin, given each two days, followed till 189 days and representing a total of 665.9 mg, have produced an inhibition of circulating precipitating antibodies (table I and fig. 1).

In a second animal dosis of gamma globulin from 8.75 to 10.4 mg, administrated at the same intervals and arriving totally to 398.4 mg in the 106 days, produce a total inhibition of demonstrable circulating precipitating antibodies (table II and fig. 2).

In a third animal a similar result has been obtained with dosis of gamma globulin from 7.32 to 8.31 mg maintained during 106 days with a total administration of 346.4 mg. (table III and fig. 3).

The results have been the same, changing the conditions of the antigen antiboly reaction, by diluting to ½ the antiserum, using different initial concentration of antigen and lessening the distance of diffusion between antigen and antibody.

The possibilities of technical errors, in vitro inhibition of the reaction, changes n type of the antbody, are dscussed, assuming that all these factors may change the quantitative expression of the phenomenon but not invalidate its positive existence. Finally is exposed the theoretical and practical interest of this circulating antibody inhibition and the necessity of a more extensive study of it.

Bibliografia

(1) GRAS, J. : Proteínas plasmáticas. Ed. Jims. Barcelona 1956.

(2) GRAS, J. ; Z. Tropenmedizin. (En Prensa.)

(3) GRAS, J., y SALAZAR, M. : A comparative study of the fractionation with $Na_2S_2O_3$ and paper electrophoresis of the serum proteins. Plasma 2 ; **1**, 18, 1954.

(4) MORGAN, F., WATSON, D. F., y CROMARTIE, W. J. : Type specificity of Inmunological paralysis induced in mice with pneumococcal type II polysaccharide. *J. Bact.* ; **65**, 224-225, 1953.

(5) OUCHTERLONY, O. : Antigen - Antibody reaction in gels. *Act. Path. Microb. Scand.* ; **32**, 231, 240, 1952.