

Departamento de Investigación del Hospital  
Municipal de Ntra. Sra. del Mar  
Barcelona

## Anticuerpos anti-globulina gamma en el conejo. Variaciones de su título post inyección de globulina gamma propia

por

S. Erill\* y J. Gras

(Recibido para publicar el 9 de enero de 1969)

La existencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos pertenecientes al sistema de las globulinas gamma constituye un hecho conocido desde hace tiempo. El factor reumatoide, presente en el suero de individuos afectados de artritis reumatoide, representa, quizás, el más caracterizado de estos anticuerpos. Con todo, no se trata de un caso aislado, ya que anticuerpos similares pueden detectarse en el suero en diversos procesos morbosos y aun en individuos normales. El empleo de la reacción de Waaler-Rose ha permitido, además, poner de manifiesto la existencia de antiglobulinas en el suero de diversas especies animales. Así, PIKE y col. (9) demostraron que el suero normal obtenido de vacas, perros, caballos, cabras, conejos y carneros contiene antiglobulinas detectables por la reacción de Waaler-Rose. Trabajando también en este sentido, WATSON y CO-

LLINS (12) descubrieron la presencia en el suero de conejos normales de dos factores, claramente diferenciables, uno termostable (responsable de la positividad de la reacción de Waaler-Rose) y otro puesto de manifiesto por la reacción del látex y similares y que se inactiva por completo tras calentamiento a 56° C durante 14 minutos. Anticuerpos semejantes han sido también demostrados en el suero de otras especies, incluido el hombre (13, 14).

Si bien la existencia de este tipo de anticuerpos ha sido ampliamente aceptada, su significado y mecanismo de formación es objeto de discusión. Por ello nos pareció de interés estudiar el comportamiento de las antiglobulinas gamma en el conejo tras la inyección intravenosa de una cantidad sustancial de globulina gamma propia libre de desnaturalización. Creemos que las variaciones observadas en el título de las mismas en estas condiciones pueden contribuir a la comprensión del mecanismo de su formación y la existencia del equilibrio inmunológico postulado por uno de nosotros.

\* Becario de la Fundación Juan March (Becas de estudios en España) durante la realización del trabajo.

## Material y métodos

**ANIMALES.** Se estudió un total de 10 conejos. El peso de los mismos osciló entre 2,7 y 3,2 kg.

**OBTENCIÓN DE LA GLOBULINA GAMMA.** Cada animal fue sometido a una serie de sangrías (5-6 extracciones) por punción cardíaca, recogiendo un promedio de 75 a 100 ml de suero. De cada extracción se separaron, para análisis, 2 ml de suero, dedicando el resto a la preparación de la globulina gamma. Las muestras de suero se conservaron hasta el momento de su empleo a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La separación de la globulina gamma se realizó por precipitación salina mediante hiposulfito sódico (7). El precipitado fue disuelto en cada caso en unos 20 ml de agua destilada, procediéndose a continuación a la dialización del líquido de solución a través de las paredes de una bolsa semipermeable sumergida en suero fisiológico (CINa al 0,9 %). La diálisis se mantuvo durante tres días, efectuándose en cámara a  $2^{\circ}\text{C}$ . La concentración final de la solución a inyectar se determinó acudiendo a la reacción del biuret, con lectura fotométrica. La pureza de la preparación fue comprobada mediante electroforesis sobre papel y microelectroforesis en agar.

**INYECCIÓN DE LA GLOBULINA GAMMA.** La inyección intravenosa, al conejo dador, de la solución de globulina gamma propia se realizó una vez transcurrido un tiempo suficiente para que el animal se hubiera recuperado de las sangrías repetidas y se hubiesen normalizado las constantes sanguíneas. Este período de reposo osciló según los casos entre 30 y 60 días. La cantidad inyectada varió entre 0,30 y 0,41 g, siendo el promedio 0,38 g. Precediendo inmediatamente a la inyección se efectuó una extracción destinada a disponer de nuevos datos basales.

**DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE PROTEINEMIA TOTAL, ALBÚMINA Y GLOBULINA GAMMA SÉRICAS.** Fue realizada en el

suero procedente de las extracciones previas a la inyección de globulina gamma y en una serie de muestras obtenidas posteriormente. Las determinaciones se efectuaron por lectura directa refractométrica y acudiendo a la electroforesis sobre papel, ambas por triplicado.

**DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTIGLOBULINA GAMMA.** Se utilizó una técnica de aglutinación de partículas de carbón revestidas de antígeno puesta a punto por nosotros (2). La globulina gamma empleada como antígeno fue en cada caso la propia del animal. En ningún momento el sistema se mantuvo a temperaturas superiores a  $37^{\circ}\text{C}$ , con objeto de evitar la desnaturalización de la globulina gamma. La titulación se practicó mediante doble dilución con dos series intercaladas.

## Resultados

Los resultados obtenidos quedan expresados en la figura 1, en la que se recogen los valores promedio de las distintas determinaciones. Tal como puede observarse, las cifras de proteinemia, así como el título de anticuerpos antiglobulina gamma se han normalizado por completo en el momento de proceder a la inyección de la globulina gamma.

Al inyectar por vía intravenosa la solución de globulina gamma propia, se produce un fenómeno de hemodilución debido al líquido de la solución (un promedio de 22 ml sobre un peso medio por animal de 3 kg, lo que representa aproximadamente un incremento del 10 % sobre el volumen plasmático total). Tal como se indica en la figura 1, la proteinemia total sufre una caída de 55,9 a 50,3 g $^{\circ}/_{100}$ , en tanto que la albúmina pasa de 36,3 a 31,2 g $^{\circ}/_{100}$ . No obstante, en la fracción globulina gamma no se aprecian, en estos primeros momentos, modificaciones, lo cual, considerando el aumento de la volemia en este punto, supone un incremento

importante en la tasa global circulante de la misma, tal como era de esperar.

En la tercera extracción de esta fase (24 horas después de la inyección) se observa en la curva de los valores de proteinemia total y de albúmina una ligera inflexión en sentido ascendente. Tras este movimiento de equilibración persisten los valores bajos de albúmina: 28,7, 27,8 y 27,8 g % los días 2.º, 3.º y 4.º tras la inyección, respectivamente ( $p < 0,005$  en los tres casos al comparar estos valores con los anteriores a la inyección). A partir del 5.º día, la tasa de albúmina sérica inicia paulatinamente la recuperación a valores normales.

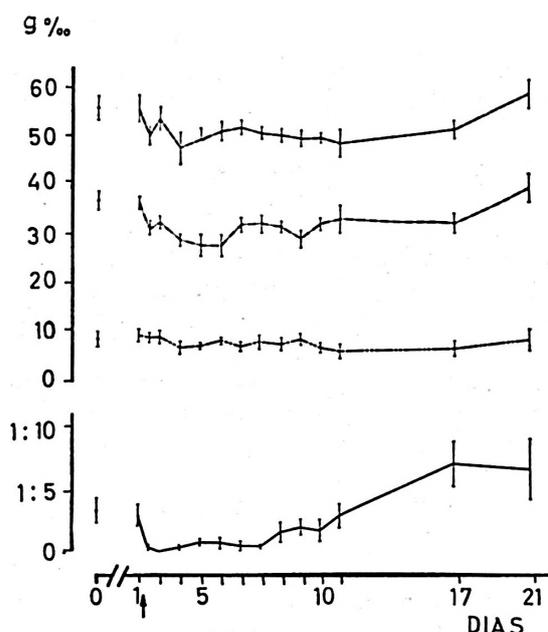


FIG. 1. La parte superior del gráfico recoge los valores de proteinemia total, albúmina y globulina gamma séricas (de arriba abajo, respectivamente) en un lote de 10 conejos, en condiciones basales y antes y después de proceder a la inyección intravenosa a cada animal de una solución de globulina gamma propia. En la parte inferior se muestran los títulos de anticuerpos antiglobulina gamma registrados. El momento de la inyección se señala por una flecha al pie. Cada punto representa la media de los datos de 10 animales  $\pm$  un error standard.

TABLA I

Valores de globulina gamma sérica en un lote de 10 conejos, inmediatamente antes y a las 24 y 48 horas de la inyección intravenosa de una solución de globulina gamma propia

Animal N.º	Globulina gamma sérica en g %		
	0 h.	24 h.	48 h.
1	11,7	13,4	11,0
2	5,9	2,1	1,9
3	9,8	11,6	3,6
4	6,7	7,5	6,0
5	6,7	5,3	1,0
6	5,8	5,0	7,2
7	7,5	6,3	6,0
8	10,5	9,5	9,0
9	19,0	17,5	16,2
10	8,6	10,5	4,0

Atendiendo a la curva de valores de la globulina gamma, hemos tratado ya de la escasa variación registrada en las dos primeras extracciones y del significado que ello encierra. Entre el primero y el segundo día postinyección se observa en la curva una disminución en las cifras de globulina gamma (de 8,9 a 6,5 g %<sub>00</sub>,  $p < 0,05$  en el test de «t» de valores pareados). Si bien este cambio puede parecer poco evidente en la gráfica promedio, se observa en todos los animales excepto uno (ver tabla I) y reviste mayor interés por el hecho de corresponder a la fase de desaparición de los anticuerpos antiglobulina gamma de la sangre circulante.

Por lo que respecta a los títulos de anticuerpos antiglobulina gamma, cabe constatar en primer lugar que todos los conejos estudiados presentan espontáneamente anticuerpos dirigidos contra su propia globulina gamma (título promedio en las extracciones iniciales 1:3,4). La inyección de una cantidad importante de globulina gamma (promedio 0,38 g) determina una caída brusca de los anticuerpos circulantes, de tal modo que éstos desaparecen prácticamente. En efecto, a las 12 horas

de la inyección, el título desciende a 1:0,3 ( $p < 0,01$  al compararlo con los valores previos a la inyección) pasando a cero al día siguiente y de nuevo a 1:0,3, 24 horas más tarde ( $p < 0,005$  y  $p < 0,01$ , respectivamente, al comparar estos títulos con los datos basales). Esta situación persiste durante cuatro días más (títulos de 1:0,7, 1:0,6, 1:0,4 y 1:0,3 en las sucesivas extracciones cada 24 horas,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,02$  y  $p < 0,05$ , respectivamente al compararlos con los valores previos a la inyección), iniciándose a partir del sexto día post-inyección una paulatina recuperación, que tiene como notable consecuencia un aumento final del título de anticuerpos antiglobulina gamma con respecto al existente en el momento anterior a la inyección. Así, el título al cabo de 17 días se hace de 1:7,3 ( $p < 0,05$  en comparación con el valor inicial).

### Discusión

El aumento brusco del volumen plasmático producido por el líquido de la solución de globulina gamma determina lógicamente una disminución de los valores de proteinemia total, así como de la tasa de albuminemia. La persistencia de cifras de albúmina por debajo del nivel inicial, al tercer y cuarto días, cuando se ha producido ya una redistribución de líquido y proteínas entre los espacios intra y extravascular podría explicarse, quizás, considerándola como un mecanismo de compensación destinado al mantenimiento de la osmolaridad plasmática. No obstante, atendiendo a la curva de valores de globulina gamma, no se observa prácticamente variación, lo que si por una parte permite suponer un aumento inicial de los mismos enmascarado por el incremento de la volemia, por otra, hace inverosímil la hipótesis de que la hipoalbuminemia sea simplemente un mecanismo de compensación. El fenómeno de la disminución de las cifras de albúmina en los estados

que cursan con hipergammaglobulinemia es conocido desde hace tiempo, habiendo sido atribuido a un descenso en la producción de albúmina ante la situación de un mayor requerimiento de aminoácidos para la síntesis de globulina gamma. En nuestro trabajo hemos podido comprobar que, tal como había sido observado por otros autores (11), este fenómeno se da aun en el caso de que la hipergammaglobulinemia no sea debida a un incremento en la síntesis de la misma.

La constatación de la existencia en el conejo de anticuerpos dirigidos contra su propia globulina gamma reviste notable interés. Si bien su presencia había sido ya comprobada, es remarcable la detección de los mismos empleando como antígeno globulina gamma propia y una técnica en la que se evita al máximo cualquier desnaturalización. En el presente estudio hemos podido demostrar, por otra parte, la inmediata desaparición de estos anticuerpos de la sangre circulante al inyectar una solución de la propia globulina gamma. Ello daría lugar a la formación de complejos antígeno-anticuerpo, de elevado peso molecular, que serían rápidamente retirados de la circulación y explicaría la inflexión negativa en la curva de valores de la globulina gamma. Cabe señalar, además, en este punto, la perfecta tolerancia que presentan los animales a la inyección intravenosa de la globulina gamma obtenida por precipitación mediante hiposulfito sódico, en contraste con lo que se observa cuando se utilizan preparados en los que se ha acudido al fraccionamiento proteico por otros procedimientos. Por último, queda por señalar el notable fenómeno del aumento del título de anticuerpos por encima de los valores basales.

Uno de nosotros ha demostrado que la estimulación antigénica persistente y a nivel constante comporta una inhibición de la formación de anticuerpos, inhibición que puede establecerse a nivel cero o bajo de anticuerpos circulantes (3, 5, 8). El animal en estas condiciones de inhibición res-

ponde a un aumento brusco de la dosis de estímulo antigénico (6, 8), de aquí que se ha postulado la existencia de un equilibrio inmunológico entre estímulo antigénico persistente a nivel constante y respuesta en anticuerpos (4). Como este equilibrio es específico para el antígeno que se encuentra en estas condiciones de estímulo persistente a nivel constante, cesa al cesar en dicha estimulación persistente, se rompe por un cambio en la intensidad del estímulo, y no presenta las características de los estados de homeostasis inmunológica anticuerpo-dependientes o por agotamiento de las células antígeno-sensibles, es lógico aceptar que se trata de un estado de homeostasis inmunológica antígeno dependiente.

Los antígenos circulantes, como las proteínas plasmáticas, y los de los hematíes, las plaquetas y los leucocitos (en los que se encuentran antígenos de histocompatibilidad, [1]) estimulan al sistema de células inmunocompetentes de una manera persistente y a un nivel muy constante desde el período embrionario o perinatal, por lo que el organismo debe encontrarse frente a los mismos en este estado de equilibrio inmunológico, es decir, de homeostasis inmunológica antígeno-dependiente, habitualmente a un nivel cero de anticuerpo circulante. En algún caso, como probablemente el de las crioautoaglutininas normales, que se encuentran a un título alrededor del  $\frac{1}{2}$  y que corresponden a un autoanticuerpo antiantígeno I, antígeno que tiene la particularidad de madurar más tardíamente, en período postnatal, que los restantes antígenos hemáticos, el equilibrio no se establece a nivel cero, sino a un nivel muy bajo de anticuerpos circulantes. Un caso parecido podría ser el de los anticuerpos normales antiglobulina gamma, como éstos del conejo que estamos estudiando. La interpretación de las oscilaciones después de la administración de una cantidad considerable de la propia globulina gamma sería la de que inicialmente se produce la forma-

ción de complejos antígeno anticuerpo con retirada de los mismos de la circulación, lo que correspondería a la fase de descenso del título que ya hemos comentado, con la consecuencia final de que el equilibrio inmunológico se estableciese posteriormente a un nivel superior al inicial, después de este aumento brusco del estímulo antigénico. Es lógico pensar que ulteriormente vuelva a situarse a los niveles iniciales; estas oscilaciones serían precisamente un dato más en favor de la existencia de este equilibrio inmunológico entre estímulo antigénico persistente y respuesta en anticuerpos.

NACHTIGAL y col. (10), basados en su observación de que la tolerancia inmunológica a una proteína puede romperse por la inyección de la misma copulada a un hapteno, examinan la posibilidad de producir autoanticuerpos antialbúmina en el conejo, inyectando al mismo sulfanil-albúmina de conejo. Administran intravenosamente seis inyecciones de 17 mg cada una, a intervalos de 14 días, y una final, intramuscular, con adjuvante de Freund; no observan ninguna diferencia en la curva de eliminación de albúmina de conejo marcada con  $P^{32}$  entre estos animales y un lote normal de conejos. La rotura del equilibrio inmunológico en las condiciones estudiadas hasta ahora se produce por la administración de una dosis 10 veces superior a la que mantiene el equilibrio (6, 8) y los resultados que hemos expuesto con la globulina gamma lo han sido por la inyección de una dosis de 300 a 400 mg de esta globulina, por lo que el resultado negativo de estos autores parece natural, ya que inyectan dosis muy pequeñas y a intervalos grandes.

### Summary

#### Evolution of the Titer of Anti-Gamma Globulin Antibodies in the Rabbit, After Injection of Antologous Gamma Globulin

The normal existence of anti gamma globulin antibodies has been described in several animal species, including man.

In a series of ten rabbits we found an average value of 1:3.2, as determined by an agglutination technique using charcoal particles as inert material. Following this baseline determination, the rabbits were bled at intervals and gamma globulin from each animal was obtained by means of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  precipitation. After a rest period (30 to 60 days) and upon the recovery of normal plasma protein values, each animal was injected with its own gamma globulin, dissolved in 20 ml of saline. The amount injected varied between 0.30 and 0.41 g.

Twelve hours after the injection, the plasma protein values showed a decrease from 55.9 to 50 g $^{\circ}/_{100}$ , with a decrease from 36.3 to 31.2 g $^{\circ}/_{100}$  in the albumin fraction. This could be expected in view of the 10 per cent increase in the plasma volumen produced by the injection of a gamma globulin solution. Remarkably, no changes were observed in the gamma globulin levels. It can be assumed that a true increase in the amount of circulating gamma globulin had taken place, this increase being counterbalanced by the accompanying hemodilution (fig. 1). Twenty four hours after the injection, the values of total protein and albumin showed a trend towards normalization (probably due to a fluid equilibration involving the extravascular space). This trend was, however transient the recovery being really initiated by the 5th day post-injection.

Between the first and second day after injection, a slight decrease (from 8.9 to 6.5 g $^{\circ}/_{100}$ ) was observed in the gamma globulin values ( $p < 0.05$ ). Concomitantly, there was a sudden fall in the titer of anti gamma globulin levels. From the sixth 1:0.3;  $p < 0.01$ , and to zero and 1:0.3, 24 and 48 hours after the injection;  $p < 0.005$  and  $p < 0.01$  respectively). This coincided with a slight decrease in the gamma globulin levels. From the sixth day on, after the injection, a slow but consistent increase in the titer of antibodies took place. Seventeen days after the in-

jection the titer was clearly higher than originally: 1:7.3 ( $p < 0.05$ ).

The existence of anti gamma globulin antibodies in the normal rabbit is verified. Their quick disappearance after the administration of a considerable dose of auto gamma globulin to the animal may be explained on the basis of the formation of antigen-antibody complexes, rapidly removed from the circulation. This interpretation is strengthened by the observed simultaneous decrease (significant though slight) of plasma gamma globulin. The presence of anti gamma globulin antibodies, as well as the remarkable increase over the initial value, as shown in this study, may be explained by the existence of an antigen-dependent homeostasis, an immunologic equilibrium between persistent antigenic stimulus and antibody response, as postulated by one of us (Gras).

Previous experiments have shown that a persistent antigenic stimulation at a constant level produces an inhibition of antibody formation; this inhibition being established at low or zero level of circulating antibodies. In these conditions of inhibition, the animal is still able to respond to a sudden increase in the dose of the antigenic stimulus. These experiments led to the postulation of the existence of an immunologic equilibrium between antigenic stimulus and antibody response, since this equilibrium is reached specifically for the antigen in a situation of persistent stimulus at a constant level, ends when this persistent stimulus ceases, and it is broken by a change in stimulus intensity. Thus, this equilibrium does not show the features of the states of antibody-dependent immunologic homeostasis or of non response by exhaustion of antigen-sensitive cell. It must be, therefore, an antigen-dependent state of immunologic homeostasis.

Circulating antigens, like plasma proteins and those of erythrocytes, platelets and leukocytes (in which are found antigens of histocompatibility) stimulate the

immunocompetent cell system in a persistent manner at a very constant level since the embryonic or perinatal period. Thus, the organism is, as far as they are concerned, in this state of immunologic homeostasis, habitually at a zero level of circulating antibody (or in some cases at a low level). An example of this situation can be found in the normal cold agglutinins. These are anti antigen I autoantibodies and in normal individuals they are found in titers around 1:2. The antigen I presents the peculiarity of maturing in the postnatal period, contrary to the other hematic antigens. This study could provide a similar example. The changes in the titer after administering a considerable quantity of auto gamma globulin would be explained as resulting from the formation of antigen-antibody complexes (phase of decrease in the titer) and the establishment of an immunologic equilibrium at a higher level than initially (consecutive to a sudden increase in antigenic stimulus). It may be logically assumed that the titer will return afterwards to the initial levels (as suggested by Fig. 1).

The observed changes further support the existence of an immunologic equi-

brium between persistent antigenic stimulus and antibody response.

### Bibliografía

1. DAUSSET, J.: *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, **11**, 777, 1966.
2. ERILL, S.: *Tesis Doctorado Medicina*. Barcelona, 1967.
3. GRAS, J.: *Rev. Immunol.*, **24**, 354, 1960.
4. GRAS, J.: *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.* En prensa.
5. GRAS, J.: y DALMAU, M.: *Rev. Clin. Esp.*, **96**, 90, 1965.
6. GRAS, J. y DALMAU, M.: *Nature*, **210**, 430, 1966.
7. GRAS, J. y SALAZAR, M.: *Plasma*, **2**, 1, 1954.
8. GRAS, J. y WOESSNER, S.: *Path. Microb.*, **26**, 439, 1963.
9. PIKE, R. M., SULKIN, S. E. y COGGESHALL, H. C.: *J. Immunol.*, **66**, 107, 1951.
10. NACHTIGEL, D., ESCHEL-ZUSSMAN, R. y FELDMAN, M.: *Immunology*, **9**, 543, 1965.
11. ROTHSCHILD, M. A., ORATZ, M., MONGELLI, J. y SCHREIBER, S. S.: *J. Lab. Clin. Med.*, **66**, 733, 1965.
12. WATSON, R. y COLLINS, N. M.: *J. Immunol.* **90**, 238, 1963.
13. WATSON, R. y MIMS, G. R.: *J. Immunol.*, **94**, 184, 1965.
14. WATSON, R.: *J. Immunol.*, **91**, 243, 1963.