

BIBLIOTECA IBYS DE CIENCIA BIOLÓGICA

*

R. DOERR

Las investigaciones sobre inmunidad

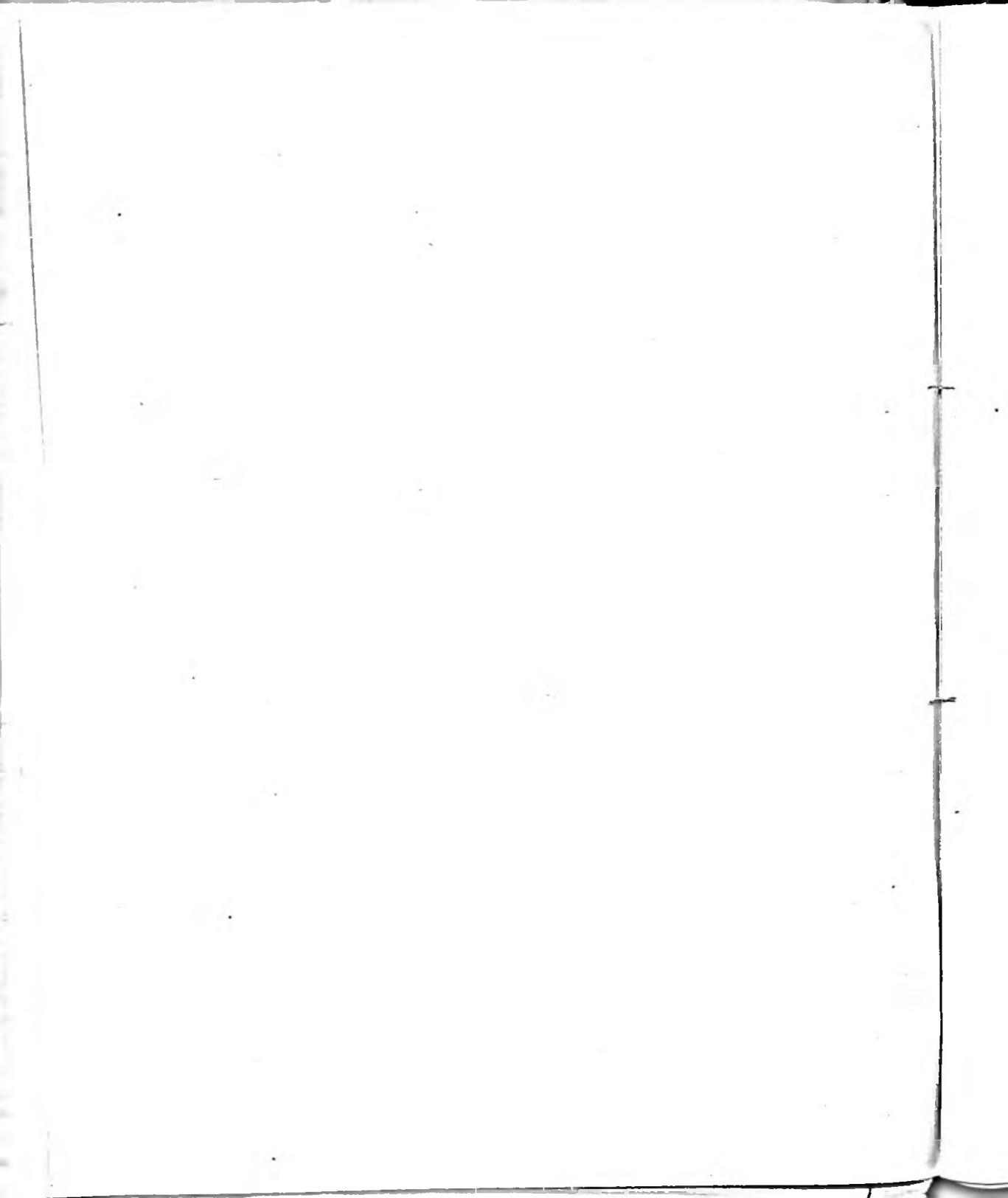
TOMO CUARTO

LOS ANTICUERPOS

SEGUNDA PARTE



Revista de Occidente
MADRID



B I B L I O T E C A I B Y S



D E C I E N C I A B I O L Ó G I C A

2 Y 8 1 4 3 5 T O I 2 5 1 2

10

10

DE CIENCIA BIOLÓGICA

SOBRE INMUNIDAD LAS INVESTIGACIONES

RECORDOS EN MONOGRAFÍAS
RESUMENES Y PROBLEMAS

Profesor R. DOERF
Londres

LAS INVESTIGACIONES SOBRE INMUNIDAD
(TOMO CUARTO)

LOS ANTICUERPOS
(SEGUNDA PARTE)

EL COMPLEMENTO

LOS ANTIGENOS

LOS ANTICUERPOS

(SEGUNDA PARTE)

LAS INVESTIGACIONES SOBRE INMUNIDAD

RESULTADOS Y PROBLEMAS
RECOGIDOS EN MONOGRAFIAS

DIRIGIDAS POR EL
PROFESOR R. DOERR
Basilea

LAS INVESTIGACIONES SOBRE INMUNIDAD
(TOMO PRIMERO)

TOMO PRIMERO
LOS ANTICUERPOS
(PRIMERA PARTE)

TOMO SEGUNDO
EL COMPLEMENTO

TOMO TERCERO
LOS ANTIGENOS

TOMO CUARTO
LOS ANTICUERPOS
(SEGUNDA PARTE)

LOS ANTICUERPOS

(SEGUNDA PARTE)

Introducción.—Nuevas investigaciones sobre la formación de las globulinas inmunes.—Anticuerpos naturales.—Conclusión.

POR

R. DOERR

Basilea

Traducción de la edición original alemana por

F. CORDÓN

Jefe del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Ibya

Revista de Occidente

Bárbara de Braganza, 12

Madrid

LOS ANTICUARIOS

(SEGUNDA PARTE)

Los Anticuarios, obra de los señores D. Juan de Dios...

194

DE LOS ANTICUARIOS

Madrid

Copyright by
IBYS, S. A.
Madrid 1963

Revista de Occidente
Distribución de Boletines, etc.

Imp. Viuda de Gale Sáez, Mesón de Paños, 6. Tel. 21-19-44. Madrid.

En la Biblioteca Ibys de Ciencia Biológica nos proponemos editar una serie de obras en que se recojan las disciplinas fundamentales de las ciencias biológicas

Sólo se incluirán tratados de máxima autoridad, que, además, expongan con todo rigor crítico el estado actual de la pertinente rama científica, de modo que los conceptos e hipótesis no aparezcan desvinculados de los hechos que han forzado su nacimiento, y así el lector estudioso pueda penetrarse fácilmente del grado de certidumbre y generalidad de las teorías vigentes.

En definitiva, la Biblioteca Ibys constará únicamente de obras que, por lo científico de su exposición (purgada en lo posible del dogmatismo casi inevitable en los manuales de texto), descubran, entre el cúmulo de adquisiciones objetivas, los problemas que esperan solución del investigador atento y libre de prejuicios. Esperamos contribuir con ella a desarrollar entre nosotros la afición por la experimentación biológica, y a ayudar a que Médicos, Farmacéuticos, Veterinarios, Naturalistas, Ingenieros Agrónomos, etc., puedan elevar hasta una consideración científica los problemas que les plantea la práctica diaria.

Las dos empresas que aúnan sus esfuerzos en esta Biblioteca han sentido su necesidad desde puntos de vista muy distantes, pero convergentes, y esperan interesar en ella a un círculo de lectores escogidos, cada vez más amplio.

REVISTA DE OCCIDENTE.

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y SUEROTERAPIA
IBYS

... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..

INDICE

	PÁGS.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO PRIMERO.—Nuevas investigaciones sobre la formación de las globulinas inmunes	2
a) La teoría de L. Pauling y la obtención, basada en ella, de anticuerpos específicos <i>in vitro</i>	2
b) Investigaciones de J. Loiseleur sobre la función antigénica de sustancias de muy pequeño peso molecular.....	8
CAPÍTULO II.—Las acciones hemaglutinantes de los virus.....	19
CAPÍTULO III.—Los anticuerpos naturales	31
1. Nombres y conceptos	31
2. Las propiedades de los anticuerpos naturales.....	32
a) La composición química	32
b) Termolabilidad	33
c) La avidez de los anticuerpos normales.....	39
d) La especificidad de los anticuerpos normales.....	41
e) La aparición de anticuerpos normales en la sangre.....	50
f) Lugar y modo de producción de las globulinas inmunes.....	58
g) La persistencia de los anticuerpos naturales en la sangre circulante	77
3. Las categorías de los anticuerpos naturales y los modos de producirse	81
A. Las isoaglutininas	82
a) Las isoaglutininas en el suero sanguíneo del hombre.....	82
α) Las isoaglutininas del sistema A-B.....	82
β) Las isoaglutininas del sistema M-N.....	109
γ) Las isoaglutininas en el sistema P-Q.....	111
δ) La aglutinina del factor Rh.....	114
ε) Resumen de los datos acerca de la existencia de diversas isoaglutininas en el suero del hombre, en condiciones fisiológicas y después de estímulos inmunizantes... ..	117
ζ) Causas de error en la determinación de los grupos sanguíneos y de las isoaglutininas.....	118

	<u>PÁGS.</u>
b) Las isoaglutininas de los animales.....	125
a) Monos	125
β) Otros mamíferos	133
B. Las heterohemaglutininas y heterohemolisinas naturales.....	135
a) Hombre (hemaglutininas normales y patológicas con atención especial a las aglutininas para los hema- tíes de carnero).....	135
β) Los animales	155
C. Los anticuerpos antibacterianos de los sueros animales normales.	157
D. Las antitoxinas de los sueros normales.....	169
a) Antitoxina diftérica en el suero normal.....	170
a) Sueros animales	170
β) Sueros humanos	176
b) Antitoxina tetánica en el suero normal.....	201
a) Sueros animales	201
β) Suero humano	203
c) Pluralidad de las antitoxinas existentes en el suero normal de una especie animal	207
E. Autohemolisinas. La hemoglobinuria por frío.....	209
F. Las hemaglutininas en frío	215
G. La congulinina	230
CONCLUSIÓN	243
BIBLIOGRAFÍA	245
INDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS	267

INTRODUCCION

Preñados de problemas en pleno debate se nos ofrecen los resultados de la investigación de aquellas sustancias, de tipo de anticuerpo, que se descubren en el suero del hombre y de los animales sin que su formación se pueda atribuir con seguridad a un estímulo antigénico específico. Ya resulta difícil decidir si este rasgo negativo sólo se debe al desconocimiento de la historia del individuo que las posee, o si, en determinados casos, existe en realidad una producción de anticuerpos independiente de todo estímulo antigénico específico; este campo se complica, además, en su aspecto puramente fenológico, por la inabarcable multiplicidad de los antígenos que pueden hacerse reaccionar con estos anticuerpos naturales, y por la diversidad de las funciones que quepa atribuir a éstos, por una parte, en el mantenimiento de la salud y, por otra, como factores patogénicos. A lo anterior hay que sumar la necesidad de establecer siempre una relación con un anticuerpo obtenido por vía inmunizatoria, con el que el anticuerpo natural posea en común tanto la afinidad específica con respecto a la sustancia designada como antígeno, como el tipo de las reacciones de ambos con ella.

El volumen que sigue se plantea la tarea de considerar críticamente el cúmulo de resultados que ha alumbrado la investigación sobre estos anticuerpos naturales y las teorías e hipótesis derivadas de tales resultados; hemos procurado liberar la exposición, en lo posible, del lastre de particularidades que dificulten la visión de conjunto, con el fin de no impedir que el lector con espíritu crítico ejercitado pueda formar su propia composición de lugar, sino, por el contrario, se sienta estimulado a hacerlo.

Desde la aparición de *Los Anticuerpos (Primera parte)* (tomo I de "Las investigaciones sobre inmunidad"), han aparecido algunos trabajos importantes que se refieren a los anticuerpos obtenidos por vía inmunizatoria y a las acciones hemaglutinantes de los virus. Los apartados dedicados a estas cuestiones corresponden al tema de dicho volumen.

CAPÍTULO PRIMERO

NUEVAS INVESTIGACIONES SOBRE LA FORMACION DE LAS GLOBULINAS INMUNES

a) *La teoría de L. PAULING y la obtención basada en ella de anticuerpos específicos "in vitro".*

Como se expuso en el volumen I de este tratado (véase págs. 69 y siguientes), L. PAULING defiende el punto de vista de que los anticuerpos poseen las mismas cadenas de polipéptidos que las globulinas normales, y sólo se distinguen de ellas porque en la molécula de los anticuerpos las cadenas están arrolladas de otro modo, es decir, que durante la síntesis de las globulinas se pliegan bajo la influencia del antígeno existente en la célula sintetizadora de un modo enteramente particular; a este plegamiento y a la situación por él condicionada de determinados grupos de las cadenas de polipéptidos en la superficie de la molécula del anticuerpo atribuye la afinidad específica de éste con el antígeno [L. PAULING (1940)].

Esta hipótesis se intentó comprobar experimentalmente por L. PAULING y H. CAMPBELL (1942 a, b); para ello mezclaron globulina y de suero de vaca con un hapteno (colorantes azoicos de alto peso molecular, el polisacárido específico de los neumococos del tipo III), calentaron la mezcla a 57-65° y después la dejaron enfriar lentamente; en otros ensayos alcalinizaron tales mezclas y restablecieron la neutralidad inicial paulatinamente. Suponían que las globulinas normales se desplegarían a consecuencia del influjo desnaturizante, y que cuando éste desapareciera o dejara de actuar, la molécula volvería a adquirir la configuración esférica, pero de un modo distinto condicionado específicamente por la presencia del hapteno. El resultado pareció justificar estas agudas previsiones, pues las mezclas frías o neutralizadas provocaron, efectivamente, precipitados con los haptenos y, en el caso del polisacárido del neumococo, incluso una agluti-

nación con el neumococo del tipo III, comportándose, pues, como anticuerpos floculantes.

D. K. BACON (1943) confirmó esta posibilidad de obtener anticuerpos en el tubo de ensayo. Utilizó plasma sanguíneo de vaca (vuelto incoagulable por la adición de citrato) y observó que la dehidrogenación del plasma en condiciones apropiadas, que puede provocar una elevación del pH desde 6,9 a 9,1, resulta especialmente apropiada para conseguir las transformaciones de las proteínas del plasma en anticuerpos artificiales. No ha llegado a mi noticia de que otro autor, aparte de BACON, haya podido reproducir con el mismo resultado las experiencias de PAULING y CAMPBELL. Por el contrario, otros experimentadores obtuvieron resultados completamente negativos y pudieron incluso explicar, en parte, a qué se debían las precipitaciones observadas por PAULING y CAMPBELL.

PAULING y CAMPBELL utilizaron para algunos de sus experimentos un colorante que contiene tres grupos de ácido azofenilarsónico combinados con una molécula de resorcina. Los conejos que se inmunizan con un colorante copulado con una proteína rinden antisueros que reaccionan enérgicamente con el colorante, formando precipitados específicos. PAULING y CAMPBELL mezclaron la globulina del suero de vaca con el colorante, abandonaron la mezcla varios días a 57° y separaron el colorante excedente (que podía pasar por una membrana de celofán) por diálisis; por la adición al preparado así obtenido del mismo colorante que se copuló a la ovalbúmina, PAULING y CAMPBELL obtuvieron precipitados, pero que no aparecían a reacción neutra, sino a un pH algo menor de 6,0. Los autores consideraron estos precipitados como una demostración de la obtención *in vitro* de un anticuerpo. F. HAUROWITZ (1936), sin embargo, había observado mucho antes que las azoproteínas dan con las seroglobulinas normales precipitados a un pH entre 3 y 5, y al comprobar el experimento citado de PAULING y CAMPBELL, se convenció de que la azoproteína sintetizada a partir de ovalbúmina y de ácido p-fenilarsónico precipitaba también con globulinas *normales* de suero de vaca. La reacción debe, pues, atribuirse a que la azoalbúmina contiene grupos con carga negativa, y la proteína (globulina), grupos con carga positiva, y por su combinación "salina" se producen sustancias que precipitan. La pretensión de PAULING y CAMPBELL de haber conseguido *in vitro* anticuerpos por el método descrito debe rechazarse si se considera este experimento de comprobación [F. HAUROWITZ, P. SCHWERIN y SAIDE TUNÇ (1946)]. En su obra *The purification and formation of antibodies* (1946-47), HAUROWITZ insiste en lo inespecífico de las

precipitaciones de la azoproteína constituida por ovalbúmina y ácido fenilarsónico por proteínas, y hace constar, apoyándose en experimentos comparativos efectuados por PAULA SCHWERIN y SAIDE TUNÇ con proteínas purificadas, que la γ -globulina del suero de vaca utilizada preferentemente por PAULING y CAMPBELL da un precipitado fuerte a pH 5,5, mientras que la pseudoglobulina y la ovalbúmina sólo precipitan a una reacción más ácida (5,3 y 4,7, respectivamente). Estas diferencias son debidas a los puntos isoeléctricos de las proteínas; la globulina γ , cuyo punto isoeléctrico está a un pH 6,0, es la más básica de las tres proteínas citadas, por lo que puede precipitar a un pH más elevado que las otras dos. Como esta γ -globulina se ha aislado del suero sanguíneo normal de una vaca que nunca pudo haber estado en contacto con sustancias que contuvieran el radical de ácido fenilarsónico, la precipitación no puede de ningún modo atribuirse a efecto de anticuerpos.

PAULING y CAMPBELL desnaturalizaron también seroglobulinas en presencia de azul de metileno por álcali diluido; el álcali se separó por diálisis, con lo que se regeneró parte de la proteína que, aunque no precipitaba con el azul de metileno, podía combinarse con él. Tampoco este experimento pudo confirmarse por dos colaboradores de HAUROWITZ (PAULA SCHWERIN y PERO KARA). El azul de metileno del comercio no contiene ácido fenilarsónico, sino ácido fenilsulfónico, y no posee siempre la misma composición química. Las muestras de azul de metileno utilizadas por PAULING y CAMPBELL pueden no haber sido enteramente idénticas a las empleadas por SCHWERIN y KARA, lo que debe tenerse en consideración, como HAUROWITZ hace ver imparcialmente al enjuiciar los resultados contradictorios.

En una forma mucho más decisiva se han pronunciado, por último, A. M. KUZIN y N. A. NEVRAEVA (1947), tanto contra PAULING y CAMPBELL como contra D. K. BACON. El autor no ha podido hacerse con el original del trabajo ruso, teniéndose que contentar con la breve referata de H. PRIESTLEY, que reproducimos traducida con la mayor exactitud posible: "Al repetir los experimentos de PAULING y CAMPBELL y los de BACON, en ocasiones en forma variada, no ha podido nunca observarse formación de anticuerpos. La producción de un anticuerpo contra un polisacárido del neumococos del tipo III que describen PAULING y CAMPBELL no se ha observado al repetir el experimento con otros polisacáridos (goma arábiga, polisacáridos disintéricos del *Shigella dysenteriae*, *Shigella paradysenteriae* Flexner y *Streptococcus hemolyticus*); se obtuvieron preparados por contacto prolongado de globulina γ con distintos antígenos a una temperatura

de 57°, sin que se observara en la disolución ningún anticuerpo, y lo mismo sucedió al operar con colorantes. Sólo se apreció una modificación de la naturaleza de la proteína al trabajar con azul de metileno. En otros experimentos con polisacáridos la proteína separada del preparado carece de propiedades de anticuerpo; tampoco pudo observarse ninguna formación de antitoxina por deshidratación de seroproteínas en presencia de toxina diftérica. El problema de la obtención de anticuerpos *in vitro* sigue sin resolver."

Como las publicaciones de los autores que han impugnado las pretensiones de PAULING de haber obtenido por sus métodos anticuerpos *in vitro* no han aparecido hasta los últimos tiempos, no puede considerarse la cuestión como definitivamente resuelta. Si, como parece indudable, los impugnadores de PAULING tuvieran razón, también vacilaría la hipótesis de este autor, según la cual las globulinas inmunes específicas sólo difieren de la seroglobulinas normales por el modo de estar dispuestas las cadenas de polipéptidos en la molécula proteica. Consecuencia que ya deduce F. HAUROWITZ en la comunicación citada, e indica que parece muy probable que los anticuerpos, como otras moléculas proteicas, se formen en el organismo por la condensación de aminoácidos o de péptidos sencillos, y que su adaptación estructural a un determinado grupo del antígeno se efectúe durante su síntesis y no por una reagrupación ulterior. HAUROWITZ no menciona las importantes investigaciones de R. SCHÖNHEIMER, S. RATNER, D. RITZENBERG y M. HEIDELBERGER (1942), que establecieron con seguridad la síntesis de las globulinas inmunes a partir de los aminoácidos procedentes de las proteínas de los alimentos; aspecto del problema que puede considerarse como resuelto sin necesidad de ulterior discusión. Sin embargo, continúa tan enigmática como antes la *adaptación estructural a los determinantes del antígeno*. El hecho de que las globulinas inmunes no puedan distinguirse de las normales del mismo suero sanguíneo, ni desde el punto de vista químico ni serológico (no presentan carácter de antígenos, es decir, de seroproteínas extrañas), fué el motivo que inspiró a PAULING su hipótesis de los plegamientos. Pero si se admite que bajo la influencia de los antígenos los aminoácidos se agrupan de modo distinto en las células sintetizadoras de las globulinas, queda sin explicar la identidad química y serológica entre globulinas inmunes y normales. Sin embargo, K. LANDSTEINER y J. VAN DER SHEER (1932, 1934, 1939) indican que la especificidad de los péptidos de bajo peso molecular depende, en primer lugar, de la naturaleza de los aminoácidos terminales que tienen libre el grupo carboxilo y, en segundo lugar, de la naturaleza química de los otros

aminoácidos que constituyen la cadena y que en los *tri* y *pentapéptidos* constituidos *exclusivamente* por leucina y glicina, basta un fuerte desplazamiento de un aminoácido en la molécula para provocar una modificación de la especificidad.

Resulta, pues, completamente impreciso lo que hay que entender por adaptación estructural de una globulina a los determinantes de un antígeno, y, por consiguiente; de la misma imprecisión ha de sufrir toda opinión acerca del modo de reaccionar una "globulina adaptada" con su antígeno. Según PAULING (1945), las reacciones serológicas están condicionadas por fuerzas débiles (fuerzas de VAN DER WAALS, enlaces de hidrógeno, atracción entre átomos con cargas eléctricas contrarias) cuya energía no llega a 10 kilocalorías por molécula; estas fuerzas no son en sí mismas específicas, sino que la afinidad específica sólo se produce cuando las moléculas que se ponen en contacto poseen una estructura "complementaria", es decir, cuando sus estructuras superficiales se completan mutuamente. Como esta "complementariedad" puede extenderse a una zona mayor o menor de la superficie de ambas moléculas (antígeno y globulina inmune), la especificidad de las reacciones unas veces es más acusada y otras lo es menos. Lo que PAULING intentó expresar en palabras y representó después por fórmulas químicas, F. HAUROWITZ (1946/47) procura concretarlo mediante símbolos esquemáticos, cuyo efecto sugestivo era bien conocido desde los tiempos de P. EHRLICH. Como ejemplo elige un antígeno obtenido por yodación de la ovalbúmina y copulación subsiguiente con un ácido aminofenilarsónico diazotado, antígeno que tendría por consiguiente tres determinantes, a saber: diyodofenol, ácido p-fenilar-sónico y ovalbúmina. Según las ideas de HAUROWITZ, no es de esperar la formación de un anticuerpo adaptado idealmente a la estructura de este antígeno, porque los elementos estructurales de la globulina-anticuerpo, es decir, sus cadenas peptídicas, no pueden deformarse ilimitadamente; pero los anticuerpos que, en efecto, se producen pueden estar mejor o peor adaptados, y es evidente que, cuanto mejor lo estén, se combinarán con mayor fuerza con el antígeno. Los símbolos esquemáticos y su comentario descubren que también HAUROWITZ entiende que se produce una transformación complementaria de la superficie de las moléculas de los anticuerpos, *transformación que sólo se acusa en contacto con el antígeno*.

La primera fase de toda reacción entre antígeno y anticuerpo, a saber, la combinación del anticuerpo con su antígeno, se efectúa, sin embargo, en general con gran velocidad, quedando terminado en el transcurso de un minuto y en ocasiones de pocos segundos [H. W.

CROMWELL (1922), TH. MADSEN y S. SCHMIDT (1929), U. FRIEDEMANN y B. ZUGER (1939), M. HEILDELBERGER, H. P. TREFFERS y M. MAYER (1940)]. Según los datos de M. MAYER y M. HEILDELBERGER (1942), la reacción entre los polisacáridos bacterianos y sus antisueros, a 0°, se efectúa en un 90 por 100 al cabo de tres segundos, y también es inmediata la contracción del útero aislado de cobayo sensibilizado cuando a la disolución en que está suspendido se adiciona el antígeno [H. DALE (1913); consúltese también R. DOERR (1929 b, 654)]. Esta unanimidad de datos en lo que concierne a lo rápido de la reacción no señala la existencia de fuerzas débiles sólo capaces de actuar a distancias cortas. Por otra parte, A. ROTHEN (1945), después de experimentos interesantes [véase R. DOERR (1947 a, página 75)], llega a la conclusión de que los anticuerpos pueden actuar sobre el antígeno sin necesidad de ponerse en contacto directo con él, es decir, a distancia, y de que el campo de fuerza existente entre ambas moléculas no se limita a un radio de acción de pocos \AA , sino de cientos de ellos. A. ROTHEN (1946) también considera probable, como conclusión de experimentos análogos, que los fermentos ejerzan una acción a distancia. Para ello utilizó películas de seroalbúmina de vaca en varias capas superpuestas depositadas sobre superficies metálicas pulimentadas. Las disoluciones de tripsina cristalizada destruyen estas películas en breve tiempo. Sobre la seroalbúmina descrita extendió una capa de "Formwar" (un polímero de formaldehidopolivinilo) de modo que constituyera un escudo que impidiera el acceso del fermento, y demostró que hay que dar a este escudo un espesor que sea un elevado múltiplo del de las películas superpuestas de la proteína para conseguir protegerlas por completo de la demolición enzimática. Según estos experimentos, la distancia a que la tripsina puede seguir ejerciendo su efecto proteolítico parece alcanzar a varios cientos de \AA , resultados que, de confirmarse, significarían que *la actividad de un fermento no requiere el contacto directo de su molécula con la del substrato fermentescible* (1). El hecho de que los fer-

(1) F. KARUSH y B. M. STEGEL [*Science*, 108, 107 (1948)] dudan del valor demostrativo de los experimentos en que A. ROTHEN funda su teoría de las acciones específicas a distancia entre anticuerpo y antígeno. Las capas de proteína obtenidas por A. ROTHEN, aunque inicialmente sean películas monomoleculares, constituidas por moléculas proteicas completamente desplegadas, trasladadas desde superficies de agua a superficies sólidas, no poseen espesor homogéneo (y, por ello, no constituyen superficies planas) debido a que después de separadas de la superficie de agua se desecan y vuelven más o menos rugosas. Las elevaciones así producidas, que pueden alcanzar a 50-85-100 \AA ,

mentos se comporten en estas experiencias como lo hacen los anticuerpos puede deberse a errores experimentales comunes o a una interpretación equivocada del planteamiento, idéntico en ambos casos; pero, excluyendo estas posibilidades, no cabe dudar de la importancia que para la cuestión aquí tratada tiene que ambas sustancias activas se comporten del mismo modo a este respecto. Los fermentos y los anticuerpos están adaptados específicamente a sus substratos, propiedad que se hace intuitiva por la comparación de E. FISCHER con la adaptación entre la cerradura y la llave; en los símbolos de HAUROWITZ (1946/47) la combinación de un anticuerpo adaptado idealmente con el determinante del antígeno se obtiene cuando éste actúa sobre la globulina inmune como una llave mejor o peor adaptada a su cerradura. Si pudieran demostrarse con seguridad las acciones a distancia, esta comparación, junto con las figuras esquemáticas con que él la ilustra *ad usum delphini*, perdería validez y habría que sustituirla por otras concepciones. Como ROTHEN (1945) ha expresado ya en su primera publicación, la consecuencia sería que los anticuerpos y los antígenos pueden actuar uno frente a otro incluso separados por membranas naturales finas (paredes de los capilares de la sangre o de la linfa), y muchas contradicciones que pueden observarse *in vitro* e *in vivo* en las reacciones entre antígeno y anticuerpo [véase la exposición de conjunto de U. FRIEDEMANN (1947)] podrían presentarse bajo nueva luz.

b) *Investigaciones de LOISELEUR sobre la función antigénica de sustancias de muy pequeño peso molecular.*

Recordaremos que LOISELEUR, en un principio, intentó transformar antígenos proteicos de alto peso molecular (ovalbúmina y veneno de cobra) en "contraantígenos", para lo cual sustituyó por negativas las cargas positivas de los grupos existentes en la molécula antigénica, y las cargas negativas por positivas. El autor provocaba estos cambios de carga mediante agentes químicos, y de este modo preparó unos derivados de los antígenos, los "contraantígenos", que, por ser la suma de sus cargas opuesta a la del antígeno, podían anclarse en

deben surcar toda la capa protectora depositada, y tal vez sean apropiadas para fijar directamente anticuerpos, con la apariencia de acciones a distancia. La cuestión, sin embargo, no se decide en sentido negativo por esta objeción, y tanto menos cuando que aun no se ha pronunciado la contraréplica de ROTHEN.

éste, dando lugar a un complejo que floculaba por la neutralización de las cargas. El resultado correspondió a lo que se esperaba. Cuando se adiciona una disolución de ovalbúmina a otra de su contraantígeno, el aumento de tamaño de las partículas, provocado por la combinación de los dos componentes de la reacción, se traduce en un aumento de la viscosidad de la mezcla que culmina en una floculación. La reacción resulta específica. El contraantígeno de la ovalbúmina da lugar a estos fenómenos de aumento de la viscosidad y de precipitación al mezclarse con ovalbúmina, pero no con caseína, edestina o gelatina, y esta especificidad, semejante a la de un anticuerpo genuino, pudo apreciarse también entre otros antígenos y los contraantígenos respectivos [nuevas particularidades, así como los datos bibliográficos, pueden consultarse en R. DOERR (1947 a, págs. 9 y siguientes)]. El propósito que guiaba estos experimentos era conseguir artificialmente una configuración complementaria de las superficies, que permitiera que se adaptaran tan exactamente como "un objeto a su imagen en un espejo", concepción en que también se basaron L. PAULING y F. HAUROWITZ (véase pág. 8), pero con la diferencia que estos investigadores consideran el hecho de que todos los anticuerpos genuinos son globulinas, mientras que LOISELEUR considera cualquier proteína idónea para, sin necesidad de modificar esencialmente su estructura molecular, por simple modificación de sus cargas eléctricas, transformarse en su "contraantígeno". Tampoco LOISELEUR ha tenido en cuenta las pruebas numerosas de la imposibilidad de que los anticuerpos puedan producirse por transformación de los antígenos (R. DOERR, 1947 a, págs. 3 a 8), sino que por los contraantígenos, como por sus experimentos posteriores, intenta abrirse una ruta propia sin considerar resultados experimentales contradictorios. En muchas ocasiones, empresas osadas permiten adquirir conocimientos nuevos y valiosos.

En una serie de comunicaciones breves, J. LOISELEUR (1946 a, b, c, d) comunicó que por la inmunización de conejos con sustancias "orgánicas" de peso molecular muy bajo pueden conseguirse anticuerpos. Su primera tentativa afortunada se efectuó con floridicina (peso molecular = 472); pero posteriormente también consiguió inmunizar con sustancias de estructura mucho más sencilla, por ejemplo con alcohol etílico (peso molecular = 44). La técnica de la inmunización y los métodos para descubrir los anticuerpos se reunieron en un artículo de J. LOISELEUR y de M. LÉVY [Ann. Pasteur, 73. 116 (1947)].

Ante todo nos referiremos aquí a la *técnica de la inmunización*. Sólo puede conseguirse resultado positivo cuando el antígeno se in-

yecta por vía intravenosa reiteradamente y a intervalos muy cortos. El mínimo lo representan dos inyecciones diarias, y debe prolongarse este tratamiento durante diez o doce días, de modo que la cantidad total de la sustancia administrada por vía intravenosa resulta considerable (95 mg. de floridicina, 400 mg. de disulfonato de índigo, 2.000 mg. de p-aminofenilsulfamida). Cuando los antígenos sean tóxicos (alcohol, morfina) debe comenzarse, según LOISELEUR, por dosis pequeñas y elevar sistemáticamente las cantidades inyectadas, proceso que se compensa prosiguiendo la inmunización durante varias semanas; también en estos casos la cantidad total administrada debe ser grande (por ejemplo, 107,2 g. de alcohol ó 195 mg. de morfina). LOISELEUR mismo designa su proceso como una inundación continua del organismo aconsejada por la fácil difusibilidad de las sustancias de bajo peso molecular que, en oposición a los antígenos proteicos, deben separarse rápidamente de la sangre, por lo que no pueden actuar sobre ella. Opinión que parece plausible: F. HAUROWITZ, M. TUNKA y P. SCHWERIN (1943) han atribuido la fuerte capacidad inmunizante de la arsanilazoglobulina y la débil función antigénica de la arsanilazogelatina a que si se administran ambas por vía intravenosa la primera se almacena en el hígado, mientras que la segunda se elimina rápidamente por la orina de los conejos inmunizados.

Por el contrario, no puede comprenderse por qué cuando se inmuniza con determinadas sustancias de bajo peso molecular la sangre que debe suministrar el antisuero deba, aunque no siempre (véase luego), efectuarse poco después de la última inyección inmunizante. Como ya se dijo, los conejos deben recibir de 3 a 4 inyecciones diarias durante diez a doce días, a intervalos lo más regulares posibles, y la sangre debe efectuarse en la tarde de la última inyección si ésta se ha efectuado por la mañana, porque en ese momento el antisuero manifiesta un máximo de actividad específica que después pierde rápidamente [LOISELEUR (1946 a), LOISELEUR y LÉVY (1947, pág. 9)]. Ahora bien, LOISELEUR (1946 c) intenta localizar y purificar el factor activo de los antisueros por él obtenidos mediante fraccionamientos por sulfato amónico; en su mayor parte está contenido en la seudoglobulina, y en menor proporción en la euglobulina del suero, ya que ambas dan una reacción más enérgica que el suero total, mientras que la albúmina carece de efecto (véase también LOISELEUR y LÉVY, obra citada, págs. 11 y siguientes). Pero las seroglobulinas no se eliminan por la orina, y la difusibilidad de las sustancias utilizadas como *antígenos* no pueden explicar el carácter efímero de los anticuerpos por él obtenidos contra sustancias de bajo peso molecular.

Los anticuerpos con los que hasta ahora ha entendido la inmunología no son sino seroglobulinas modificadas de modo específico, pero no pierden su actividad de un día a otro, sino que, como se ha observado en investigaciones en conejos efectuadas por SCHÖNHEIMER, RATNER, RITTENBERG y HEIDELBERGER con aminoácidos isótopos, se conservan al menos tanto tiempo como duran las seroglobulinas normales, es decir, hasta ser demolidas en el metabolismo proteico (unas cuatro semanas). LOISELEUR ha subrayado repetidas veces que los resultados por él obtenidos coinciden con los fundamentales de la inmunidad clásica; aquí aparece, sin embargo, una contradicción cuyo alcance no puedo apreciar por la falta de experimentos propios, pero que quizá guarde la clave de la interpretación de tales fenómenos.

Debe subrayarse que, según los datos de LOISELEUR y LÉVY (obra citada, págs. 9 y siguientes), la alteración de la capacidad de reacción del suero resulta más estable después de la inmunización con otras sustancias de bajo peso molecular; los antisueros de conejo tratados con fenol o anilina no actúan en los días siguientes a la última inyección con más intensidad que once días después. El trabajo no da ninguna razón por qué el fenol o la anilina difieren tanto de las sustancias de efecto efímero, como, por ejemplo, la floridicina o determinados azúcares; por ello está justificado plantear si no se tratará de fenómenos de índole diversa.

Aún resulta más sorprendente y misterioso el hecho de que LOISELEUR haya obtenido con ciertas sustancias "orgánicas" resultados positivos y con otras negativos. Entre las sustancias que dan resultado positivo figuran el alcohol etílico, el ácido d-tartárico, diversos azúcares (xilosa, arabinosa, trehalosa, sacarosa, rafinosa) aminoácidos (leucina, cisteína, arginina), fenol, anilina, p-aminofenol, floridicina, morfina y otras; entre las que dan resultado negativo se cuentan el ácido l-tartárico, el ácido r-tartárico, la antipirina, piramidón y azul de metileno. LOISELEUR y LÉVY (1947) admiten en sus conclusiones (obra citada, pág. 27) que resultan particularmente activos los grupos alcohólicos y los carboxilos. Pero esta afirmación no resulta válida para la serie de sustancias que, como la anilina, actúan positivamente y se caracterizan por un efecto persistente (véase luego) que no ejercen los grupos alcohólicos ni los carboxilos. El estado actual de la investigación inmunológica no permite deducir de la estructura química de una sustancia conclusiones seguras con respecto a su comportamiento antigénico; puede, pues, decirse que con las sustancias de bajo peso molecular investigadas por LOISELEUR no hace más que repetirse la situación con que se tropezaba antes de sus trabajos. Pero

este paralelismo no es perfecto en todos los aspectos. La estructura química de las sustancias investigadas por LOISELEUR puede conocerse con cuanta exactitud permite la química moderna, y, por consiguiente, la imposibilidad de descubrir por qué el ácido d-tartárico presenta un comportamiento positivo en oposición al negativo del ácido l-tartárico, tiene distinta trascendencia que las inseguridades aparentemente análogas encontradas en sustancias de alto peso molecular, cuya estructura química se conoce de modo inseguro, como son los antígenos del viejo estilo. Es cierto que K. LANDSTEINER y M. W. CHASE (1940), GELL, HARRINGTON y RIVERS (1946) y M. W. CHASE (1947) han conseguido desencadenar la producción de anticuerpos anafilácticos y de precipitinas específicas por la inyección de sustancias químicas conocidas; pero estas sustancias, sin embargo, se caracterizan por una fuerte capacidad reaccional, que las capacita para copularse, en el organismo, con las proteínas de los animales inmunizados y adquirir, por consiguiente, la función antigénica productora de que por sí mismos carecen (véase R. DOERR, *Die Antigene*, 1948). Ahora bien, las sustancias que en los experimentos de LOISELEUR dan resultados positivos, no poseen esta propiedad; tampoco están caracterizadas por ninguna nota común, ni ellas ni las sustancias que se comportan de modo negativo.

Como ya se ha expuesto, LOISELEUR admite ahora que las sustancias del suero, de comportamiento análogo a los anticuerpos, que pueden conseguirse por la inmunización con sustancias orgánicas de bajo peso molecular, son globulinas modificadas del plasma sanguíneo de los conejos utilizados para los experimentos. La escena de esta transformación debe ser la sangre circulante, y esta concepción nos acerca a las tentativas para preparar *in vitro* sustancias del suero que se comporten como anticuerpos. Según LOISELEUR (1947), para este fin se necesita una proteína cualquiera ("*un proteide quelconque*") y una sustancia orgánica de bajo peso molecular; la proteína se adapta a la sustancia que funciona como antígeno, aunque no basta que simplemente se mezclen entre sí ambos componentes, sino que hay que producir una desnaturalización de la proteína, por ejemplo, agitar violentamente la mezcla o someterla a vibraciones ultrasónicas; la mezcla se acidula después fuertemente (pH 3), se dializa durante tres días contra un líquido exterior ácido y, por último, se alcaliniza de nuevo (pH 7,2). El producto final da con la sustancia orgánica de bajo peso molecular utilizada como antígeno la elevación específica de la viscosidad, que luego describiremos. El proceso se atribuye a que los grupos con carga eléctrica existentes en la molécula de la

proteína se encuentran en movimiento perpetuo hacia una posición central, debido a lo cual la molécula proteica posee cierto grado de plasticidad, es decir, la capacidad de reaccionar ante influjos exteriores con modificaciones propias, capacidad que se manifiesta en la fácil desnaturalización de las proteínas. Las vibraciones violentas son necesarias para obtener un resultado positivo, porque durante ellas el sistema tiende al estado de mínima energía potencial, que se realiza cuando en la molécula proteica sólo permanecen las cargas eléctricas que se contraponen a las del antígeno y ambas se ligan entre sí.

En el tratamiento del problema, así como en los métodos utilizados, LOISELEUR se aproxima en este punto a PAULING y CAMPBELL, como él mismo subraya [1947 (pág. 687)]. Ahora bien, LOISELEUR no utiliza haptenos de alto peso molecular (colorantes azoicos, polisacáridos bacterianos), sino combinaciones mucho más sencillas (rafinosa, arginina, floridicina) y desnaturaliza no por el calor o por una alcalinización fuerte, sino por acciones mecánicas. LOISELEUR (1947), por lo demás, ha ensayado las técnicas de PAULING y CAMPBELL (alcalinización fuerte de seroglobulina en presencia del antígeno) con sus sustancias orgánicas de bajo peso molecular (ácido d-tartárico, hidroquinona, ácido antranílico, xilosa, ácido salicílico, p-fenilendiamina, arginina y rafinosa), apreciando que la especificidad relativa de las reacciones se acusa claramente, puesto que la globulina desnaturalizada reacciona en general del modo más intenso con las sustancias en cuya presencia se desnaturalizó. Ahora bien, la especificidad absoluta era muchas veces escasa, es decir, que las globulinas que no se habían desnaturalizado en presencia de un antígeno, actuaban casi tan enérgicamente con él como las desnaturalizadas en su presencia. De la comunicación citada se deduce que LOISELEUR desconoce, evidentemente, las publicaciones que impugnan la fuerza demostrativa de los experimentos de PAULING y CAMPBELL (véanse págs. 3 y siguientes).

La reacción de los "anticuerpos" obtenidos *in vivo* e *in vitro* con las sustancias orgánicas de bajo peso molecular a que deben su producción, no se pone de manifiesto por la formación de un precipitado, sino, en primer lugar, porque se produce un fuerte aumento de la viscosidad al añadir al suero que contienen los anticuerpos (1 ml.) disoluciones del antígeno de bajo peso molecular en una concentración óptima. El suero normal modifica su viscosidad de modo insignificante y sólo como consecuencia de la dilución producida por la disolución del antígeno; en cambio, el suero que contiene el anticuerpo experimenta un fuerte aumento de viscosidad si se mezclan los productos en concentración apropiada; cuando no se llega o se

pasa de esta concentración, el aumento de viscosidad es más reducido (fenómeno de zona).

Si se examinan los dibujos con que LOISELEUR ilustra gráficamente sus observaciones, se aprecia que no intenta representar el curso de la reacción, sino la relación entre la elevación relativa de la

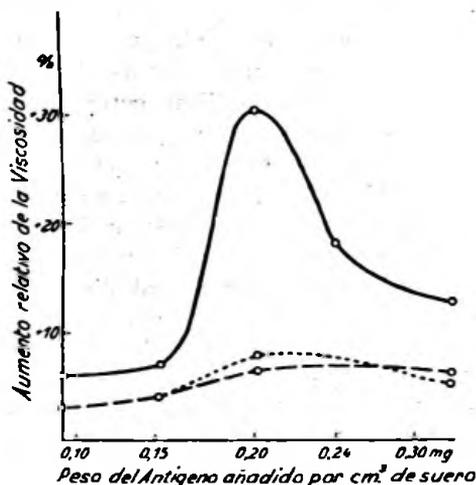


Fig 1 [Según J. LOISELEUR (1946 b)] Conejos preparados con ácido d-tartárico. Curva llena, reacción con d-tartárico; línea de puntos, reacción con l-tartárico; línea de trazos, reacción con ácido r-tartárico.

viscosidad (expresada en tantos por ciento) y las cantidades de antígeno añadidas al antisuero. En la figura 1 se expresa también la cantidad absoluta de antígeno (ácido d-tartárico) necesaria para la elevación máxima de la viscosidad, y la especificidad (por comparación con lo observado al añadir al suero los ácidos l-tartárico y r-tartárico). LOISELEUR (1946 c) también observa que el suero de los animales inmunizados con sustancias orgánicas de bajo peso molecular pierde casi por completo su capacidad re-

accional cuando se intercala una dosis masiva dentro de la serie regular de las inyecciones diarias de pequeñas dosis antigénicas; después de algunos días de descanso vuelve a observarse un aumento de la capacidad del suero de elevar la viscosidad al mezclarse *in vitro* con el antígeno. Parece como si los anticuerpos, por la administración de grandes cantidades de antígeno, se saturaran temporalmente; es, pues, manifiesta una analogía con la "fase negativa" observada en las inmunizaciones con antígenos proteicos. Hay que preguntarse cómo explicar, en las sustancias de bajo peso molecular, la recuperación espontánea del nivel de anticuerpos en la sangre circulante. En los anticuerpos con antígenos proteicos admitimos que la pérdida de anticuerpos circulantes (provocada por sangría o por saturación intravascular) se compensa por la cesión de globulinas inmunes desde el depósito de proteínas o desde los órganos productores de globulinas [R. DOERR (1947 a, páginas 5 y sigs.)]. Pero de las conclusiones de LOISELEUR no se deduce que la producción de los anticuerpos que exaltan la viscosidad

tenga lugar en los tejidos donde se verifica la síntesis de las globulinas; este autor parece inclinado más bien a admitir un moldeado humoral de las globulinas normales preexistentes en anticuerpos, basándose en lo conseguido *in vitro*. En el punto que se discute apenas cabe otra posibilidad que la combinación entre los anticuerpos descritos por LOISELEUR y las sustancias de bajo peso molecular se disocia con facilidad y de modo espontáneo; los antígenos de bajo peso molecular, por su difusibilidad, se eliminan de la circulación y de nuevo pueden descubrirse los anticuerpos liberados. Pero LOISELEUR (1946 c) construye una curva en la que puede verse que los anticuerpos, después de la fase negativa, pueden alcanzar un título más elevado que antes de su saturación *in vivo*, lo que no puede acordarse fácilmente con la explicación propuesta (fig. 2).

A continuación de tales consideraciones se nos plantea la cuestión del modo de combinarse los anticuerpos de LOISELEUR con sus antígenos de bajo peso molecular; es decir, la solidez de la combinación y las propiedades de los antígenos mientras están combinados con su anticuerpo.

Hay que preguntarse si el alcohol etílico o la morfina actúan cuando están combinados con su anticuerpo específico del mismo modo que si estuvieran libres. Incluso si, por las pruebas efectuadas, no cupiera dudar que efectivamente se verifica una combinación, a pesar de ello no podría afirmarse que el alcohol y la morfina combinados habrían de comportarse como las toxinas clásicas neutralizadas por sueros antitóxicos. En efecto, muchos fermentos conservan su actividad enzimática en la combinación con sus anticuerpos específicos y las repetidas experiencias para copular alcaloides o, en general, sustancias fisiológica o farmacológicamente activas con proteínas, con el propósito de obtener antisueros que paralizaran su actividad, han dado hasta la fecha resultados poco satisfactorios [R. DOERR, *Die Antigene* (1948)]. Hay que excluir, naturalmente, que sus-

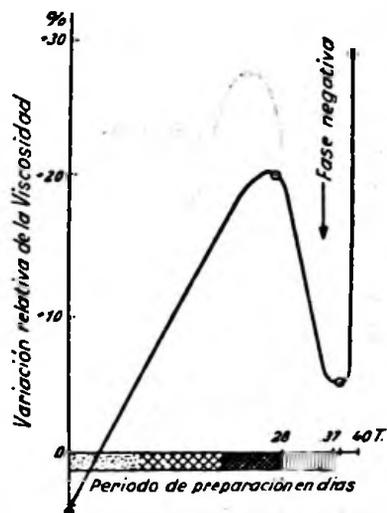


Fig. 2. [Según J. LOISELEUR (1946 c)]. Conejos preparados con alcohol etílico. Caída de la intensidad de la reacción del suero después de una inyección masiva de antígeno.

tancias como el alcohol, la morfina, la floridicina, etc., se modifiquen químicamente por la reacción con anticuerpos; lo que no se verifica siquiera al neutralizar toxinas por antisueros específicos, ya que, como es sabido, la toxina puede disociarse de su combinación con el anticuerpo en posesión de su toxicidad intacta; sin embargo, la toxina resulta inactiva mientras está combinada con la antitoxina. Debe, por consiguiente, comprobarse si las sustancias orgánicas de bajo

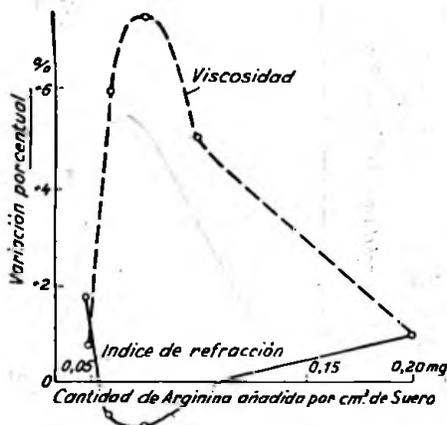


Fig. 3. [Según J. LOISELEUR (1946 d)]. Conejos tratados durante ocho días con 14 inyecciones intramusculares de arginina (en total 480 mg.). Elevación de la viscosidad y simultánea reducción del índice de refracción con la cantidad óptima de antígeno.

peso molecular se comportan del mismo modo después de su reacción con los sueros inmunes descritos por LOISELEUR. En las comunicaciones publicadas por LOISELEUR no se da ningún dato a este respecto.

Resulta sorprendente la observación de LOISELEUR (1946) de que en sus reacciones no sólo se modifica la viscosidad de la mezcla de los antisueros y su antígeno, sino también su índice de refracción. En la figura 3 se representa el comportamiento del suero de un conejo que en el curso de ocho días recibió 480 mg. de arginina

(distribuida en 14 inyecciones intramusculares). A la mañana siguiente a la última inyección, la adición de 0,1 mg. de arginina a 1 ml. de suero provocó una elevación de la viscosidad de aproximadamente un 8 por 100, y una reducción del índice de refracción de un 2 por 100 con respecto al valor inicial; esta diferencia afecta a la quinta cifra decimal del índice de refracción. Es, por consiguiente, escasa; la medida se efectuó con una sensibilidad de $\pm 1,5 \times 10^{-6}$. En el comportamiento del índice de refracción también aparece el fenómeno de zona (véase antes), y precisamente de forma que la cantidad de antígeno que provoca el máximo de viscosidad es la misma que origina la reducción más intensa del índice de refracción. Esta concordancia entre el máximo de viscosidad y el mínimo de refracción pudo también establecerse en las reacciones de otras sustancias (leucina, fenol, anilina, xilosa, ácido tartárico) con sus antisueros correspondientes [LOISELEUR y LÉVY (1947)]. Estas modificaciones del ín-

dice de refracción no implican procesos químicos; probablemente se trata de fenómenos físicos (adsorciones, fenómenos de contracción).

Debe recordarse que R. DOERR y W. BERGER no apreciaron en los análisis interferométricos de la precipitación inmune, ninguna modificación del índice de refracción que indicara procesos sintéticos o de demolición en la reacción entre los antígenos proteicos y los anticuerpos. Al mezclar volúmenes iguales de suero diluido de caballo y de suero anticaballo de conejo no se obtienen sino mezclas cuyo índice de refracción es, dentro de la exactitud del método, la media aritmética de los índices de los líquidos que se mezclan. Lo mismo sucede cuando, en la cámara interferométrica, tarda en producirse la precipitación (por lo que la lectura puede repetirse dentro de un período largo) o cuando la floculación no se produce en absoluto (como en la prueba de LOISELEUR). Al comprobar las observaciones de LOISELEUR habrá, pues, que prestar también especial atención a si se corresponden de modo cuantitativo la elevación de la viscosidad y la reducción del índice de refracción provocada por la adición del antígeno.

De las comprobaciones ulteriores se deducirá si la concepción de LOISELEUR tiene mayor consistencia que la hipótesis de L. PAULING y la obtención, de ella derivada, de anticuerpos *in vitro* por PAULING y CAMPBELL. LOISELEUR [véase LOISELEUR y LÉVY (1947)] se promete provecho teórico y práctico del desarrollo ulterior del campo experimental que inicia. Ventajas teóricas porque tales investigaciones cuando se emprenden en un campo suficientemente extenso permitirán adquirir una visión de las relaciones entre la capacidad antigénica y las diversas funciones químicas; hasta la fecha (final de 1947), en opinión del autor, nada se ha efectuado que permita asegurar la consecución de este fin por el nuevo camino. La posibilidad de realizaciones prácticas se deduce de los intentos de producir anticuerpos en la sangre de conejos a los que se administre durante mucho tiempo un veneno (alcohol o morfina). Se admite que en las intoxicaciones crónicas del hombre (alcoholismo y morfínismo) se forman tales anticuerpos, lo que explica hasta cierto grado por qué el organismo intoxicado crónicamente necesita reponer continuamente el antígeno tóxico. En segundo lugar, se propone una terapia de tales estados consistente en aislar los anticuerpos del suero de los intoxicados crónicos e inmunizar con ellos caballos con el propósito de obtener sueros curativos; concepción errónea porque por la inmunización con una globulina inmune no se obtiene un "antianticuerpo", sino simplemente un suero antiglobulina incapaz de neutralizar las funciones de anticuerpo de la globulina inmune utilizada para la

inmunización, y que en cambio daría lugar a fenómenos patológicos si se inyectara al hombre o animal del que procede la globulina. En tercer lugar, se señala que la penicilina posee un peso molecular bajo (aproximadamente 500) y que su aplicación terapéutica podría consistir en inundar el organismo de modo permanente con el medicamento, lo que, según LOISELEUR, LÉVY y SUREAU (1946), tendría la misma consecuencia que en el conejo el envenenamiento crónico con morfina (véase antes), es decir, la producción de un anticuerpo específico. Sea esta deducción verdadera o falsa, carece de importancia práctica, porque con el tratamiento de la neumonía con aerosol de penicilina se obtienen, según las experiencias de P. GEISER, K. SCHAUB y H. STAUB (1946), resultados igualmente buenos, y porque si bien en este tipo de aplicación se utilizan de 600.000 a 800.000 unidades, es decir, grandes cantidades de penicilina, se administran en un transcurso de dos días y medio a tres días, lo que no corresponde de ningún modo al modo de inmunizar LOISELEUR con sustancias de bajo peso molecular. Finalmente, LOISELEUR y LÉVY opinan que la formación de anticuerpos pudiera ser conveniente desde el punto de vista fármacodinámico para administrar un alcaloide durante un largo período de tiempo, porque la presencia del anticuerpo lo mantendría durante más tiempo en la circulación, con la consecuencia de prolongar y regular su acción. Como se ve, la mayor parte de tales perspectivas está construida sobre premisas falsas o sobre opiniones vagas.

CAPÍTULO II

LAS ACCIONES HEMAGLUTINANTES DE LOS VIRUS

Bajo la designación de "ensayo de HIRST" se comprenden las aglutinaciones de los hematíes de diversas especies de animales, ocasionadas por ciertos virus. Tales aglutinaciones, como las de bacterias u otras células por antisueros, se deben a una combinación del agente aglutinante (el virus) con el substrato aglutinable (los eritrocitos), combinación que puede demostrarse no sólo por el método habitual de absorción, sino también en el microscopio electrónico [F. HEINMETS (1948)]. Pero, a diferencia de las aglutinaciones inmunes, la combinación del virus con el eritrocito se destruye espontáneamente, y, al examinar los componentes de la reacción después de disociados, se observa en ellos un comportamiento distinto, ya que el virus conserva su acción hemaglutinante inicial, mientras que los hematíes han perdido su capacidad de combinarse con el virus y de ser aglutinados por él. Si la sustancia de los eritrocitos que fija el virus se designa, en términos serológicos, como "receptor", este receptor, por su contacto con el virus, sufre evidentemente una modificación que extingue su afinidad con las partículas del virus.

Se ha intentado aislar de los hematíes los receptores del virus y determinar su naturaleza química. M. BOVARNICK y P. M. DE BURGH (1947) y P. M. DE BURGH, P. C. YU, C. HOWE y M. BOVARNICK (1948), empleando disolventes de grasas, obtuvieron, a partir de hematíes humanos y de oveja, extractos capaces de inhibir la acción hemaglutinante del virus de la gripe y de las paperas, y que se inactivan al mezclarse con tales virus. Si la inactivación correspondiera a la pérdida de la capacidad reaccionante del receptor *in situ*, es decir, en el eritrocito, la inhibición de la reacción de HIRST pudiera atribuirse a que los virus se desvían de los eritrocitos por un exceso de receptores libres. Pero ya en 1942, G. K. HIRST se apartó del concepto indefinido de una "modificación" o "inactivación" de los recep-

tores de virus al aceptar que los receptores se destruyen por un efecto fermentativo del virus, y por esta ruta se mueve desde entonces la investigación del mecanismo del efecto hemaglutinante de los virus, en especial de la gripe, enfermedad de NEW CASTLE y paperas.

G. K. HIRST (1948 a) investigó el comportamiento del receptor para el virus de la gripe de los hematíes de gallina, y observó que resiste temperaturas elevadas (65 a 85°), modificaciones del pH entre 4,19 y 10,15 y una serie de agentes oxidantes [K_2 (Fe (CN) $_6$), $KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$, I_2 , H_2O_2 , $NaIO_3$]; pero, en cambio, pierde rápidamente su capacidad reaccional (se destruye) por peryodato sódico ($NaIO_4$) y tripsina. Todas estas propiedades también las posee, según HIRST, el suero de conejo normal, cuyo parentesco químico con el receptor del virus también se refleja en su efecto en el ensayo de HIRST, puesto que el suero de conejo normal, exento de anticuerpos, es también capaz de inhibir a elevadas diluciones la hemaglutinación por el virus de la gripe (1); finalmente, HIRST comunica experimentos en que se observa que esta acción inhibitoria del suero puede debilitarse considerablemente por un contacto prolongado con el virus de la gripe. En una segunda comunicación HIRST (1948 b) señala que el virus de la gripe, después de calentado a 56° durante treinta o más minutos, aunque sigue siendo capaz de aglutinar hematíes (aunque más débilmente que el virus sin calentar), pierde la capacidad de eluirse, es decir, de desprenderse por completo de las células aglutinantes, y también sufre su capacidad de inactivar, de destruir la sustancia inhibitoria del suero normal de conejo. El inhibidor existente en el suero de conejo normal y el receptor del virus existente en los hematíes de gallina deben ser, termina HIRST, sustancias idénticas o "análogas".

Los extractos de hematíes obtenidos por M. BOVARNICK y colaboradores que se mencionan en la página 19 contienen en las preparaciones más activas (es decir, en las que inhiben más intensamente la reacción de HIRST) hasta un 50 por 100 de polisacáridos. También HIRST considera los polisacáridos como parte integrante del receptor de virus de los hematíes y de la sustancia inhibitoria existente en el suero de conejo normal, fundándose precisamente en el efecto oxi-

(1) El título de la acción inhibitoria del suero de conejo normal varía de un animal a otro, pero alcanza valores altos. El suero normal de hurón inhibe con una intensidad casi tan grande como el de conejo, mientras que el de caballo posee títulos bajos en cuanto al efecto inhibitorio sobre la hemaglutinación del virus de la gripe [G. K. HIRST (1948 a)].

dante específico de los peryodatos, que, como es sabido, atacan principalmente los hidratos de carbono, es decir, los enlaces C-C en que se encuentran grupos OH. Pero, según HIRST, no puede admitirse que sean polisacáridos puros, ante todo porque los destruye la tripsina, por lo que debe tratarse de un complejo cuyo segundo componente necesario para fijar el virus ha de ser una proteína. Además hay que señalar que tal receptor se asemeja, en lo que respecta a su estado natural, a los factores sanguíneos A, B y O, encontrándose en las células, como ellos, en estado insoluble, aunque en otros lugares se presenta disuelto. HIRST ha emprendido, como él mismo dice, la tarea de obtener sustancias que se asemejen lo más posible al receptor, pero que no procedan de los hematíes, sino de cualquier otro material biológico, con el fin de obtener por este camino indirecto conclusiones acerca de la naturaleza del receptor: encuentra una de tales sustancias análogas en el suero de conejo normal, siendo la observación fortuita de que este suero inhibe, a altas diluciones, la hemaglutinación por el virus de la gripe, lo que le puso sobre esta pista indudablemente especial.

R. H. GREEN y D. W. WOOLEY (1947) habían señalado ya que los polisacáridos naturales (pectina y sustancias análogas) inhiben fuertemente la hemaglutinación por el virus de la gripe, e incluso llegan a impedir la infección del embrión de pollo por este virus. Por último, C. A. KNIGHT (1944), por centrifugación del líquido alantoideo normal de huevos de gallina incubados (no infectados), pudo separar una gran partícula de unos 40 μ , constituida por proteína, hidrato de carbono y lipóide que se comporta como antígeno energético; el anti-suero obtenido por este antígeno puede impedir la aglutinación de los hematíes por el virus de la gripe de los tipos A o B, cuando proceden de líquido alantoideo infectado [consúltese R. DOERR (1948, páginas 312 a 316)]. F. M. BURNET (1947) consiguió inhibir la aglutinación por virus de la gripe mediante el contenido de un quiste seudomucinoso y mediante la sustancia O de los hematíes humanos y comprobó que la acción inhibidora se pierde en las mezclas de la sustancia O con virus de la gripe, de acuerdo con la reducción del efecto de la sustancia inhibidora del suero normal de conejo conseguida por C. K. HIRST (1948 a) al incubar el suero con el virus. A este respecto deben mencionarse finalmente los datos publicados por R. BIELING y L. OERLICHs sobre la inhibición de la aglutinación de los hematíes de gallina por el virus de la gripe, resumidos en el tomo LXV del *Fiat Reviews of German Science* [véase R. BIELING y H. HEINLEIN (1947)]. Según BIELING y OERLICHs, suspensiones

celulares procedentes de órganos de diversas aves y mamíferos, aunque no se aglutinen por el virus de la gripe, inhiben la hemaglutinación incluso cuando los órganos proceden de especies (caballo) cuyos hematíes no se aglutinan por el virus de la gripe. También se observa la inhibición por extractos de órganos (entre ellos extractos de órganos de caballo) y, por último, incluso a diluciones considerables, por la proteína de huevos de gallina sin infectar ni incubar.

Es sabido que la aparición de precipitados al mezclar un antígeno proteico disuelto con su antisuero se impide cuando se encuentra el antígeno en exceso. Si una sustancia inhibe de modo específico la reacción de precipitinas, debe deducirse que esta sustancia está emparentada inmunológicamente con el antígeno, es decir, que posee uno o varios determinantes en común con el antígeno, utilizado en la reacción principal. Todo serólogo conoce la frecuencia con que se utilizan tales reacciones de inhibición y la fuerza demostrativa que se les atribuye; pueden verse varios ejemplos notables en los tomos I y III de *Die Immunitätsforschung* [R. DOERR (1947, 1948)] Pero al inhibir por una sustancia X la aglutinación de los hematíes por el virus de la gripe, no parece tan claro el fondo del problema, porque entre los componentes de la reacción inhibida no existe ninguna relación genética, como la que existe entre un antígeno y su anticuerpo. A continuación explicaremos por algunos ejemplos los conflictos con que se tropieza para interpretar tales reacciones.

El virus de la gripe no sólo aglutina los hematíes de gallina, sino los de otras especies; en estas aglutinaciones el virus se fija a los eritrocitos, por lo que resulta comprensible que la aglutinación de los hematíes de gallina pueda inhibirse por la adición de otro hematíe aglutinable y, como señalan BIELING y OELRICHS, en tanto mayor grado cuanto éste más intensamente se aglutine por el virus. Aquí observamos la desviación del virus por su combinación con otra célula aglutinable.

“En las suspensiones de células de órganos el efecto inhibitor es evidentemente independiente de tales procesos de combinación, puesto que aparece sin que las células mismas se aglutinen. Por lo demás también ejercen efecto inhibitor células de órganos de especies animales cuyos hematíes no se atacan por el virus de la gripe, por ejemplo, las células hepáticas de caballo” [BIELING y HEINLEIN (1947, página 57)]. En el mismo lugar se dice más adelante (pág. 58): “La sustancia inhibidora procedente de los órganos no inhibe ni la combinación del virus con los hematíes ni la aglutinación de los hematíes de gallina que ya hubieran estado en contacto con el virus activo.

Atacan, por tanto, manifiestamente al mismo virus antes de que se combine." No se sabe qué entender por este "ataque al virus", si la saturación de la afinidad para las células aglutinables (es decir, de su capacidad de combinación con el hematíe) u otro mecanismo. Pero se aprecia lo equívoco de la interpretación así expresada en que la inhibición puede atribuirse tanto a una saturación del poder de combinación del virus como a otra alteración que no se precisa.

Cabe, como tercera posibilidad, la hipótesis, ya mencionada, de que también pudieran inhibir la hemaglutinación sustancias que, aunque no procedan de los hematíes aglutinables por el virus, son, bioquímicamente, idénticas o muy semejantes a los receptores de los hematíes en que se fija el virus. En esta categoría de sustancias inhibitoras incluye G. K. HIRST los sueros normales de conejo y hurón, es decir, las mucoproteínas inactivables por el virus de la gripe que existen en tales sueros. Veremos si puede también demostrarse la identidad (parentesco) entre otras sustancias inhibitoras (pectina, polisacáridos bacterianos, mucina, sustancia O de los hematíes humanos) y los receptores de virus de un modo tan convincente como lo ha efectuado G. K. HIRST (1948 a, b) con el factor inhibitor existente en el suero normal de conejo. HIRST funda su demostración principalmente en que el virus de la gripe inactiva a la sustancia inhibitora del suero normal de conejo, exactamente del mismo modo que a los hematíes sobre los cuales actúa, que quedan incapaces de reaccionar después de separarse (eluirse) de ellos el virus. Por otra parte, de ningún modo puede decirse que sólo los virus del grupo de la gripe sean los que despliegan estos efectos. F. M. BURNET, J. F. McCREA y J. D. STONE (1946) descubren en los filtrados de cultivos de vibriones del cólera un agente que también "destruye" los receptores de virus de los hematíes humanos, y B. A. BRIODY (1948) demuestra que existe un paralelismo notable entre el efecto destructor de los receptores que presentan los filtrados del cólera y el efecto del virus de la gripe. Los filtrados de cultivos del *Clostridium welchii* se comportan de modo análogo a los filtrados del cólera [J. F. McCREA (1947)] y también, aunque en menor grado, los extractos de sanguijuelas (B. A. BRIODY, sin publicar). Los datos de F. M. BURNET y colaboradores acerca de los efectos, análogos a los de un virus, de los filtrados del cólera se han confirmado en lo esencial por G. K. HIRST.

La elaboración de todo el complejo problema está en pleno curso; no se puede predecir aún cuáles habrán de ser las soluciones a las

preguntas planteadas. En opinión del autor, las cuestiones están, en el momento actual, planteadas del modo siguiente:

1. Las sustancias, emparentadas con los receptores de los hematíes aglutinables, que inhiben la hemaglutinación por el virus de la gripe se han descubierto no sólo en los hematíes, sino en sustratos muy distintos, como son polisacáridos naturales de bacterias y de plantas superiores (pectina de manzanas), en sueros normales de distintas especies animales, en el contenido de quistes, en extractos de órganos. Es muy probable que este recuento, ya en sí tan abigarrado, no esté todavía completo.

2. La acción destructora de los receptores no sólo se efectúa por los virus del grupo de la gripe, sino por los filtrados de cultivos de vibriones del cólera o del *Clostridium welchii* y, con menor intensidad, por los extractos de sanguijuelas; también esta lista puede ampliarse en un futuro.

3. Como resulta de los puntos 1 y 2, sólo se conoce de modo muy insuficiente la índole de los dos componentes que participan en la reacción de HIRST (a saber, el receptor existente en el eritrocito y el factor, existente en el virus, que aglutina los hematíes y que los vuelve inaglutinables). En estas circunstancias, naturalmente, resulta difícil decidir: a) en qué se diferencian las especies de eritrocitos que se aglutinan por un determinado virus de las que no se aglutinan por él, y b) por qué, por otra parte, virus muy emparentados no se adaptan a las mismas especies de eritrocitos o, como puede formularse de modo más general, por qué cada virus y casi cada estirpe de una misma especie de virus está conformada de modo que aglutina una serie de especies de hematíes y no aglutina otra serie [consúltese la tabla de E. CLARK y F. P. O. NAGLER, en DOERR (1947, pág. 226)]. El autor no conoce sino una comunicación de H. S. GINSBERG, W. F. GOEBEL y F. S. HORSFALL (1947), según la cual el polisacárido capsular del Bact. friedländer, tipo B, inhibe la aglutinación de los hematíes por el virus de las paperas, pero no por el virus de la gripe de los tipos A o B.

4. Lo que se designa brevemente por "virus" no es una disolución, sino una suspensión de formas corpusculares que poseen un tamaño y forma determinados. Si estos corpúsculos cedieran un enzima, se le descubriría en el líquido amniótico infectado del que se hayan separado por centrifugación las partículas del virus, por ejemplo, por la destrucción de la sustancia inhibidora existente en el suero normal de conejo. Esto no sucede [HIRST (1948 a, pág. 327)], ya que tal efecto es exclusivo de las partículas de virus. La capacidad

de destruir el receptor parece, pues, ligada a las partículas formes del virus, y si se supone que se trata de un proceso fermentativo, estos elementos habrían de producir el enzima al ponerse en contacto con los receptores del eritrocito o tal vez tratarse de la acción a distancia [A. ROTHEN (1946)] de un fermento contenido en las partículas del virus. Ahora bien, no pasa de hipótesis la atribución de carácter fermentativo a la demolición, a veces en el curso de diez minutos (1), de los receptores de los hematíes o de las sustancias inhibitoras emparentadas con ellos; puede también pensarse en otras modificaciones físicas o físico-químicas que pudieran transformar la superficie de los hematíes o los estromas, haciéndolos incapaces de volver a fijar el virus después que éste actuó una vez y de la subsiguiente elución. No ha llegado a nuestro conocimiento que se haya emprendido la investigación química de los hematíes modificados por contacto del virus o de la sustancia inhibitora existente en el suero normal de conejo después de inactivada por el virus. Serológicamente, sólo se sabe que los hematíes del hombre se vuelven, por la acción del virus, "panaglutinables"; es decir, que adquieren la propiedad descrita primeramente por G. HÜBNER (1926) y O. THOMSEN (1927) y que V. FRIEDENREICH (1930) atribuye a que los enzimas de ciertas bacterias (algunas especies de *Corynebacterium* y de vibriones) que impurifican las muestras de sangre, activan un aglutinógeno T que poseen en estado latente todos los hematíes humanos que reaccionan con una aglutinina T existente en el suero normal de todo hombre adulto. F. M. BURNET, J. M. McCREA y J. D. STONE (1946) observaron que los hematíes humanos por efecto de los virus del grupo de la gripe experimentan una modificación análoga a la panaglutinabilidad bacteriógica, porque el factor que destruye el receptor ejerce el mismo efecto sobre los filtrados de cultivos de vibriones del cólera [véase también J. D. STONE (1947)] (2). Ahora bien, tampoco se conoce con seguridad el mecanismo de la panaglutinabilidad de origen bacteriano. FRIEDENREICH no acepta, de ningún modo, que los enzimas de la bacteria "destruyan" los receptores del eritrocito, sino que se inclina hacia la activación de un antígeno latente. Incluso ha esta-

(1) Aplicando una técnica determinada se han eluido por completo en diez minutos a 37° los virus de la gripe adsorbidos a hematíes humanos [B. A. BRIODY (1948)].

(2) En la comunicación de B. A. BRIODY (junio 1948) se citan trabajos posteriores sobre este tema y se anuncian otros [F. M. BURNET y J. D. STONE (1947) y P. LIND y N. McARTHUR (1947)] que no llegaron a conocimiento del autor hasta después de escrito este capítulo.

blecido que se conserva el soporte inmunoquímico que determina la inclusión en un grupo sanguíneo. En efecto, los hematíes de los grupos A o B hechos panaglutinables por la acción bacteriana reaccionan, según FRIEDENREICH, con especificidad de grupo con sueros testigos anti-A o anti-B si previamente se separa la aglutinina T por adsorción a eritrocitos O panaglutinables. Por tanto, los receptores A y B existen también en los hematíes panaglutinables, aunque enmascarados por el antígeno T activado (1).

5. Hasta la fecha no se ha conseguido adquirir una idea satisfactoria de la estructura de los aglutinados obtenidos por la acción del virus sobre los hematíes o sobre los estromas de los mismos. Es difícil responder a la pregunta de cómo unos elementos de las dimensiones de los hematíes pueden enlazarse entre sí, constituyendo cadenas, mediante las partículas elementales del virus, también formes, aunque mucho más pequeñas. Pudiera objetarse que lo mismo sucede en cualquier hemaglutinación, porque la molécula de la globulina inmune puede también concebirse como un elemento forme de determinado tamaño. La teoría, tan intuitiva y por ello aceptada por muchos autores, de la "redes" no puede aplicarse sino a las reacciones de precipitinas, reacciones en que el producto de la reacción se origina por la acción recíproca de partículas que poseen aproximadamente el mismo orden de tamaño. Pero si se dirige una mirada a la figura 9 (página 124), se observa que en una isoaglutinación los hematíes no se reúnen en forma de pila de monedas, como se observa, en cambio, en una pseudoaglutinación (fig. 8), sino que se dañan manifiestamente y se funden entre sí, constituyendo grumos en los que ya no puede reconocerse ni la forma de los hematíes que los constituyeron. En el ensayo de HIRST hipotéticamente se admite la intervención de un enzima procedente del virus que destruye el receptor localizado

(1) Según R. BIELING y L. OELRICHS (véase BIELING y HEINLEIN, página 57), los hematíes humanos no pierden por la acción de las isoaglutininas la capacidad de ser aglutinados por el virus de la gripe, y, recíprocamente, los hematíes humanos, después de haber sufrido la acción del virus de la gripe, pueden seguir fijando isoaglutininas. Del mismo modo la repetida acción de una aglutinina para la sangre de gallina, obtenida por la inmunización de conejos con hematíes de gallina, tampoco impide por completo la capacidad de los hematíes de gallina de fijar el virus de la gripe, ni tampoco el tratamiento previo con este virus inhibe la capacidad de los hematíes de gallina de combinarse con sus aglutininas inmunes. En los experimentos que apoyan estas afirmaciones el autor no encuentra un punto de vista único; los resultados, de ser convincentes, hablarían igualmente en contra de que el virus de la gripe pudiera provocar en los hematíes destrucciones por vía enzimática.

en la superficie del hematíe, y por analogía se está inclinado a admitir también en este caso que una lesión del eritrocito debe jugar un papel importante en la aglomeración de los mismos para constituir grandes cúmulos. Sin embargo, F. HEINMETS (1948) no pudo observar, con el microscopio electrónico, ninguna modificación en los estromas que se aglutinaban por el virus de la gripe. HEINMETS anuncia nuevas investigaciones que, en opinión del autor, no son necesarias o pueden sustituirse por un examen de la estructura de los hemaglutinados en el microscopio ordinario. El factor que destruye el receptor puede eliminarse calentando suavemente el virus de la gripe. El virus calentado aglutina, sin embargo, los hematíes, y la aglutinación provocada por este virus no puede destruirse por una agitación violenta, mientras que la conseguida por el virus en estado natural (no calentado) se destruye por simple agitación suave en el tubo de ensayo [B. A. BRIDY.] Posiblemente al examinar en el microscopio ordinario los aglutinados, se observaría que el producido por el virus sin calentar posee un aspecto semejante al representado en la figura 8 (si bien en este caso, según la hipótesis anunciada, han debido destruirse estructuras superficiales), y en el del virus calentado los aglutinados ofrecen el aspecto representado en la figura 9, es decir, también justamente lo contrario de lo que cabría de esperar según la hipótesis.

De sus observaciones en el microscopio electrónico, HEINMETS no ha llegado a conclusiones acerca del mecanismo de la hemaglutinación por el virus de la gripe. En la discusión contenida en su trabajo aquí citado manifiesta explícitamente que no está seguro de si los hematíes se aglutinan directamente por las partículas del virus (que enlacen entre sí los hematíes) o si la superficie de los hematíes se sensibiliza por el virus adsorbido; y a consecuencia de ello los hematíes se aglutinan entre sí de modo secundario. Lo único que le ha enseñado la observación con el microscopio electrónico es que cuando se aglutinan con virus hematíes frescos (conservados breve tiempo), siempre pueden observarse partículas elementales de virus en su superficie, y especialmente en los lugares por los que están en contacto unos con otros. Sin embargo, siempre pudo observar hematíes aislados, no aglutinados, pero cubiertos de partículas de virus, que es lo que siempre se observa cuando a la suspensión de hematíes se añade el virus en concentración baja. Una aglutinación visible la considera HEINMETS como un caso extremo de acción recíproca, porque la combinación de virus y eritrocitos puede también producirse sin aglomeración visible de los hematíes. Esta afirmación se funda, como HEINMETS subraya, en numerosas investigaciones particulares e interpreta

el hecho diciendo que probablemente deben necesitarse muchas partículas de virus para que puedan establecer el puente entre los hematies. Debe aquí recordarse que los sueros inmunes antibacterianos pueden aglutinar en diluciones muy grandes (hasta 1:100.000 y más) y que los sueros inmunes hemaglutinantes poseen también en ocasiones un elevado título.

De lo expuesto se deduce que, a pesar del trabajo intenso y rico en experimentación, quedan cuestiones importantes sin contestar; por esta razón no intentamos en este lugar exponer los resultados experimentales singulares ni aportar una documentación bibliográfica exhaustiva. En el segundo suplemento, que se editará inmediatamente, del *Handbuch der Virusforschung* encontrará el lector un artículo de C. HALLAUER que puede orientarle en todos los aspectos dentro de la literatura actual.

Con todas las reservas que impone la inseguridad actual frente al problema, señalaremos por último algunas posibles analogías. El punto angular de los problemas planteados por el ensayo de HIRST lo constituye el hecho de que el virus se fija y, después de breve intervalo, vuelve a liberarse intransformado, es decir, conservando su capacidad de reacción. El caso extremo de una combinación fugaz de este tipo se produciría cuando el agente que actúa a modo de anticuerpo se disociara tan rápidamente que la combinación no pudiera descubrirse por los métodos usuales. Quizás pudiera concebirse de este modo la actuación de los anticuerpos "no absorbibles" contra helmintos parásitos, descritos por D. H. CAMPBELL (1938 a, b), J. OLIVER-GONZÁLEZ (1941) y W. H. TALIAFERRO (1940), y la del anticuerpo descubierto por W. H. TALIAFERRO (1924, 1932) y designado por este autor como "ablastina", que actúa sobre el *Trypanosoma lewisii*, cuya multiplicación (partición) impide. Pudiera también opinarse que el anticuerpo no se liga al antígeno (o a la célula que lo contiene), sino que actúa bañando las células a las que se adapta específicamente. En la "hipótesis de la membrana", mediante la cual R. DOERR (1925) intenta dar una explicación general del mecanismo de la anafilaxia [véase también R. DOERR, 1929 a, pág. 904, y 1926 b, página 747], se preveía esta posibilidad. Con la ablastina parecen producirse unos fenómenos de superficie análogos sin combinación previa. Sin embargo este caso no está esclarecido en todos sus puntos. En el suero de las ratas infectadas con *Trypanosoma lewisii*, además de la ablastina se encuentra un amboceptor citotóxico típico (una citolisina) que se completa por suero fresco de cobayo. Esta lisina, como la ablastina, está contenida en la fracción globulínica de los

sueros inmunes. Pero mientras que la lisina es adsorbida del suero inmune por los tripanosomas añadidos y los tripanosomas sensibilizados de este modo, si se inyectan a ratas normales, desaparecen rápidamente de la sangre periférica, la ablastina, en cambio, no se fija ni por grandes cantidades de tripanosoma, y los tripanosomas centrifugados no parecen sensibilizados, ya que conservan la capacidad de multiplicarse en la sangre circulante de ratas normales. Esto, formulado objetivamente, significaría que los tripanosomas, por su contacto *in vitro* con la ablastina, no se dañan de modo perceptible, y que este anticuerpo (que también se produce por la inmunización de conejos, animales no receptivos de la infección), sólo impide *in vivo* la partición de los tripanosomas. Esta contradicción intentan superarla las hipótesis acerca del mecanismo de acción de la ablastina que no admiten una lesión directa de los tripanosomas, sino acciones antagónicas con la respiración y metabolismo de estos parásitos que inhiben la partición natural. Como la inmunidad contra parásitos animales se tratará en volumen especial de estas "Investigaciones sobre inmunidad", podemos contentarnos en este lugar con remitirnos a la revisión de conjunto de W. H. TALIAFERRO, *The inhibition of reproduction of parasites by immune factors* (1948). Para completar añadiremos que sobre los procesos de partición de los protozoos también pueden influir anticuerpos citotóxicos que se combinen firmemente con la célula que contiene el antígeno. Si se inmunizan conejos con el olotrico libre *Ciliate tetrahymena* (del grupo *Colpidium-Glaucoma*), se obtiene un anticuerpo que aglutina los ciliados, los paraliza y provoca su partición cuando los ciliados se incuban con el antisuero en dilución conveniente durante una a dos horas. A diluciones más elevadas y período de incubación más prolongado se exaltan, en primer lugar, las particiones. Por último, si se prolonga la incubación durante treinta y cuatro horas, se observa que las particiones no se terminan, sino que se limitan al núcleo de modo que se producen células gigantes multinucleares de configuración irregular. Esta "distomía" ha sido considerada por J. A. HARRISON y E. H. FOWLER (1945), autores de la observación, como una genuina reacción antígeno-anticuerpo, porque se observa en todas las combinaciones entre protozoos y sus antisuecos, en que se hayan podido apreciar las otras reacciones de inmunidad específica descritas por M. ROBERTSON (1934), y que no se produce en todos los casos en que éstas no aparezcan. Como lugar de la distomía, HARRISON y FOWLER señalan la superficie de la célula. Tales distomías pudieron también observarse por E. CHATTON y Mme. CHATTON (1925) y T. M. SONNEBORN (1932) cultivando ciliados en presencia

de determinadas estirpes bacterianas. E. CHATTON y Mme. CHATTON observan que el *Colpidium camphylum* y el *Colpidium colpoda*, si se cultivan junto con una determinada estirpe de coli, a consecuencia de la separación incompleta de los individuos recién reproducidos, dan lugar a la formación de cadenas, y en parte también a formas mixtas polinucleares. Es interesante señalar que parece existir una especificidad doble, ya que por una parte el *B. Fluorescens* y otras estirpes de coli, a pesar de que no se distinguen de las estirpes activas, no pueden influir sobre el proceso de partición de los ciliados y, por la otra, otros protozoos (paramaecios, glaucoma) no reaccionan, en cultivos mixtos, con la estirpe activa de coli.

Existen también puntos de apoyo para las consideraciones hipotéticas e investigaciones experimentales que pudieran ayudar a una mejor comprensión de la hemaglutinación causada por las especies de virus y que hasta la fecha no han sido utilizadas. Parece dudoso que no haya más explicación que la destrucción enzimática de los receptores existentes en los hematíes aglutinables.

CAPÍTULO III

LOS ANTICUERPOS NATURALES

1. NOMBRES Y CONCEPTOS.

Con el nombre de anticuerpos *naturales* se comprenden sustancias que pueden descubrirse en el suero sanguíneo de hombres y animales por reacciones serológicas, *pero que no se han producido como consecuencia de la acción de un antígeno sobre el organismo o cuya causa de producción no puede descubrirse*. Se han contrapuesto a los "anticuerpos inmunes", que se producen a consecuencia de la reacción provocada por la incorporación de un antígeno conocido. Pero los anticuerpos naturales e inmunes reaccionan con las mismas sustancias designadas como "antígenos" (proteínas extrañas, hematies de la propia o de otra especie, bacterias, toxinas, virus), las reacciones muestran, con ambos tipos, los mismos signos externos (floculaciones, citolisis, muerte de las bacterias, neutralización de toxinas, inactivación de sustancias infectantes del tipo de virus, fijación del complemento), y estas reacciones poseen como característica común *una especificidad delimitada*, es decir, una adaptación, más o menos acusada, de la capacidad de reacción a un determinado antígeno.

Estas afirmaciones no pueden ser objeto de discusiones porque se limitan a describir los resultados de la experimentación; más bien constituyen el punto de partida para todas las consideraciones ulteriores.

En primer lugar hay que señalar que domina una posición justa. En casi todos los trabajos que se ocupan de este tema, los anticuerpos naturales se definen como sustancias activas que se encuentran en el suero sanguíneo *normal*, es decir, en el suero sanguíneo de hombre o animales *normales*. Con el adjetivo "normal" se significa que estos anticuerpos se han formado sin la participación de un antígeno específico, es decir, sin un impulso inmunizatorio. *Ahora bien, aunque*

el observador no tenga noticia de que una inmunización se haya provocado voluntariamente o se deba a una infección, ésta puede haber tenido lugar, sin embargo, en el historial del individuo.

Casi todo el problema de los anticuerpos naturales gira alrededor de la pregunta de si tales *inmunizaciones criptogenéticas* puede aceptarse en todos los casos o si cabe admitir una *formación de anticuerpos espontánea* en sentido estricto. De decidirse por los dos tipos de génesis surge inmediatamente la necesidad de separar entre ellos el campo de la inmunización criptogenética y el de la formación espontánea de los anticuerpos. Para ello hay que investigar, en primer lugar, si la formación espontánea de anticuerpos puede demostrarse o al menos admitirse como probable, o si debe desecharse con fundamento (en este segundo caso la investigación, naturalmente, se simplificaría considerablemente). Ante todo, sin embargo, debe plantearse *si los anticuerpos existentes en los sueros "normales"* (siempre o en la mayoría de los casos) *se caracterizan por propiedades especiales que los diferencien de los obtenidos por vía inmunizatoria.*

2. LAS PROPIEDADES DE LOS ANTICUERPOS NATURALES.

a) La composición química.

Existen relativamente pocos trabajos que se ocupen de este problema [E. P. PICK (1901), K. LANDSTEINER y CALVO (1902), L. BLEYER (1927), H. J. GIBSON (1930), A. GRÖNWALD (1935), M. ROSENMAN (1937), P. MICHON, M. VERAÏN y A. ZIEGLER (1936)]. Prescindiendo de algunas diferencias (consúltese la revisión de D. BROCC-ROUSSEU y G. ROUSSELL (1939, pág. 112 y siguiente), que hay que atribuir a la diversidad de los métodos de fraccionamiento, en parte erróneos, todos los autores coinciden en que se trata de *seroglobulinas*; más concretamente, de las globulinas especiales más lábiles, insolubles en agua destilada (L. BLEYER, M. ROSENMAN); las albúminas no contienen anticuerpos normales. En este respecto, por consiguiente, se obtienen los mismos resultados que con los anticuerpos inmunes, investigados con mucha más exactitud y por procedimientos nuevos, lo que por otra parte era de esperar considerando la identidad de las reacciones *in vitro* de unos y otros con un mismo antígeno (véase pág. 31).

b) Termolabilidad.

En la literatura antigua se atribuía a los anticuerpos normales, en especial a las hemaglutininas y a las bacteriaglutininas de los sueros normales, una sensibilidad para el calor mayor que la de los anticuerpos inmunes [A. RODET (1907), K. LANDSTEINER y M. REICH (1905 a), Ph. EISENBERG (1906), H. LÜDKE (1906), E. PRASEK (1914)]. Las diferencias apreciadas eran, en ocasiones, considerables. Así, PH. EISENBERG describe que un suero de conejo normal que aglutinaba el bacilo tífico ofreciendo un título de 40 U.Ag., a los cuarenta y cinco minutos de calefacción a 58° sólo poseía 5 U.Ag. y, después de calentar durante el mismo tiempo a 60°, únicamente 2; en las mismas circunstancias un suero inmune calentado conservaba su título casi intacto, e incluso media hora de calefacción a 65° no provocó sino una reducción insignificante (de 160.000 a 120.000 U.Ag.) (1).

Por el contrario, O. STRENG (1909) estableció que las aglutininas normales inmunes contra el *B. coli*, cuando proceden de la misma especie animal, se inactivan por el calor con la misma velocidad, y E. O. JORDAN (1937), que estudió aglutininas contra diversas bacterias (*Brucella*, *B. Pyocyaneus*, *B. typhi*), no pudo tampoco apreciar que las aglutininas normales y las inmunes poseyeran distinta termolabilidad.

Estas contradicciones no pueden extrañar si se considera: 1. Que anticuerpos de igual designación, cuando proceden de distintos animales de la misma especie son termoestables en grado muy diverso. Según STRENG, las diferencias pueden ser tan grandes que un suero inmune anti-coli de un animal se inactiva a 64° más rápidamente que el de otro a 74°. Que dos anticuerpos de distinta designación, producido por la misma especie animal, pueden comportarse de modo distinto frente al calor. Por ejemplo, si un conejo se inmuniza simultáneamente con *B. coli* y *B. typhi*, la aglutinina tífica resulta más estable que la *coli*; empleando determinadas estirpes de *coli* puede, sin embargo, cambiarse la relación (STRENG). Datos análogos se encuentran en E. P. PICK (1902), L. D. FELTON y G. H. BAILEY (1926), L. OLITZKI (1931), R. KLINGENSTEIN (1930), P. HARTLEY (1931) y

(1) Con el nombre de U.Ag. = unidad de aglutinación, EISENBERG designa la mínima cantidad de antisuero que ocasiona una aglutinación apreciable; el título se expresa en U.Ag. por ml. de antisuero.

otros. Importancia especial ofrece la observación, efectuada muchas veces, de que el *anticuerpo H* (*anticuerpo flagelar*) resiste mucho más el calor que la *aglutinina O* (*somática*), tanto cuando se trata de un suero inmune como de un suero normal, y tanto si se encuentran aislados como si coexisten en el mismo suero [F. S. JONES (1927, 1928), H. J. GIBSON (1930, 1932), A. FELIX y L. OLITZKI (1929), W. A. TIMMERMANN (1930), E. O. JORDAN (1937), F. C. BAWDEN y N. W. PIRIE (1938) observan que los virus bacilares (virus del mosaico del tabaco, virus X de la patata) floculan con sus antisueros según el tipo de aglutinación H, mientras que el virus de Bushy-stunt, esférico, da lugar a agregados granulares que se producen más lentamente y que corresponden a la aglutinación O de las bacterias; también en este caso se aprecia distinta termorresistencia, ya que los antisueros contra los virus bacilares conservan su acción floculante después de una calefacción de diez minutos a 90°, mientras que la capacidad precipitante del antisuero contra el virus de Bushy-stunt sufre al cabo de diez minutos a 75°.

A partir de estas diferencias en termorresistencia que ofrecen los antisueros contra los virus fitopatógenos, intentó explicar A. KLECZKOWSKI (1941) el mecanismo de la desnaturalización de los anticuerpos por el calor. KLECZKOWSKI [véase también F. C. BAWDEN y KLECZKOWSKI (1942)] admite que las seroproteínas inespecíficas, y entre ellas especialmente la albúmina, intervienen en la desnaturalización de las globulinas inmunes, pensamiento que ya había considerado E. P. PICK (1902) y que había encontrado apoyo experimental en las investigaciones de O. STRENG (1909), según las cuales la velocidad de inactivación de los antisueros bacterianos disminuye si se diluyen con disolución fisiológica de NaCl. Siguiendo esta indicación, KLECZKOWSKI, mediante un análisis exacto, llegó al convencimiento de que *la desnaturalización por calor es un proceso en dos fases*. En la *primera fase* se produce un anclaje de proteínas inespecíficas sobre la globulina anticuerpo. Si las proteínas agregadas son globulinas (euglobulinas), el complejo conserva inalterada su función de anticuerpo y ejerce el mismo efecto floculante sobre el antígeno que los sueros inmunes sin calentar; pero cuando lo que se fija a la globulina inmune es albúmina, aquélla pierde la capacidad de floculación, aunque sigue conservando la capacidad de fijar el antígeno (1), debido a lo cual

(1) P. EISENBERG y R. VOLK establecieron ya en 1902 que los sueros aglutinantes, cuando se calientan unos minutos a 70-80°, no aglutinan a las bacterias, pero continúan fijándose a ellas y dando el fenómeno de la inhibición.

el complejo continúa inhibiendo la acción floculante de las partículas de anticuerpo que aun sigan intactas. La termolabilidad de los antiseros O se debe, según KLECZKOWSKI, a que el calor no sólo produce una desnaturalización de los anticuerpos, sino a que éstos ya no floculan, pero todavía originan complejos que fijan el antígeno e inhiben

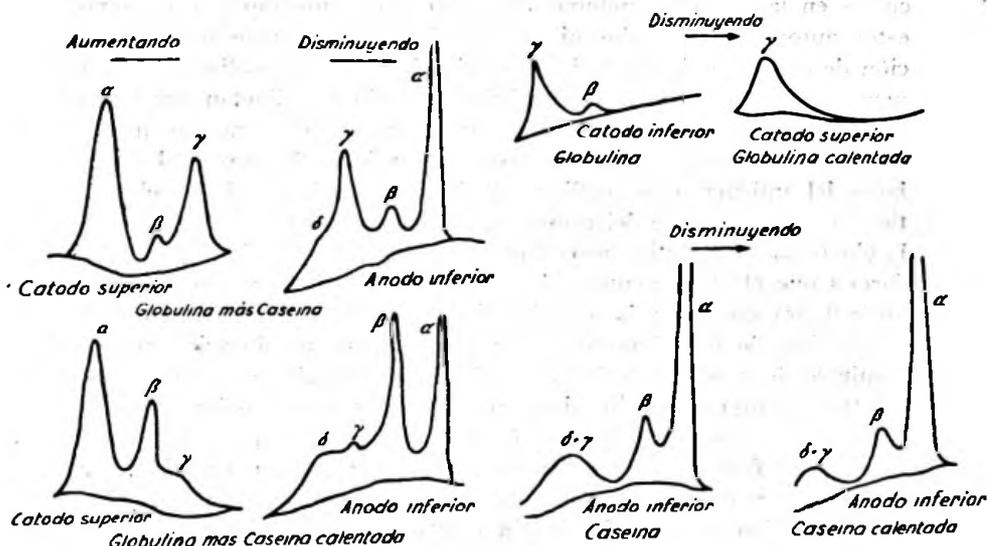


Fig. 4 a. Diagrama electroforético de una mezcla de globulina y caseína (compárese con la figura 4 b), sin calentar (arriba) y calentada diez minutos a 65° (abajo). Explicaciones en el texto.

Fig. 4 b. Arriba: diagrama electroforético de la globulina insoluble del suero antineumocócico tipo I, de caballo, sin calentar (izquierda) y calentada diez minutos a 65° (derecha).— Abajo: diagrama electroforético de la caseína disuelta en alcohol ácido sin calentar (izquierda) y calentada diez minutos a 65° (derecha). Por economizar espacio, sólo se dan los diagramas anódicos (en la figura 4 a se dieron para el ánodo y el cátodo).

el efecto de anticuerpos sin desnaturalizar; en los antiseros H, en cambio, casi sólo se manifiesta el primer proceso y no se verifica casi en absoluto la formación de las combinaciones inhibitoras; no existe, pues, sino en apariencia, diferencias en la resistencia contra el calor. En la *segunda fase* prosigue la desnaturalización y se destruye también la capacidad de fijar el antígeno. R. K. JENNINGS y L. de SPAIN SMITH (1942) pudieron apoyar la concepción de KLECZKOWSKI al

F. S. JONES (1928) confirmó estas observaciones, que, como se ve por lo expuesto en el texto, KLECZKOWSKI ha hecho extensivas a los sueros antivirales (de conejo).

demostrar que la desnaturalización de la globulina inmune de un suero antineumocócico de caballo transcurre, efectivamente, de modo distinto según que se caliente solo o en presencia de otra proteína. L. E. KREJCI, R. K. JENNINGS y L. DE SPAIN SMITH (1942) han contribuido también a que el supuesto anclaje de seroproteínas inespecíficas en la globulina inmune supere lo puramente hipotético. Como estos autores afirman, los diagramas electroforéticos de una disolución de caseína y de un anticuerpo, aislado, contra el polisacárido del neumococo tipo I, apenas se modifican cuando se calientan por separado (fig. 4 b); pero si se somete a la misma temperatura una mezcla de ambas sustancias, a la vez que se va perdiendo la capacidad floculante del anticuerpo, se modifica el diagrama de la mezcla en el sentido de que una parte del componente α de la caseína y una parte de la globulina y del anticuerpo adquieren la misma velocidad de electroforesis que el componente β de la caseína. El diagrama reproducido en la figura 4 a ilustra la modificación originada en la mezcla por una calefacción de 65° durante diez minutos. Esta modificación parece resultado de la acción recíproca de las dos sustancias y es, probablemente, la causa de la inactivación. Si la desnaturalización no progresa más, *puede aislarse, por fraccionamiento electroforético de la mezcla, la fracción de anticuerpo que conserva su velocidad de transporte*; reacciona, una vez aislada, con el polisacárido específico con formación de precipitado. En este experimento se ha mezclado un anticuerpo *aislado* con una proteína inespecífica y calentado la mezcla. Según la hipótesis de KLECZKOWSKI, se produce la misma fijación cuando se calienta un suero completo; en este caso la albúmina representa la sustancia que se fija a la globulina y al calentar y que provoca la transformación del anticuerpo en un derivado que ya no es floculante, pero que conserva la capacidad de combinación específica. Las investigaciones electroforéticas de sueros equinos normales e inmunes, calentados, efectuadas por J. VAN DER SHEER, R. W. G. WYCKOFF y F. L. CLARKE (1941) y L. E. KREJCI, L. DE SPAIN SMITH y T. J. DIETZ (1941), hablan también en favor de que las cosas suceden así efectivamente. Si se compara el diagrama de un suero equino antitoxico calentado con el del suero sin calentar, se observa una disminución de la albúmina de la globulina y del componente T, que corresponde a la antitoxina, y en su lugar aparece, como producto de agregación, el denominado componente "C". Los sueros antibacterianos se comportan de modo semejante, pero son mucho más sensibles que las antitoxinas [VAN DER SCHEER, WYCKOFF y CLARKE, KREJCI, DE SPAIN SMITH y DIETZ, D. H. MOORE, VAN DER SCHEER y

WYCKOFF (1940)] (1). No tenemos noticia de que se haya examinado si estas diferencias se pueden interpretar en el marco de la teoría que KLECZKOWSKI ha desarrollado apoyándose en la investigación de los sueros inmunes que floculan según los tipos O y H.

Un hecho experimental, bien establecido, independiente de toda teoría es que al comenzar el proceso de desnaturalización por el calor los sueros inmunes floculantes (aglutinantes o precipitantes) *originan derivados de los anticuerpos que ya no floculan, pero siguen combinando el antígeno, por lo que inhiben una reacción floculante homóloga*. Por ello, si sólo se determina la pérdida progresiva de la capacidad de floculación (por ejemplo, del título de aglutinación) no puede apreciarse en su totalidad la porción del anticuerpo que sigue conservándose y que puede demostrarse por la prueba de combinación (es decir, de inhibición), aunque ya no flocule. Esto se ha señalado con razón por KLECZKOWSKI (obra citada, pág. 206); según KLECZKOWSKI, de acuerdo con su teoría, el título de floculación sólo mide la destrucción de los anticuerpos cuando se trata de antisueros que presentan una floculación del tipo H, porque en ellos no juega ningún papel la formación de derivados del anticuerpo no floculantes, pero que continúan fijando el antígeno. En los trabajos emprendidos para estudiar la diferente resistencia al calor de los anticuerpos normales e inmunes y de los sueros correspondientes, no se ha tenido en cuenta esta circunstancia, aunque habitualmente se trataba de anticuerpos que floculan según el tipo O. [O. STRENG (1909), T. MADSEN y O. STRENG (1910) y otros]. Otras causas de error proceden del diferente contenido en los sueros investigados de proteínas, especialmente de albúmina, así como de que un suero normal, la mayor parte de las veces, poseen un título de anticuerpos muy inferior al de los correspondientes sueros inmunes, lo que, según las concepciones dominantes, debe depender de la menor concentración de la globulina inmune en el primero. La diferencia de título no puede compensarse por una dilución del suero inmune con disolución fisiológica de NaCl, porque ésta eleva la resistencia al calor (véase pág. 34); se debería, según STRENG, diluir con suero normal de la misma especie, que no influye tanto sobre la resistencia al calor; pero de este modo se crean, sin embargo, nuevas condiciones.

Estas consideraciones indujeron a K. LANDSTEINER y M. REICH a utilizar, además de sueros inmunes hemaglutinantes diluidos, *diso-*

(1) Consúltese R. DOERR (1947 a, págs. 27 a 31), donde también se reproducen diagramas electroforéticos de sueros normales e inmunes calentados.

luciones de aglutininas purificadas, obtenidas por su separación de los hematíes con que estaban ligadas, y que por su pequeño contenido de proteína permiten establecer su título por diluciones. Como los datos de estos autores fueron puestos en duda por STRENG, fundándose en sus experiencias con aglutininas bacterianas (véase pág. 33), E. PRÁSEK, discípulo de LANDSTEINER, emprendió en 1914 una comprobación de los resultados obtenidos con aglutininas normales e inmunes, y confirmó su diferente resistencia frente al calor. PRÁSEK estableció, especialmente, que la diferencia suele también apreciarse cuando se investiga el suero de un mismo animal antes y después de la inmunización, y que, con frecuencia, en el curso de reiteradas inyecciones del antígeno puede comprobarse un aumento gradual de la termorresistencia.

En la última edición de su conocida obra de *The specificity of serological reactions*, LANDSTEINER (1945, págs. 132 y 141) defiende la corrección de los resultados obtenidos de PRÁSEK, y subraya que ni ellos, ni otras muchas observaciones, como, por ejemplo, las diferencias, apreciadas por R. KLINGENSTEIN (1930), de termoestabilidad de las hemolisinas de la sangre de oveja, pueden hacerse concordar con la teoría de KLECZKOWSKI. Ahora bien, esta teoría resulta del análisis experimental de los fenómenos de floculación que corresponden a los tipos O y H, y se deduce de las diferencias de termoestabilidad observadas en los anticuerpos que participan en estas reacciones; por consiguiente, pueden ser justas en este campo (como parecen señalar las investigaciones electroforéticas) sin que por ello ofrezcan un explicación satisfactoria para todos los otros casos análogos. LANDSTEINER observa, además, en otro lugar (pág. 139), que la sorprendente labilidad de las hemaglutininas y el comportamiento contrario de las aglutininas bacterianas normales [O. E. JORDAN (1937)] pudieran tal vez deberse al distinto modo de originarse los anticuerpos existentes en el suero normal, opinión para la cual faltan actualmente otros puntos de apoyo que no sean el comportamiento expuesto frente al calor. *En definitiva, del comportamiento frente a temperaturas elevadas no puede deducirse si los anticuerpos que se descubren en un suero "normal" están producidos de modo espontáneo o como reacción frente a un estímulo inmunizatorio.*

c) *La avidéz de los anticuerpos normales.*

R. KRAUS, en 1903, pudo mostrar que el suero normal de cabra o caballo sólo pueden neutralizar la toxina aguda del vibrión de NASIK después de mantener su acción durante una hora a 37°, mientras que la antitoxina obtenida por inmunización paraliza inmediatamente la acción del veneno. Poco después, H. HEYROSKY y K. LANDSTEINER (1907) comunicaron que los anticuerpos normales e inmunes, en cantidades aproximadamente iguales, logran inhibir la acción de las hemotoxinas bacterianas si en ambos casos los componentes de la reacción se dejan en contacto durante suficiente tiempo; pero que el suero normal resulta casi inactivo si se analiza inmediatamente el efecto hemolizante de la mezcla, mientras que el efecto del suero inmune en esas condiciones es ya considerable. Estos experimentos indican que los sueros inmunes se caracterizan por una mayor velocidad, que debe atribuirse a la mayor afinidad del anticuerpo con su antígeno. Esta mayor afinidad también se refleja en que el complejo antígeno-anticuerpo, a saber, una hemaglutinina fijada a un eritrocito, se disocia con más dificultad, es decir, que cede menos anticuerpos cuando el anticuerpo del complejo procede de un suero inmune que cuando procede de un suero normal [K. LANDSTEINER y M. REICH (1905 b)]. Sin embargo, es sabido que la velocidad de reacción de los anticuerpos inmunes (antitoxinas, precipitinas, aglutininas) varía dentro de amplios límites, como se demostró primeramente, por R. KRAUS y R. DOERR (1905), para la antitoxina disentérica, y a continuación para la toxina diftérica [G. RAMON (1930), A. T. GLENNY, POPE y WADDINGTON (1925), GLENNY y U. WALLACE (1925), GLENNY y M. BARR (1932), M. BAHR y GLENNY (1938), Th. MADSEN y S. SCHMIDT (1929) y otros]. para la toxina tetánica [A. T. GLENNY (1936)]. para las hemolisinas y aglutininas [P. Th. MÜLLER (1909)] (1). Además, las combinaciones de los sueros inmunes con sus antígenos tampoco se disocian siempre del mismo modo; GLENNY, POPE y WADDINGTON (1925) pudieron comprobar, por ejemplo, que el grado de disociación observado en mezclas de toxina y antitoxina diftéricas puede variar con la muestra de antitoxina que se utilice en el ensayo. Una importancia fundamental tiene la observación efectuada por R. KRAUS y R. DOERR (1905) de que la velocidad de reacción específica de la antitoxina de la disenteria aumenta en el curso

(1) Más datos acerca de la avidéz de los sueros inmunes, en especial de los antitóxicos, se encuentran en H. SCHMIDT (1940).

de la inmunización. Por ejemplo, si se examinan persistentemente los sueros de cabras inmunizadas con la toxina de la *Shigella dysenteriae* no sólo se observa que aumenta el contenido de antitoxina, sino también que crece la velocidad de reacción de la antitoxina con la toxina; lo anterior se aprecia en ensayos *in vitro*, pero también se pone de manifiesto en los ensayos de neutralización *in vivo* (efecto curativo), que sólo se desarrollan y adquieren intensidad después de una inmunización prolongada. P. Th. MÜLLER (1908) confirmó estos resultados en pruebas efectuadas con anticuerpos designados de modo distinto (hemolisinas y aglutininas) y del aumento paulatino de la avidez de los anticuerpos, que pudo demostrar experimentalmente, llegó a la conclusión de que en un suero inmune pueden existir simultáneamente anticuerpos de distinto grado de afinidad, a saber, los antiguos procedentes de los primeros períodos de la inmunización, poco ávidos y los más recientes dotados de mayor avidez. Pueden aquí reconocerse los precursores de los "anticuerpos incompletos o indiferenciados" [compárase R. DOERR (1947), págs. 164-166 y pág. 35], y se recuerda que una inmunización prolongada puede modificar también otras propiedades del anticuerpo, aumentar, por ejemplo, el campo de especificidad o dar lugar, como sucede en el antisuero para el neumococo de caballo, a la aparición, junto a los anticuerpos pesados, de otros que posean el peso molecular de las globulinas normales [consúltese R. DOERR (1947, pág. 150 y pág. 47)].

Resulta claro que *esta plasticidad de los anticuerpos inmunes debe dificultar la comparación experimental con los anticuerpos de los sueros normales*. Cuando se aprecien diferencias manejando un material de investigación limitado, éstas pueden faltar en otros objetos, a pesar de una aparente identidad de circunstancias. Tales objeciones podrían justificar la revisión del planteamiento mismo del problema, es decir, la necesidad de demostrar que tienen sentido los esfuerzos para encontrar diferencias entre los anticuerpos normales e inmunes. Los anticuerpos en la forma en que se ofrecen habitualmente a la investigación experimental son seroglobulinas que pueden aislarse de un suero normal o del suero de un hombre o animal inmunizado. Desde que este conocimiento parece establecido de modo firme, resulta sin duda racional considerar la identidad bioquímica como punto de partida para perseguir otras propiedades *comunes* a los anticuerpos normales y a los obtenidos por inmunización. De este modo se vuelve automáticamente a la concepción defendida por J. BORDER (1910), N. NICOLLE (1908) y P. EHRLICH (en el campo de su teoría de las cadenas laterales) de que los anticuerpos inmunes son anti-

cuerpos normales más desarrollados o, expresado de modo más cuidadoso, especiales o también únicamente formas de ellos más acusadamente específicas. A continuación intentaremos estudiar si esta dirección de pensamiento es más fructífera que el establecimiento de diferencias a las que hasta ahora no puede concederse el carácter de criterio general.

d) *La especificidad de los anticuerpos normales.*

Se sabe, desde hace bastante tiempo, que el suero normal del hombre o de una determinada especie animal puede actuar aglutinando hematies de otra especie o un número mayor o menor de bacterias. J. BORDET (1899), en un estudio acerca del mecanismo de la aglutinación, subraya que este "fenómeno de la coagulación" no se distingue en apariencia de los efectos aglutinantes de los sueros inmunes específicos, y que los procesos íntimos deben ser idénticos. Un suero inmune específico para el cólera pierde su acción aglutinante por la adsorción a vibriones del cólera; del mismo modo puede inactivarse un suero normal de caballo que flocule los vibriones del cólera; en ambos casos el soporte de la función aglutinante se separa del suero por su fijación a las bacterias. BORDET completó la prueba con suero normal de caballo en un aspecto que resulta aquí especialmente interesante. El suero normal de caballo no sólo aglutina los vibriones del cólera, sino también otras bacterias, por ejemplo, los bacilos tíficos, y BORDET observó que la adsorción a vibriones del cólera no influye sobre las sustancias que aglutinan el bacilo tífico y que, recíprocamente, la acción aglutinante para los vibriones del cólera persiste si previamente se dejó reaccionar el suero con bacilos tíficos. BORDET considera este resultado como sorprendente (*assez curieuse*) y lo formula con las siguientes palabras: "Il semble donc tout à fait certain, que ces deux microbes différents prennent à un même serum deux agglutinines différents. Il semble que la spécificité des agglutinines, qui caractérise si nettement les sérums des vaccinés, existe déjà en germe chez l'animal neuf." G. M. MALKOFF (1900) publicó en el siguiente año resultados análogos observados en experimentos con sueros normales que aglutinaban diversos tipos de eritrocitos. El suero de cabra normal aglutina los hematies de paloma, conejo y hombre; cada una de estas especies de eritrocitos sólo elimina del suero la acción aglutinante homóloga, y si la adsorción se efectúa a dos de las células nombradas, persiste la actividad para la tercera (véase tabla 1).

TABLA I

Absorción selectiva de las hemaglutininas normales del suero de cabra, según G. M. MALKOFF (1900).

Antígeno que se ensaya.	Suero normal de cabra absorbido con				
	Hm. de paloma.	Hm. de conejo.	Hm. de hombre.	Hm. de paloma y conejo.	Hm. de paloma y hombre.
Hematías de paloma	-	+	+	-	-
Hematías de conejo	+	-	+	-	+
Hematías humanos	+	+	-	+	-

En 1902 A. CASTELLANI expuso sus reglas para las pruebas de saturación de los sueros inmunes con bacterias, que reproduciremos textualmente:

"I. El suero de un animal inmunizado contra un determinado microorganismo, al mezclarse con el mismo microorganismo pierde su capacidad de aglutinación para éste, así como para todos los otros en que el primero influya; mezclado con estos últimos pierde toda su capacidad de aglutinarlos, pero no, en grado apreciable, la de aglutinar el primero; mezclado con microorganismos sobre los que no influye conserva totalmente intacta su capacidad de aglutinación. II. El suero de un animal inmunizado contra dos microorganismos distintos A y B pierde, si se mezcla con A, su capacidad de aglutinarlo, pero no en grado apreciable, la de aglutinar B; si se mezcla con B, pierde su aglutinación para él, pero no en grado apreciable para A; si se mezcla con las dos bacterias, pierde el poder de aglutinar ambas."

El primer caso corresponde a la inmunización por un antígeno que produzca un anticuerpo que no sólo reaccione con el antígeno homólogo, sino también, a causa de que su especificidad no es absolutamente específica, con antígenos heterólogos, especialmente con antígenos emparentados; el segundo caso, a la inmunización por dos antígenos que naturalmente no posean entre sí relaciones de parentesco, que suele dar lugar a dos anticuerpos independientes entre sí, cada uno de los cuales sólo puede combinarse con el correspondiente antígeno. Se podría objetar que una especie de bacterias no representa un antígeno unitario en sentido químico, porque el cuerpo bacteriano contiene una pluralidad de sustancias diversas (proteínas, polisacáridos, endotoxinas, antígenos, O, H y Vi) que pueden separarse entre sí

y que, aislados, pueden desplegar las funciones de antígeno completo o de hapteno determinante de especificidad; según ello, la inmunización con una especie bacteriana teóricamente debe considerarse como la acción de una mezcla de antígenos. De hecho, sin embargo, el suero inmune conseguido por una sola especie bacteriana en la adsorción a bacterias homólogas y heterólogas se comporta de modo muy distinto que un suero inmune producido por una mezcla de especies bacterianas. Probablemente se debe a que en la célula bacteriana no existe una serie de antígenos completamente independientes, sino que, al menos en parte, la antigenicidad procede de un complejo coloidal de mayor tamaño con grupos determinantes [véase R. DOERR (1947, pág. 160)]. También podemos referirnos a un experimento de K. LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1936), en el que, como antígeno, se utilizó una azoproteína preparada con una combinación química definida (ácido metanílico, $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_3\text{H}$). El suero inmune obtenido con esta azoproteína no sólo reacciona con el antígeno homólogo, sino también con los ácidos o-aminobenzosulfónico, m-aminobenzolarsínico y m-aminobenzoico (o con las azoproteínas obtenidas con ellos); pero sólo la adsorción al antígeno homólogo elimina la capacidad de floculación con todas las sustancias emparentadas inmunoquímicamente, en tanto que la adsorción a una de las tres azoproteínas heterólogas sólo neutraliza la reactividad para ésta, pero no consigue inhibir las precipitaciones con los otros dos antígenos heterólogos ni con el homólogo. En este ensayo, la reacción principal y las reacciones secundarias sólo pueden deberse a la inmunización con el ácido metanílico, sustancia químicamente unitaria, y los resultados corresponden exactamente a la primera regla de CASTELLANI.

Pero los resultados experimentales de BORDET y MALKOFF no siguen esta regla, sino *muy claramente la segunda*; según ellos, por consiguiente, cada suero normal parece contener aglutininas específicas e independientes entre sí en un número dado por el cúmulo de las células aglutinables (bacterias, hematíes). La confianza en lo justo de esta conclusión vaciló, sin embargo, porque el número de tipos de células aglutinables por un suero normal puede ser muy grande, como se estableció, por ejemplo, para el suero de vaca [H. BROCKMANN (1911), K. LANDSTEINER y Ph. LEVINE (1932)]. K. LANDSTEINER (1945), por ello defiende la concepción de que los sueros normales sólo contienen un número relativamente pequeño de aglutininas independientes, y que la pluralidad de su capacidad de reacción sero-

lógica está condicionada por la pequeña especificidad de estos anticuerpos.

La expresión "escasa especificidad", tomada en sentido estricto, es una *contradictio in adjecto*. Para interpretar lo que ha querido significar LANDSTEINER en los casos estudiados debe tenerse presente que los anticuerpos de los sueros normales se comparan con las *fitaglutininas* de las semillas vegetales (abrina, ricina, y las fasinas no tóxicas de las papilionáceas) y con las *hemaglutininas de los virus*. El extracto de lentejas aglutina, por ejemplo, incluso en diluciones de 1:160, los hematíes de conejo, pero no actúa sobre los de paloma, por el contrario, la ricina aglutina energicamente los hematíes de paloma y en cambio no actúa, sino a elevada concentración, sobre los de caballo; el virus de la gripe del tipo A aglutina los hematíes de numerosas especies de sangre caliente y fría, pero no reacciona con los de vaca, cerdo, caballo y gato, mientras que el tipo B también flocula estos hematíes. De estos ejemplos deduce LANDSTEINER (1945, pág. 5) una *ampliación del concepto de especificidad*; define la especificidad como el efecto desproporcionado de un número de agentes semejantes sobre una serie de substratos emparentados ("the disproportional action of a number of similar agents on a variety of related substrata"). La suma especificidad de los anticuerpos inmunes no es, para LANDSTEINER, sino un caso límite debido a que el anticuerpo se adapta a la misma sustancia a que debe su formación. Sin entrar en una discusión por extenso, señalaremos únicamente que la definición de LANDSTEINER sólo puede aplicarse a la múltiple capacidad reaccional de los sueros normales, limitándose a considerar únicamente una categoría de células, por ejemplo, hematíes, y que, incluso en este caso, también es problemático si pueden considerarse como "substratos emparentados" los hematíes de paloma y los de mamífero; pero los sueros normales no sólo aglutinan hematíes serológicamente distintos y no emparentados, sino también, con frecuencia, una serie heterogénea de bacterias, como se observa, por ejemplo, en el suero vacuno [E. BÜRGI (1907)]. Por motivos análogos parece dudoso que queden situarse en una misma línea las reacciones de los sueros normales con las capacidades hemaglutinantes de las fitaglutininas y de los virus.

Ya, en el año 1911, K. LANDSTEINER, en colaboración con E. PRÁSEK, buscó una réplica experimental contra la opinión de la existencia de un número ilimitado de anticuerpos independientes en el suero normal, réplica que estaba fundada en su convencimiento de que los anticuerpos de los sueros normales, como los de los sueros inmunes, son proteínas que pueden descubrirse, y hasta un cierto grado determinarse cuantitativamente, por reacciones de precipitinas. Adsorbieron, en primer lugar, los sueros normales a hematíes aglutinables (por ejemplo, suero de vaca, a hematíes de caballo) y a continuación lavaron los hematíes con disolución de NaCl en agua de hielo, los digirieron en disolución de NaCl a 48-50° durante media hora y, evitando su enfriamiento, los centrifugaron rápidamente. La digestión a esta temperatura provoca el desdoblamiento del anticuerpo ligado, que de

este modo se encuentra, en estado purificado, en el líquido sobrenadante, que puede separarse por decantación. Este anticuerpo "purificado" no sólo aglutina los hematíes utilizados para la adsorción, sino también, aunque con menos energía, los de otras especies, de lo que se deduce la escasa especificidad de los anticuerpos normales. En segundo lugar, estas disoluciones de anticuerpos dieron precipitados específicos con una precipitina de conejo contra el suero normal investigado (el suero de cabra), de lo que se deduce que el anticuerpo existente en el suero normal de cabra debe ser una seroproteína precipitable, por lo que puede tasarse considerando la cantidad de la proteína precipitable por los hematíes; esta cantidad resulta tan grande que no puede admitirse que, en muchos sueros normales, por ejemplo, en el de bovino, existan un número ilimitado de anticuerpos, porque entonces cada anticuerpo debía radicar en una cantidad de proteína casi infinitesimal. Toda la aportación de pruebas descansa, sin embargo, en la suposición previa de que una especie determinada de hematíes sólo puede fijar uno de los anticuerpos existentes en un suero y que, por ello, al disociar esta combinación sólo se libera un anticuerpo, o como se expresa actualmente, una globulina inmune. Sin embargo, O. THOMSEN (1931), en una breve comunicación acerca de la *combinación secundaria* como causa de error al obtener "disoluciones de aglutininas purificadas", señala que lo supuesto no se produce necesariamente. Por ejemplo, si se mezclan suero de un hombre del grupo B con hematíes A, éstos se cargan con la aglutinina α ; si estos mismos hematíes se llevan después a un suero A, captan la aglutinina β , mientras que los hematíes A no tratados previamente no pueden fijarla. Según ello, los hematíes A del suero de un individuo del grupo $O\alpha\beta$ no sólo absorben la aglutinina homóloga α , sino también, aunque pequeña proporción, la β , y si las aglutininas ligadas se disocian por el calor, no se obtiene una disolución pura de α , sino una disolución de α que contiene, como impureza, el anticuerpo heterólogo β para el cual, sin embargo, no poseen receptor los hematíes A [O. THOMSEN y E. WORSAAE (1929)]. THOMSEN cita en otro lugar una serie de experiencias análogas, entre ellas la observación de que los hematíes A del hombre, cuando se mezclan con un suero inmune anti-A de conejo, adsorben no sólo la aglutinina anti-A (α), sino también aglutininas para hematíes animales, esto es, heteroaglutininas.

J. BORDET (1920-1939), en la segunda edición de su *Traité de l'immunité*, se ha manifestado con muchas reservas acerca de los experimentos de LANDSTEINER con aglutininas purificadas; aduce, a este

respecto, los datos de C. E. BAILEY, de los que se deduce que los métodos de adsorción pueden suministrar resultados de interpretación difícil. BAILEY (1923) observó, por ejemplo, que de un suero normal de gallina que aglutinaba los hematíes de conejo y cobayo podían eliminarse totalmente las aglutininas de cobayo por adsorción a sangre de conejo, mientras que las aglutininas de conejo sólo se adsorbían de modo parcial a la sangre de cobayo. El resultado, por consiguiente, está de acuerdo con la regla primera de CASTELLANI, pero no con la segunda, como en los experimentos de J. BORDET y G. M. MALKOFF (véase pág. 43); si se tratara de un suero inmune, habría que considerar que el anticuerpo que provoca la aglutinación de los hematíes de conejo es una "aglutinina principal" producida por la acción de un antígeno homólogo, aglutinina que da una reacción de parentesco con los hematíes, emparentados, de otro roedor: el cobayo.

El mismo LANDSTEINER (1945, pág. 129) opina que, de momento, existen contradicciones que habrá que resolver por ulteriores investigaciones. Como solución provisional racional, teniendo en cuenta las observaciones anteriores, pudiera aceptarse la hipótesis de que los anticuerpos naturales actúan en grado diferente sobre distintas células [consúltese C. H. BROWNING (1931)]. Por consiguiente, si se admite que un suero normal contiene un suficiente número de aglutininas, cada una de las cuales sólo puede reaccionar con determinada proporción de todos los hematíes, por la absorción con una especie de hematíes, se fijarían todas las aglutininas que poseen afinidad para él, y restarían aún algunas aglutininas libres que podrían reaccionar con sangre fresca de otras especies.

Esta concepción, sin embargo, quita valor a los experimentos de K. LANDSTEINER y E. PRÁSEK (1911), pues si un hematíe puede fijar varias aglutininas que, además de su afinidad común, posean la capacidad de reaccionar con otros hematíes, por el desdoblamiento de tales adsorbatos no pueden obtenerse soluciones purificadas de un solo anticuerpo, aun prescindiendo de los enlaces secundarios inespecíficos; de la disociación resultaría una mezcla de anticuerpos de modo que resulta insegura cualquier afirmación acerca de la cantidad de sus componentes, determinada con auxilio de la prueba de precipitinas, porque una precipitina obtenida por inmunización con un suero normal, por ejemplo con suero de cabra, flocularía el total de globulinas-anticuerpos, y al efectuar la disociación quedarían todos disueltos.

Las consideraciones anteriores se refieren a las *aglutininas* que se descubren en los sueros normales y que actúan sobre bacterias o hematíes. Sin embargo, los sueros normales en estado fresco pueden actuar también de modo *citotóxico* o *citolítico* sobre los citados tipos.

de células, acción que pierden si se calientan a 56° y recuperan por la adición de complemento. En lo que respecta a un suero inmune citotóxico, este comportamiento se explica porque en la lesión de las células cooperan dos factores, el anticuerpo termoestable específico, que se combina directamente con la célula a la que debe su formación, y el complemento termolábil inespecífico, que existe en el suero normal fresco, y que sólo se fija a la célula ya cargada (sensibilizada) de anticuerpo (amboceptor); la concentración del anticuerpo aumenta por el proceso de la inmunización, que no influye, en cambio, sobre la del complemento. Este esquema establecido por J. BORDET y P. EHRLICH para los sueros inmunes, que indudablemente obedecen a él, ¿puede aplicarse, en todos sus extremos, a los efectos citotóxicos de los sueros normales? Como H. SACHS (1929, págs. 787 a 790) expone, debe considerarse como demostrada la constitución compleja de las *hemolisinas normales*, tanto para las hemolisinas existentes en los sueros de animales de sangre caliente como para las existentes en los de sangre fría; también ha podido observarse la acción combinada de un amboceptor específico termoestable y del complemento inespecífico termolábil para conseguir el efecto lítico final que se observa operando con gran número de sueros de distintas especies y hematíes extraños; las isolisinas del suero humano no constituyen excepción [O. THOMSEN y A. THISTED (1928)].

Por el contrario, está en contradicción con estas opiniones la interpretación del modo de actuar los anticuerpos normales bactericidas. De acuerdo con numerosos datos, que comienzan a recogerse en los primeros tiempos de las investigaciones sobre inmunidad, debe admitirse que los sueros de animales normales pueden actuar matando diversas bacterias patógenas. Así, T. J. MACKIE y M. H. FINKELSTEIN (1930, 1931, 1932) observan que los sueros de carnero, vaca, hombre, rata, cerdo, caballo, conejo, cobayo y paloma (1) poseen anticuerpos bactericidas para una serie de bacterias Gram negativas (especies de *Salmonella*, bacilos de la disentería, vibriones del cólera, gonococos, meningococos, especies de *Brucella*, *Proteus*, *Pyocyanus* y otros). También en este caso se comprobó la cooperación de dos

(1) En esta serie se han ordenado los sueros normales por orden decreciente de la intensidad de sus acciones bactericidas. Están de acuerdo, en general, con las expuestas por E. BÜRGI y H. J. GRASOS (véanse págs. 157 y 159); pero se observan algunas divergencias que tal vez quepa atribuir a la diferencia de las reacciones serológicas utilizadas (aglutinación, reacción bactericida con ayuda de complemento).

factores, se identificó uno de ellos (el termolábil) con el complemento, y se apreció la termoestabilidad del otro factor. La controversia se levantó únicamente acerca de la *especificidad del factor termoestable del suero normal, correspondiente al amboceptor del suero, inmune, y acerca del problema, que deriva de ello, de si en el suero normal existe o no un número de bactericidas independientes igual al número de especies bacterianas sensibles*. Se trata, pues, sólo del problema anteriormente debatido y del que no pudimos comunicar ninguna solución satisfactoria (véanse págs. 44 y siguientes), que este campo especial de las acciones bactericidas de los sueros normales adquirió una independencia inmotivada. MACKIE y FINKELSTEIN afirman que el factor termoestable puede separarse de los sueros normales por adsorción a bacterias sensibles, y que la adsorción manifiesta carácter específico, puesto que los sueros adsorbidos pierden su acción sobre las bacterias utilizadas para la adsorción, mientras que siempre conservan su efecto bactericida para otras bacterias. J. GORDON expuso, en una serie de publicaciones, un punto de vista enteramente diferente [J. GORDON y H. S. CARTER (1932), J. GORDON (1933)]. GORDON y CARTER adsorbieron sueros normales de cobayo y de conejo a suspensiones de bacterias muertas (especies de *Salmonella*, bacilos de la disentería, vibriones del cólera) y observaron que por la adsorción no sólo desaparece la acción bactericida sobre el germen utilizado para la adsorción, sino también sobre otras bacterias. La adsorción, por consiguiente, no puede considerarse como específica en el sentido estricto corriente. Si para la adsorción se utiliza pequeña cantidad de bacterias, el suero adsorbido continúa ejerciendo efecto bactericida, pero sólo sobre especies sensibles, como el *Vibrio cholerae* o el *Shigella dysenteria*, resultando inactivo para las bacterias resistentes (*Salmonella paratyphi* B); pero este resultado es independiente de la especie de la bacteria utilizada para la adsorción, y parece deberse a la menor o mayor resistencia de la bacteria testigo frente al efecto dañino para ella. De ello se deduce "que la capacidad bactericida de un suero normal (que se elimina por adsorción a bacterias muertas y que puede restablecerse por adición de suero caliente, exento de complemento) se debe a un factor inespecífico del suero, el complemento, y a un factor termoestable, pero no a la existencia de una serie de anticuerpos naturales específicos". J. GORDON (1933) confirmó en seguida los resultados de sus experimentos en colaboración con CARTER y reforzó su concepción mediante el siguiente experimento: si un suero normal, calentado, capaz de matar en estado fresco a las especies de bacterias B y D, se adsorbe por una parte a B y

por otra a D, y se mezclan entre sí las dos muestras adsorbidas, esta mezcla, si las adsorciones fueran específicas, desplegaría, con ayuda de complemento, el efecto bactericida total del suero nativo. Pero, sin embargo, se observa que al mezclar suero adsorbido calentado con suero adsorbido calentado no se restablece la capacidad bactericida del suero, y en estas circunstancias, opina GORDON, no se ve cómo puede admitirse la existencia en los sueros normales de una serie de factores bactericidas específicos. MACKIE y FINKELSTEIN (1931) habían añadido que, en muchos casos, puede adquirirse con facilidad la completa certeza de que las bacterias fijan en un suero normal anticuerpos sensibilizantes específicos que permiten la acción del complemento. Sin embargo, GORDON no pudo convencerse de que las bacterias vivas (vibriones del cólera, bacilos de la disentería, especies de Salmonella) se comporten de modo distinto, en su capacidad de multiplicación, cuando se siembran sin tratamiento previo o después de haberlas puesto en contacto con suero normal calentado. Precisamente en la misma época, R. LOVELL (1933) pudo descubrir en suero normal de cerdo aglutininas específicas para diversas Salmonellas que pueden eliminarse, de modo específico, del suero de cerdo por adsorción a especies aglutinables particulares; es decir, que después de adsorbido el suero conserva la acción aglutinante para las especies bacterianas no utilizadas para la adsorción. Estos resultados, que señaló W. W. C. TOPLEY, incitaron a GORDON a repetir sus experimentos trabajando con suero de cerdo, pero obtuvo los mismos resultados que con los de cobayo y conejo, lo que significaba una contradicción con la existencia de aglutininas específicas adsorbibles, que GORDON no intentó interpretar.

En trabajos ulteriores [J. GORDON y L. HAYLE (1936), GORDON y K. I. JOHNSTONE (1940)], en los que se utilizaron también otras bacterias para las experiencias de adsorción, se observó, sin embargo, cierto grado de especificidad, ya que utilizando grandes masas de determinadas bacterias (calentadas) se observa una reducción del efecto bactericida para todos los microorganismos ensayados, *pero particularmente para el germen utilizado para la adsorción*. Según GORDON y JOHNSTONE, se está ante la alternativa de admitir que en el suero normal no sólo existen varios anticuerpos específicos, sino además un número ilimitado de anticuerpos adaptados a determinadas estirpes o aceptar que sólo existe un único anticuerpo bactericida que al ponerse en contacto con grandes cantidades de una especie, o estirpe, bacteriana cualquiera se modifica de modo que pierde su actividad para esta especie o estirpe. Pero no es, en absoluto, necesario decidirse por una de estas dos posibilidades porque LANDSTEINER había señalado mucho antes una tercera solución hipotética, a saber: que en el suero normal puede existir un número relativamente corto de anticuerpos (amboceptores normales) con especificidad poco acusada. El hecho de

que hayan podido establecerse adsorciones específicas no sólo para distintas especies bacterianas, sino para determinadas estirpes de una especie (por ejemplo, para determinadas estirpes de meningococos y de *M. catarrhalis*), no obliga a aumentar hasta lo desmesurado el número de anticuerpos contenidos en un suero normal. Cuando el factor termoestable de un suero normal se adsorbe de modo específico a una determinada estirpe de una especie bacteriana y no lo hace a otra, debe atribuirse en primer lugar a que las "especies bacterianas" de las primeras épocas de la investigación bacteriológica no eran, de ningún modo, homogéneas en cuanto a la especificidad de su complejo antigénico, sino que dentro de una "especie" han podido apreciarse considerables diferencias de especificidad entre los tipos o variantes, así como existe la posibilidad verosímil de que un tipo se transforme en otro del que difiera por su especificidad. Tampoco es seguro que los anticuerpos normales del suero sanguíneo de una determinada especie animal sean globulinas de capacidad reaccional constante y cualitativamente inmutable con antígenos definidos. En los sueros inmunes, incluso en los obtenidos con antígenos químicamente unitarios, no se observa esto, sino más bien que la especificidad disminuye en el curso de una inmunización progresiva. [véase R. DOERR 1947, pág. 88 y siguiente, y 150 y siguiente]. Puede admitirse una variabilidad análoga en los anticuerpos naturales, si bien es dudoso que en este caso intervengan también estímulos antigénicos repetidos; pero los anticuerpos naturales son perennes, es decir, se destruyen y vuelven a formarse de modo continuo y son, *a priori*, probables pequeñas aberraciones de estas síntesis de globulinas que se sostienen durante años y decenios.

GORDON y JOHNSTONE han publicado un trabajo sobre la variabilidad del anticuerpo de un suero normal de determinada procedencia. Comprobaron la acción bactericida del suero de 6 personas sobre 5 estirpes distintas del *Vibrio cholerae*. 3 sueros mataron rápidamente todas las estirpes, los otros 3 dejaron intactas determinadas estirpes que no siempre eran las mismas; 2 de las estirpes ensayadas murieron rápidamente por efecto de los 6 sueros. Fundándose en estas observaciones y en otras análogas efectuadas con gonococos, GORDON y JOHNSTONE consideraron que el método por ellos utilizado es apropiado para establecer, con auxilio de sueros normales, determinadas diferencias antigénicas entre diversas estirpes de algunos microbios, gracias a la "variabilidad y aparente pluralidad de los anticuerpos del suero normal". Con ello, la discusión acerca de la especificidad o inespecificidad de los anticuerpos normales parece volver al punto en que primeramente estaba.

e) *La aparición de anticuerpos normales en la sangre.*

En el suero sanguíneo del recién nacido, o de hombres o animales muy jóvenes, faltan los anticuerpos naturales; sólo aparecen después de algún tiempo de crecimiento extrauterino. Este hecho ha sido ates-

tiguado siempre por numeroso autores, entre ellos por H. LÜDKE (1905), H. BRAUN (1909), H. W. SHERMAN (1919), L. HIRSZFELD (1926), H. J. GIBSON (1930), E. FRIEDBERGER, G. BOCK y A. FÜRSTENHEIM (1929), FRIEDBERGER y D. GAJZÁGÓ (1930), R. LOVELL (1934), E. O. JORDAN (1937) y otros.

Fácilmente se entiende que la dependencia entre la aparición de los anticuerpos naturales y la edad puede, en principio, explicarse de dos modos. O se admite que estas sustancias se producen sólo cuando han actuado sobre el organismo impulsos inmunizantes, o que la capacidad de producción de anticuerpos únicamente se desarrolla al llegar a determinada edad. Esta alternativa no coincide en modo alguno (lo que muchos autores pasan por alto) con las hipótesis acerca del origen de los anticuerpos naturales, que unos autores radican en la acción patológica de estímulos antigénicos específicos de origen exógeno y, otros, en procesos metabólicos endógenos, determinados fisiológicamente e independientes de todo estímulo exterior. Si el organismo, en el primer estadio subsiguiente a su nacimiento, es incapaz de producir anticuerpos, éstos no podrían formarse ni de un modo ni de otro.

Las importantes investigaciones de C. E. BAILEY (1923) brindan una orientación. BAILEY observa que el suero de pollo carece de hemaglutininas normales que aparecen con su crecimiento; pero pudo observar también que los pollos tampoco reaccionan, frente a la inmunización con hematíes de otra especie, con formación de aglutininas. El tiempo de la aparición de los anticuerpos normales, formados sin estímulo antigénico específico, coincide con la iniciación de la capacidad de formar anticuerpos inmunes.

¿A qué se debe la incapacidad del recién nacido de producir anticuerpos?

L. HIRSZFELD (1926) responde a esta cuestión por su teoría de la "maduración serológica". Considera los anticuerpos normales como un "órgano bioquímico" cuyo desarrollo ontogénico está fijado filogénicamente y sometido a leyes análogas a las que presiden el desarrollo de los caracteres anatómicos. Es sabido que los distintos órganos y tejidos del cuerpo comienzan a crecer en determinados períodos de la vida y alcanzan en otros madurez completa; pues bien, a esta "morfogénesis" corresponde una "serogénesis" que posee una historia de desarrollo determinada y que encuentra su manifestación fenotípica en que los anticuerpos normales sólo se observan "a partir de determinada fase de la vida que HIRSZFELD denomina "punto de inflexión inmunológica". Ahora bien, tanto los anticuerpos normales como los

inmunes son seroglobulinas que en los diagramas electroforéticos de los sueros ocupan el lugar de las globulinas γ o β , o que están localizadas entre ambas, y que son, como otras proteínas del plasma, productos del metabolismo proteico. Por ello parece inapropiado designarlas como "órgano bioquímico", incluso en sentido figurado; los órganos que sólo empiezan a funcionar algún tiempo después del nacimiento pudieran únicamente ser las células en que se sintetizan las seroglobulinas citadas, y la ausencia de anticuerpos normales, así como la incapacidad de producir anticuerpos inmunes debería entenderse como el período de producción insuficiente de globulinas o de producción de globulinas no suficientemente específicas.

En la literatura reciente se encuentran algunos datos que pueden interpretarse en este sentido, aunque con algunas reservas. E. JAMESON, C. ALVAREZ TOSTADO y H. H. SORTOR (1942) investigaron el comportamiento electroforético de muestras de suero de terneras recién nacidas, antes de recibir calostro, y otras obtenidas posteriormente, a intervalos primero cortos y después más largos. Los resultados se recogen en la tabla 2.

TABLA 2

Modificaciones de la composición del suero de ternera recién nacido al aumentar su edad.

(Las cifras indican la participación de las fracciones en las proteínas totales del suero en tantos por ciento, según JAMESON, ALVAREZ TOSTADO y SORTOR, 1942.)

Edad.	Albumina.	α -globulina.	β -globulina.	γ -globulina.
Recién nacidas.....	57,3	36,8	5,9	—
18 horas.....	49,5	35,3	9,2	6,0
36 horas.....	29,8	21,8	7,2	41,6
3 días.....	27,3	17,8	5,7	49,2
5 días.....	34,9	10,5	6,0	48,7
2 años.....	40,2	9,9	6,2	43,7

Inmediatamente después del nacimiento el suero no contiene γ -globulina, y sólo pequeña cantidad de β -globulina; después de tomar calostro se modifica rápidamente la composición del suero, aparece la γ -globulina y aumenta el contenido de β -globulina, reduciéndose los de α -globulina y albúmina. A los mismos resultados llegó A. POLSON (1943) con potros recién nacidos: inmediatamente después del nacimiento el suero equino carece de β y α -globulinas (o sólo existen en concentraciones mínimas), pero aumentan rápidamente durante la lactancia, y al cabo de ocho meses alcanzan el 50 por 100 de las seropro-

teínas totales. De estos datos sólo se descubre que aumenta tal contenido inmediatamente después del nacimiento, ya que en ellos lo que se aprecia es lo defectuoso de los diagramas electroforéticos del suero de los animales recién nacidos. Sin embargo, la rápida modificación del espectro de las globulinas desde el comienzo mismo de la lactancia no puede atribuirse, sin más, al despertar de una activa autoproducción de globulinas γ y β , sino, con toda probabilidad—al menos en los primeros tiempos—, a una administración pasiva de estas globulinas especiales con el calostro. En favor de esta opinión abonan las antiguas investigaciones de L. W. FAMULENER (1912), que inmunizó cabras preñadas con hematies de oveja y observó que las hemolisinas de la madre no pasaban por vía placentaria a hijos, sino por el calostro, rico en hemolisina; la sangre de los cabritos no contienen hemolisinas hasta que comienzan a mamar. A los mismos resultados llegaron P. E. HOWE (1921, 1922), en sus investigaciones en terneras recién nacidas, y J. L. LEWIS y H. G. WELLS (1922) en niños recién nacidos; inmediatamente después del nacimiento el suero sanguíneo resulta sorprendentemente pobre en euglobulina, es decir, en las fracciones de globulinas que se pueden precipitar por concentraciones de menos del 17,4 por 100 de sulfato sódico; durante la primera semana del nacimiento se eleva el contenido de estas globulinas, rápidamente cuando se toma calostro y lentamente cuando falta en la alimentación, hasta adquirir la concentración que ofrece en los individuos adultos. Lo mismo comprobó J. TOGAMA (1919) en ratas blancas, que, pobres en globulinas al nacer, las van adquiriendo paulatinamente con la edad. De estos trabajos se deduce que en el momento de nacer las globulinas lábiles faltan en el suero de todas las especies de mamíferos investigadas, o sólo se encuentran en concentraciones muy bajas; que la alimentación con calostro proporciona en el primer período de la vida una administración pasiva, y que la producción pasiva propia sólo se inicia posteriormente y se intensifica luego de modo paulatino.

Según investigaciones recientes que se ocupan principalmente de la comparación del suero (o plasma) humanos, fetal y materno, efectuadas con ayuda de fraccionamientos por salado, resulta que aunque la concentración de la proteína en el suero fetal es más baja que en el suero normal de adultos, la proporción entre albúmina y globulina no difiere considerablemente [E. D. PLASS y C. W. MATTEWS (1926), M. RAPPOPORT, M. D. RUBIN y D. CHAFFEE (1943), V. TREVORROW, M. KASER, J. P. PATTERSON y R. M. HILL (1942)]. I. G. LONGSWORTH, R. M. CURTIS y R. H. PEMBROKE (1945) se dijeron que, en primer

lugar; habría que procurar distinguir las globulinas inmunes y las globulinas inactivas desde el punto de vista inmunológico para poderse explicar la conocida inmunidad del recién nacido frente a las enfermedades infecciosas, lo que, hasta cierto grado, sería posible con auxilio de electroforesis; aunque no toda la γ -globulina del suero sanguíneo pueda considerarse como globulina inmune, está justificado concebir que las globulinas inmunes se comportan normalmente como globulinas γ en el campo potencial de la corriente eléctrica. Por ello los autores citados estudiaron 10 pares de sueros, o plasmas, maternal y fetal, y compararon los diagramas entre sí y con los conseguidos por V. P. DOLE (1944) con plasma de adultos normales. Resultó que las concentraciones absolutas y relativas de globulina γ resultaban más elevadas en las muestras fetales que en las del suero materno o que en los adultos normales. Dejando aparte que estos descubrimientos están en contradicción con los resultados de la investigación electroforética en terneros y potros recién nacidos (véase pág. 52), LONGSWORTH y colaboradores tampoco aportan ninguna prueba de que el exceso de globulina γ observado en el suero fetal consistiera en globulinas inmunes, de modo que las observaciones objetivas resultaban incompletas con respecto al problema planteado; tampoco se precisó si la globulina γ en exceso era un producto del organismo fetal o procedía de la madre y el feto sólo lo almacenaba. Por ello las observaciones de LONGSWORTH deben completarse con otros métodos de fraccionamiento. Entretanto hay que atenerse a los experimentos con globulinas "marcadas"; en primer lugar, a lo que se conoce de las isoaglutininas del suero humano.

Las *isoaglutininas* del hombre pueden servir como prototipo de anticuerpos normales producidos espontáneamente, habiéndose investigado cuidadosamente las circunstancias de su aparición y de su riqueza a lo largo de toda la vida. Ahora bien, en el suero de los recién nacidos pueden observarse con frecuencia (aproximadamente en la mitad de los casos), lo que parece estar en oposición tanto con la teoría de HIRSZFELD como con la opinión de una síntesis defectuosa de globulinas. Sin embargo, según L. HIRSZFELD (1926) [véase también HIRSZFELD y H. ZBOROWSKI (1925)], estas isoaglutininas proceden de la sangre de la madre y alcanzan por vía diaplacentaria la circulación del feto. Esto se demuestra porque en el suero de los recién nacidos nunca se encuentran aglutininas capaces de reaccionar con los hematíes de la madre y que por ello sólo pudieran haberse producido en el feto, hecho establecido con seguridad no sólo por HIRSZFELD y colaboradores, sino también por autores antiguos y

recientes en numerosas investigaciones [CHERRY y LANGROCK (1916), B. DE BIASI (1923), S. H. POLAYES, M. LEDERER y A. S. WIENER (1929), P. MORVILLE (1929), O. THOMSEN (1932)]. Además A. S. WIENER y SILVERMAN (1940) compararon el contenido de isoaglutininas, de otras hemolisinas y de reagentes sifilíticas en la sangre de la madre y en el cordón umbilical, observándose valores aproximadamente iguales (8:1 a 12:1) (1), con lo que vuelve a confirmarse el paso de las isoaglutininas por vía placentaria, en contraste con otros anticuerpos, por ejemplo, con las reagentes sensibilizantes de la piel y transmisibles por vía pasiva, que no son cedidas al feto por la madre alérgica [S. D. BELL y Z. ERICKSON (1931), A. H. W. CAULFIELD (1936), W. B. SHERMAN, S. F. HAMPTON y R. A. COOKE (1940)]. Finalmente, C. H. SMITH (1928) investigó diariamente la sangre de niños recién nacidos durante la primera semana después del nacimiento, y observó que las isoaglutininas existentes al nacer descendían en general al cabo de diez días y en muchos casos desaparecían por completo y se sustituían por otras isoaglutininas, producidas, evidentemente, por el organismo infantil.

La producción propia comienza, en general, entre los tres y seis meses después del nacimiento (2), pero no de modo que las isoaglutininas posean inmediatamente su título máximo; más bien, por el contrario, el título sube hasta el décimo año de la vida y después desciende paulatinamente hasta llegar, en la clase constituida por los individuos de edad máxima, al nivel de los sueros de lactantes [O. THOMSEN y K. KETTEL (1929)]. Si se compara el contenido de isoaglutininas en distintos sueros de hombres adultos, utilizando como medida los títulos de aglutinación, se observan diferencias considerables que no pueden explicarse por los errores de las determinaciones (3) [F. SCHIFF y S. MENDLOWICZ (1926), K. KETTEL (1930)].

(1) Según W. B. SHERMAN y colaboradores (1940), que ciertamente sólo compararon en cuatro casos el título de las isoaglutininas en la madre y en el hijo, las proporciones pueden variar entre límites algo más altos.

(2) Por ello, en una serie de casos, y en determinadas circunstancias, transcurre un período bastante largo durante el cual el suero del recién nacido no contiene casi isoaglutininas; este hecho no tiene otra interpretación sino que los anticuerpos transmitidos por la madre por vía pasiva se destruyen antes de ser sustituidos por la producción propia. En otros casos no ha podido demostrarse tal intervalo, exento de aglutininas, a pesar de repetirse las investigaciones continuamente [P. MORVILLE (1929, 1930)]; a pesar de ello, para los problemas que se discuten en este lugar, lo decisivo son los resultados positivos.

(3) Hay que tener en consideración principalmente: 1, la aglutinabilidad variable de los hematíes ensayados; 2, los estados patológicos de los individuos de

Considerando el contenido observado por K. KETTEL en 575 sueros de adultos normales, A. S. WIENER (1945, pág. 23) ha representado la variabilidad de los títulos en α y β -aglutininas por las curvas que se reproducen en la figura 5. Se observa que para ambas isoaglutininas existe un "valor de frecuencia máxima" que para la aglutinina β es 1:16, y para la aglutinina α de 1:64, y que las desviaciones con respecto a ese valor de frecuencia máxima se agrupan, aproximadamente, con arreglo a la curva binómica. Los valores extremos en los datos de KETTEL son: para la β -aglutinina 1:1 y 1:512, y para la α -aglutinina 1:4 y 1:1024. Como promedio, por consiguiente, el título de la α -aglutinina es algo más elevado que el de la β -aglutinina, lo que, según las investigaciones de O. THOMSEN y KETTEL, no sólo resulta válido para los individuos adultos, sino para todas las clases por edad.

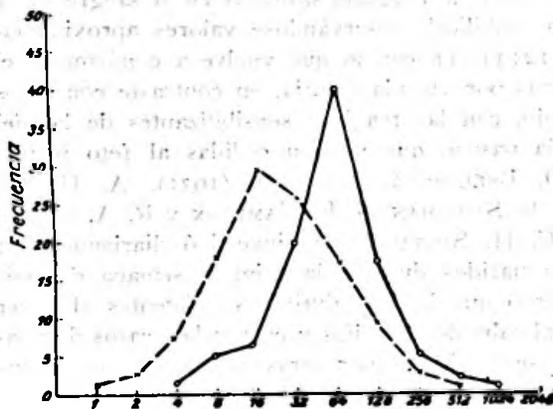


Fig. 5. Diferencias en el título de isoaglutininas observadas en suero de adultos normales. La línea densa corresponde a la α -aglutinina y la punteada a la β -aglutinina. Curva trazada por A. S. WIENER considerando los datos de K. KETTEL.

nas existe un "valor de frecuencia máxima" que para la aglutinina β es 1:16, y para la aglutinina α de 1:64, y que las desviaciones con respecto a ese valor de frecuencia máxima se agrupan, aproximadamente, con arreglo a la curva binómica. Los valores extremos en los datos de KETTEL son: para la β -aglutinina 1:1 y 1:512, y para la α -aglutinina 1:4 y 1:1024. Como promedio,

por consiguiente, el título de la α -aglutinina es algo más elevado que el de la β -aglutinina, lo que, según las investigaciones de O. THOMSEN y KETTEL, no sólo resulta válido para los individuos adultos, sino para todas las clases por edad. THOMSEN y KETTEL no han podido explicar por qué se reduce el título de aglutininas después de los diez a doce años de edad (véase pág. 55). Observan que un título bajo, en un individuo, no tiene una significación única, ya que puede atribuirse tanto a que el individuo posea una producción de aglutininas débil o a la influencia de la edad. Con respecto a la variabilidad individual en la producción de aglutininas habla el hecho de que también en la edad juvenil, en que el título de aglutininas alcanza, como promedio, su punto más elevado, se encuentren individuos con título bajo (1:4, 8 ó 16); por otra parte, muchos sueros de personas de edad poseen un título elevado (1:256 ó

que proceden los sueros investigados; 3, las alteraciones que experimentan los sueros con aglutininas a consecuencia de una conservación prolongada o en condiciones no convenientes.

más), y resulta dudoso si estos hallazgos, relativamente raros, deben atribuirse a una formación particularmente enérgica de aglutininas o a una especial resistencia contra la influencia reductora de la edad. THOMSEN y KETTEL no han podido apreciar ninguna relación entre la reducción del título de aglutininas con la edad y el desarrollo de la arterioesclerosis; en cien individuos con arterioesclerosis más o menos acusada, los títulos de aglutininas no se desvían apreciablemente de los valores de la edad correspondiente, y se observan casos de arterioesclerosis manifiesta con título de aglutininas relativamente alto (1:128 a 256). Los autores citados tampoco pudieron observar una conexión entre la reducción por la edad del título de aglutininas y el sexo.

F. SCHIFF y L. MENDLOWICZ (1946) tuvieron oportunidad de estudiar el suero en 31 casos de leucemia, entre ellos 10 de leucemia linfática y 16 de leucemia mielótica. Los títulos de aglutininas eran sorprendentemente bajos, observándose títulos de 1:1 a 1:16 en la mitad, aproximadamente, de las aglutininas valoradas, mientras que, de 275 sueros testigo, no ofrecían estos valores, sino la tercera parte. El producto estudiado comprendía únicamente personas de once a ochenta años; faltaban, por consiguiente, los primeros diez años (lo que tiene importancia porque las leucemias, en especial las linfáticas, son frecuentes en los primeros años de la niñez), y, además, la edad de los pacientes leucémicos sólo se consignaba en 6 de 31 casos. Las muestras de sangre investigadas por SCHIFF y MENDLOWICZ procedían, en parte, de hospitales de Berlín (1), y en parte de hospitales extranjeros, por lo que podía haber modificado el título la duración del período de conservación a temperaturas altas y también, tal vez, alguna contaminación bacteriana. Todas estas lagunas deberían evitarse evitando, en lo posible, las causas de error conocidas. Por ejemplo, según investigaciones antiguas, las personas que padecen leucemia linfática o mielocítica reaccionan frente a la inyección de bacterias (bacilos tíficos, vibriones del agua) con una formación muy poco intensa de aglutininas específicas, en comparación con testigos inoculados simultáneamente y por el mismo procedimiento [C. MORESCHI (1914), K. ROTKY (1914), K. HOWELL (1920)]. La formación de aglutininas también desaparece cuando el leucémico enferma de tífus o de paratífus B [C. MORESCHI (1914)]. Precisamente estos datos indujeron a SCHIFF y MENDLOWICZ a estudiar el comportamiento de los anticuerpos normales, en especial de las isoaglutininas,

(1) Las investigaciones se efectuaron en el laboratorio de un hospital berlinés.

en los pacientes de leucemia. En segundo lugar, del análisis electroforético de los sueros sanguíneos se deduce que en las enfermedades de los órganos linfáticos (leucemias linfática, aleucémica y mieloblástica, plasmacitoma, linfosarcomatosis, linfogranuloma inguinal, linfogranulomatosis) pueden alterarse considerablemente las proporciones de las seroproteínas, ante todo la de las seroglobulinas, y en particular de las γ y β (1); es decir, precisamente, la zona del diagrama electroforético en que también están localizadas las globulinas inmunes (los anticuerpos normales y los producidos por inmunización). Ya la simple exposición de estos hechos señala la conveniencia de extender a otras enfermedades el problema planteado por SCHIFF y MENDLOWICZ en la leucemia, para deducir, de los efectos de la lesión de un determinado órgano o tejido, el lugar y la índole de los procesos a que se debe la formación de las aglutininas, así como las causas de su producción en defecto o en exceso.

f) *Lugar y modo de producción de las globulinas inmunes.*

Como las isoaglutininas y otros anticuerpos normales, al igual que los anticuerpos producidos por inmunización, son, al menos en la forma accesible a la experimentación, *seroglobulinas marcadas específicamente*, para comprender el problema con toda su amplitud basta responder a estas tres preguntas: 1. *Dónde se producen las seroglobulinas*; 2. *dónde se marcan, es decir, dónde adquieren la propiedad en que radica su afinidad específica para un antígeno*, y 3. *cómo se produce esta marca*. El estado actual de nuestros conocimientos ya se expuso por extenso en el primer tomo de este tratado, donde se consideró desde distintos puntos de vista. Ahora bien, con arreglo a la planificación de la obra, las monografías son independientes (véase el prólogo de "Anticuerpos", primera parte), y, además, se han publicado entretanto nuevos resultados de investigación, cuya comprensión exige ordenarlos dentro del marco de los hechos anteriormente expuestos y de sus interpretaciones hipotéticas.

La mayoría de los autores consideran un hecho seguro que las seroglobulinas no se producen humoralmente en los líquidos del organismo, ante todo en la sangre circulante, sino que se sintetizan en células. Los experimentos sobre los que se edifica la teoría del origen celular de los anticuerpos es cierto que se refieren no a las seroglobu-

(1) Los diagramas electroforéticos de tales sueros patológicos se encuentran, entre otras obras, en el libro de F. WUHRMANN y CH. WUNDERLY (1947).

linas normales, sino a las inmunes, es decir, a las globulinas que se producen por administración parenteral de antígenos y que se caracterizan por su afinidad específica con estas sustancias. Sin embargo, esta diferencia no es esencial. Si se alimentan animales con aminoácidos marcados de modo que, en lugar de los N y H ordinarios, contengan isótopos de estos elementos, los isótopos aparecen, por una parte, en todas las seroproteínas normales (fibrinógeno, albúmina y pseudoglobulinas) en la misma proporción aproximadamente; por otra parte, si el animal de experimentación está en una fase de producción activa de anticuerpos, los isótopos aparecen en la molécula del anticuerpo, es decir, en las globulinas inmunes [R. SCHÖNHEIMER, S. RATNER, B. RITTENBERG y M. HEIDELBERGER (1942 a, b)]. Estos resultados experimentales no indican el lugar concreto de la producción de las proteínas del plasma en general y de las globulinas en particular, pero señalan un origen común para las globulinas normales y las que poseen función de anticuerpo y establecen, sin lugar a duda, que se constituyen por síntesis a partir de los aminoácidos de las proteínas de la alimentación.

La afinidad específica que el anticuerpo posee con respecto al antígeno al que debe su formación, se explicaría del modo más sencillo admitiendo que *el anticuerpo es un producto de transformación del antígeno*. Esta opinión, sin embargo, se ha terminado por desechar por varias razones, en primer lugar, porque la cantidad del anticuerpo producido es mucho mayor que la de antígeno administrado, lo que se observa como consecuencia de una única inyección del antígeno y, aún más claramente, cuando se repite el *ictus immunisatorius*; en segundo lugar, porque una vez desaparecido el antígeno del organismo la producción de anticuerpos puede proseguir durante meses y años e incluso durante toda la vida (autonomía de la producción de anticuerpos tal como la demostró R. DOERR (1929 b), tomando como ejemplo el experimento de la anafilaxia activa en cobayos sensibilizados con mínimas dosis de antígeno); en tercer lugar, porque la sustancia del antígeno determinante de la especificidad, por ejemplo arsénico o un colorante azoico, que debe ser decisiva para la afinidad específica con el anticuerpo, no existe en el anticuerpo ni en el suero inmune que lo contiene, hecho establecido por primera vez por R. DOERR y H. FRIEDLI (1925) y que después ha sido confirmado por numerosos autores [E. BERGER y H. ERLNMEYER (1932 a, b), M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1930), S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1932), F. HAUROWITZ, M. VARDAR y P. SCHWERIN (1942)].

Se pueden aducir otros argumentos [véase R. DOERR (1947, págs. 3 a 7)], pero bastan los recordados.

La avidéz específica del anticuerpo con respecto a su antígeno, ya que no puede atribuirse a que el anticuerpo sea un producto de la transformación del antígeno, probablemente se debe, en cierto sentido, a que el antígeno de cualquier otro modo influye sobre la formación del anticuerpo. De experimentos efectuados con aminoácidos isótopos se deduce que proteínas normales del plasma y anticuerpos (globulinas inmunes) parecen estar constituidos del mismo modo y haberse originado en los mismos lugares a partir de los aminoácidos separados en la digestión de las proteínas de los alimentos. De esto hay que deducir que hay dos casos posibles: cuando en el lugar de la síntesis de las proteínas no existe ninguna sustancia que actúe como antígeno, se producen globulinas normales, y cuando el proceso de la síntesis se efectúe en la presencia, espacial y temporal, de un antígeno, resulta una globulina inmune [F. BREINL y F. HAUROWITZ (1930), J. ALEXANDER (1931), ST. MUDD (1932), M. MACHEROEUF (1939), L. PAULING (1940)]. Una vez confirmado el origen celular del anticuerpo se deduce la necesidad de la presencia de antígenos en las células en que se efectúa la síntesis de las globulinas (1). Los antígenos administrados en disolución son sustancias coloidales y extrañas al organismo; el hecho de que puedan difundirse al interior de células vivas, lo que, como enseñan los resultados de las inmunizaciones, se produce con máxima regularidad, parece estar en contradicción flagrante con las teorías de la fisiología celular. Además, se conocen los antígenos formes (eritrocitos, bacterias), cuyo acceso a las células sólo parece posible por un mecanismo: *el de la fagocitosis*. Fundándose en sus resultados con antígenos celulares (espermatozoides, eritrocitos), E. METSCHNIKOFF (1899) emitió la teoría de que los "cuer-

(1) Esta necesidad se desvirtuaría, naturalmente, si pudiera demostrarse que un antígeno contenido en el líquido que baña las células sintetizadoras es capaz de influir de modo específico en la síntesis de globulinas que se efectúa en la célula por una suerte de acción a distancia. Pero no ha podido demostrarse y, por lo demás, no parece probable porque una acción a distancia presupone la existencia de un campo de fuerza entre la globulina normal y un antígeno cualquiera. Sin embargo, ambos componentes no reaccionan entre sí cuando se ponen en contacto inmediato. Por tanto, habría que derivar hacia un campo puramente especulativo y contar además con la posibilidad de que las globulinas en estado nascente se comportaran a este respecto de modo distinto que las ya sintetizadas. En este lugar no pueden, naturalmente, aducirse los experimentos de A. ROTHEN (1945) concernientes a las acciones a distancia entre un anticuerpo (globulina inmune) y su antígeno proteico (véase pág. 7).

pos inmunes" son probablemente un *producto de secreción de macrófagos* que fagocitaron células con contenido de antígeno, las digirieron intracelularmente, y de este modo pueden ceder anticuerpos así producidos. Tales células fagocitarias mononucleares están muy extendidas en el organismo, siendo particularmente ricos en ellas ciertos órganos como el hígado, la medula ósea y el bazo; sabido es que fundándose en que todas se comportan de igual modo ante los colorantes fueron designadas por L. ASCHOFF (1924) como *sistema retículoendotelial*. En las células de este sistema se situó, incluso antes de ASCHOFF, la formación de los anticuerpos; así, R. PFEIFFER y E. MARX (1898), R. BIELING y S. ISAAC (1922), R. BIELING (1923/24), F. STANDENATH (1923/24) y F. HAUROWITZ y F. BREINL (1932) y F. HAUROWITZ y F. KRAUS (1936) pudieron demostrar que antígenos "marcados químicamente" inyectados por vía intravenosa, por ejemplo una azoproteína con arsénico o una yodoglobulina, desaparecen rápidamente de la sangre circulante y aparecen en concentración máxima en los órganos que son particularmente ricos en elementos del sistema retículoendotelial (hígado, medula ósea).

En lugar de antígenos "marcados químicamente" puede utilizarse, según el modelo de METSCHIKOFF, antígenos "marcados ópticamente"; por ejemplo, espermatozoides, eritrocitos nucleados, bacterias que puedan colorearse selectivamente. De este modo se puede apreciar al microscopio cómo determinadas células captan por fagocitosis tales elementos que contienen antígenos y las modificaciones posteriores de dichos elementos, así como de las células fagocitarias. Por último, puede también apreciarse si una determinada fase de estas modificaciones coincide con la aparición de anticuerpos en la sangre circulante. Este pensamiento constituye la base de los experimentos de FLORENCE R. SABIN (1939). SABIN utilizó como antígeno "marcado ópticamente" el producto, fuertemente coloreado en rojo, de precipitar con alumbre una combinación de ovalbúmina con un colorante azoico (1); lo inyectó a conejos por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea e intraperitoneal, y buscó el antígeno coloreado mediante el microscopio y en distintos cuerpos; por otra parte, investigó la aparición de anticuerpos específicos en el suero de los animales. Las partículas rojas se encontraron en todos los tipos de células fagocitarias, influyendo, naturalmente, sobre su distribución la manera de incorporar el antígeno. Las partículas se recibían en vacuolas diges-

(1) La proteína coloreada, sintetizada a partir de ovalbúmina y de un colorante azoico, fué obtenida por M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1930).

tivas en las que primeramente se decoloraban y por último desaparecían, coincidiendo con este momento la desaparición de anticuerpos en el suero sanguíneo. SABIN pretende haber observado también el flujo y encuentro de las capas superficiales de las células, cargadas con el antígeno, y considera estos procesos como una imagen visible de la cesión de las globulinas producidas a los líquidos circundantes de los tejidos. SABIN admite que los productos de la digestión producidos en las vacuolas pasan al citoplasma de las células fagocitarias donde influyen sobre las síntesis intracelulares. En dicho citoplasma estimulan la síntesis de las globulinas y la modifican de modo que no sólo se producen globulinas normales, sino también globulinas inmunes; según ello, el anticuerpo, en oposición a METSCHNIKOFF, no deben considerarse como un producto directo de la digestión del antígeno, sino como resultado de una síntesis de las globulinas perturbada por el antígeno modificado (véase pág. 60), lo que ya parece más plausible *porque los anticuerpos, ni en estado puro, pueden distinguirse, química ni inmunizatoriamente (es decir, por sus funciones antigénicas), de las globulinas normales; la única diferencia bien establecida es su capacidad de reaccionar con el antígeno correspondiente, y no ha podido descubrirse hasta la fecha de modo satisfactorio dónde radica esta propiedad.*

Toda hipótesis, que parta del origen celular del anticuerpo como de un fundamento seguro, ha de considerar necesariamente que la captación fagocitaria del antígeno es el acto preliminar de todo el proceso, y parece probable que el resto también se desarrolle en las mismas células que de modo primario alcanzó el antígeno. SABIN ha seguido este pensamiento fundamental de modo consecuente, y ha robustecido su certidumbre con nuevos argumentos. Sin embargo, SABIN se ha limitado a estudiar la fagocitosis de partículas antigénicas coloreadas y su decoloración y disolución intracelulares; además, la formación de las globulinas inmunes no puede observarse, evidentemente al microscopio, y hay que considerar como muy dudoso que la aparición de capas superficiales en los reticulocitos signifique verdaderamente la eliminación de los anticuerpos producidos, y tanto más cuanto que SABIN mismo está convencido de que las mismas modificaciones, aunque no acusadas, se observan en los macrófagos que habían fagocitado partículas no antigénicas. *Pero inmediatamente se impone como réplica lo profundamente improbable que resulta situar la producción de anticuerpos en células que carezcan de la capacidad de fagocitar.* Sin embargo, ya desde el principio, en concurrencia con la teoría de los reticulocitos o macrófagos, se emitió la hipótesis de que los linfo-

citos participan en la producción de los anticuerpos en mayor o menor grado, e incluso de modo exclusivo. Podemos omitir, en este lugar, los primeros trabajos efectuados en esta dirección [L. HEKTOEN (1915), C. H. BUNTING (1925), J. B. MURPHY y E. STURM (1925)]; sin embargo, es necesario exponer algunas pruebas experimentales más recientes.

Un experimento típico, adecuado al problema que se plantea, consiste en administrar una inyección periférica del antígeno (en el músculo del pabellón auditivo, en la planta de una extremidad) y demostrar que los anticuerpos aparecen en primer lugar y en mayor concentración que en el suero sanguíneo, en los ganglios linfáticos regionales. Estos experimentos se han efectuado por P. D. McMASTER y S. S. HUDACK (1935), McMASTER y J. G. KIDD (1937), G. OSTERLIND (1935), F. M. BURNET y D. LUSH (1938), F. M. BURNET (1941), W. E. EHRLICH y T. N. HARRIS (1942), en ratones y conejos, con antígenos bacterianos, hemáties de carnero, ovalbúmina, virus, bacteriófagos y toxoide diftérico, obteniendo resultados afirmativos aunque no sin excepciones; los experimentos efectuados por F. M. BURNET (1941), en que utiliza el toxoide del estafilococo como antígeno, dieron resultados negativos, lo que el autor atribuyó, de modo poco convincente, a que esta sustancia, fácilmente soluble, debe cruzar rápidamente los ganglios linfáticos, y por esta razón no puede apreciarse. Contra los resultados positivos se objetó que las glándulas linfáticas regionales se inflaman al paso del antígeno, y que los tejidos inflamados pueden retener y almacenar diversas sustancias; la elevada concentración de anticuerpos en los ganglios linfáticos pudiera deberse a esta circunstancia [J. MURAKAMI (1936)]. Esta objeción, sin embargo, fué prevista por McMASTER y HUDACK (1935) y desvirtuada por un experimento especial. Se inyectó a ratones blancos en la oreja derecha un antígeno bacteriano, A, y simultáneamente en la izquierda un antígeno no emparentado serológicamente con él, D, de modo que se consiguió la inflamación de los ganglios linfáticos cervicales en ambos lados; se pudo apreciar que los títulos de anti-A y anti-B eran máximos en los ganglios linfáticos cervicales homólogos, más bajo en el suero sanguíneo y aún más en los ganglios linfáticos cervicales del lado contrario.

En los ganglios linfáticos regionales, elegidos como correspondientes a la inyección en animales de experimentación de mayor tamaño (glándulas poplíteas del conejo) existe también la posibilidad de comparar entre sí la linfa de los vasos aferentes y eferentes, especialmente en lo que respecta al contenido de anticuerpos en la linfa circulante

en relación con los procesos histológicos que pueden observarse en los ganglios linfáticos mismos. Este camino ha sido emprendido principalmente por W. E. EHRICH y T. N. HARRIS (1942), que inyectaron subcutáneamente vacuna tífica y hematíes de oveja en la extremidad inferior de conejos y observaron la aparición de aglutininas y hemolisinas en las glándulas poplíteas correspondientes. Los anticuerpos aparecen en la linfa circulante entre los días dos y cuatro, y alcanzan su título máximo a los seis. En los ganglios linfáticos, *antes* de la aparición de anticuerpos en la linfa circulante, se había desarrollado, en primer lugar, una infiltración de granulocitos y monocitos emigrantes que desencadenó inmediatamente una hiperplasia linfática, y, como consecuencia, una elevación aguda del número de linfocitos en la linfa circulante. HARRIS, GRIMM, MERTENS y EHRICH (1945) separaron por centrifugación, en el momento de su máximo contenido de anticuerpos, el líquido circulante de la glándula poplíteo, y observaron que el extracto de los linfocitos sedimentados contiene más anticuerpos que la porción líquida. En opinión de los autores citados esta distribución desigual sólo se explica admitiendo que los linfocitos producen los anticuerpos o que los absorben del plasma de la linfa. Pero como, según experimentos ideados para resolver este dilema, *in vitro*, los linfocitos, si bien ceden anticuerpos al líquido que los baña, no consiguen en cambio capturarlos de éste, parece justificado buscar el lugar de formación de los anticuerpos en los linfocitos. Esa concepción intentan reforzarla EHRICH y MERTENS (1946) por una prueba negativa. Inyectaron antígeno disentérico en la almohadilla plantar posterior del conejo y demostraron la formación de cantidad considerable de anticuerpos en los ganglios linfáticos regionales (poplíteos), no encontrando, en cambio, nada de anticuerpo en el tejido del lugar de la inyección, aunque ésta contiene numerosos macrófagos y cierto número de granulocitos. Análogamente, tampoco han podido descubrirse anticuerpos en los granulocitos y macrófagos de un exudado producido a consecuencia de la inyección intraperitoneal de antígenos disentéricos o tíficos. En relación con sus investigaciones anteriores acerca del papel de los linfocitos, EHRICH y colaboradores llegan al convencimiento de que los macrófagos son incapaces de sintetizar aglutininas contra los bacilos del tifus o de la disentería.

Pero para que los linfocitos puedan sintetizar los anticuerpos, su protoplasma ha de ponerse en contacto con el antígeno, y como no poseen capacidad fagocitaria, no pueden cumplir esta condición cuando se trate de antígenos formes (hematíes u otras células de tejidos,

bacterias). W. E. EHRICH y T. N. HARRIS (1945) por ello opinan que en la formación de los anticuerpos participan también células fagocitarias, como macrófagos y polinucleares, pero sólo para captar los antígenos formes y ponerlos en disolución por digestión intracelular; eliminarían este producto digerido, que sería entonces capaz de penetrar en los linfocitos y desencadenar en ellos la producción de anticuerpos. Es decir, admiten la necesidad de los procesos observados ópticamente por F. R. SABIN, pero sólo para los antígenos en forma celular. *Pero esto no basta.* Como se señaló en otro lugar (véase página 60), los denominados antígenos "solubles", por su esencia no están en disolución verdadera como las sales o los colorantes de bajo peso molecular; las disoluciones de proteínas poseen el carácter de partículas en estado de dispersión coloidal, y no parece probable que penetren sin inconveniente en los linfocitos (1). DOERR (1947, página 53) señala por ello que EHRICH y su colaborador, sin pretenderlo, habían mostrado que esto no sucede de hecho. Según los experimentos citados de HARRIS, GRIMM, MERTENS y EHRICH, los linfocitos no pueden captar ni adsorber anticuerpos del líquido que los rodea; ahora bien, los anticuerpos son globulinas inmunes y por tanto antígenos "disueltos" exactamente como lo están las seroglobulinas normales. Esto concuerda con que las sustancias coloreadas de alto peso molecular no pueden teñir los linfocitos. Actualmente no puede adelantarse ninguna hipótesis con respecto a la forma en que se movilizan los antígenos clásicos que entren en reacción con el protoplasma de los linfocitos, tanto cuando se trata de disoluciones proteicas, como de bacterias o de células de tejidos; no hay que pensar

(1) T. N. HARRIS y W. E. EHRICH (1946) inyectaron, en la almohadilla plantar posterior de conejos, antígenos formes (hematíes de oveja o bacilos de la disentería) y apreciaron en los tejidos inyectados, en los ganglios linfáticos y en la linfa eferente, sustancias "disueltas" que poseían la misma especificidad inmunológica que los elementos formes inyectados. Interpretan estas observaciones en el sentido de que las células inyectadas se transforman por un proceso fisiológico, probablemente por fagocitosis y digestión intracelular, en pequeñas partículas que alcanzan los ganglios linfáticos donde estimulan la producción de anticuerpos en los tejidos linfáticos. Por centrifugación de los extractos de tejidos y de la linfa se separan las sustancias solubles en forma de líquido sobrenadante transparente y en él pueden apreciarse por la inhibición de las reacciones serológicas entre los elementos formes y sus anticuerpos. No se indica la velocidad de rotación a que debe centrifugarse. Por ello las sustancias disueltas en el líquido sobrenadante podrían poseer el peso molecular de antígenos proteicos, lo que concordaría con la conservación de su especificidad serológica; en todo caso, sigue sin demostrar que sean aptos para penetrar por ósmosis en los linfocitos.

que esto se efectúe por su reducción a derivados de bajo peso molecular, porque, como es sabido, tales procesos de desnaturalización destruyen la función antigénica.

Después de los experimentos de McMASTER y HUDACK, McMASTER y KIDD, W. E. EHRICH y colaboradores, F. N. BURNET y otros autores, apenas puede dudarse de que los ganglios linfáticos participan de un modo u otro en la producción de anticuerpos (1). Ahora bien, en mi opinión aun no se ha decidido cómo debe considerarse esta participación; en particular, actualmente, no es posible pronunciarse de modo definitivo acerca de *si sólo hay un tipo de células que posea la capacidad de sintetizar las globulinas inmunes (anticuerpos) y de si este tipo privilegiado de células son los linfocitos*. No puedo compartir la confianza en que la solución propuesta por EHRICH y continuadores sea la justa [consúltese A. BOIVIN y A. DELAUNAY (1946)]; más bien me inclinó a adoptar una postura de reserva como hace A. R. RICH (1944).

Un aporte a esta cuestión han conseguido recientemente A. WHITE y T. F. DOUGHERTY (1944) al señalar en los linfocitos de conejos normales una proteína que parece idéntica a la globulina γ del suero de conejo. En ello termina una comunicación de T. F. DOUGHERTY, J. H. CHASE y A. WHITE (1944) acerca de experimentos con ratones inmunizados por vía intraperitoneal con hematíes de oveja lavados. Los animales, después de una inmunización de cinco semanas, se sangraron a muerte por el corazón y se determinó el título de aglutininas y de hemolisinas, en el suero y en los linfocitos, lavados y disueltos en agua destilada, procedentes de diversos ganglios linfáticos y del timo, así como en extractos de las glándulas salivares y de la musculatura; las determinaciones se expresaron en mg. de N por ml. de suero o extracto. Se observó que el título de los extractos de linfocitos es, por término medio, ocho veces más elevado que el del suero del mismo ratón y que los extractos de glándulas salivares y de músculos no poseen anticuerpos en cantidad apreciable, a pesar de que su contenido de nitrógeno es mayor que en el extracto de linfocitos. Las suspensiones de células obtenidas por desmenuzamiento de los ganglios linfáticos y del timo contienen por lo menos un 90 por 100 de linfocitos y, como máximo, un 10 por 100 de otras formas celulares; y como, por otra parte, en los desmenuzados, que carecen de anticuer-

(1) En este sentido se ha pronunciado también LANDSTEINER (1945, página 146); en los lugares citados sólo se trata de si los anticuerpos se producen en los ganglios linfáticos, pero no de que se originen en los linfocitos.

pos, de glándulas salivares y de tejido muscular pueden observarse células reticulares, macrófagos y fibroblastos, se llega a la conclusión de que los anticuerpos están concentrados en los linfocitos. Sin embargo, los autores añaden que la producción de los anticuerpos por los linfocitos sigue sin confirmarse (*the actual production of antibodies by lymphocytes has not been established*. Véase pág. 297 de la obra citada).

Según datos de T. F. DOUGHERTY y A. WHITE (1943 a, b) y de WHITE y DOUGHERTY (1944 b), el extracto de corteza suprarrenal o la hormona adrenotropa del lóbulo anterior de la hipófisis provoca una reducción del número de linfocitos en los tejidos linfoides y en la sangre circulante, cuando se inyectan a animales de experimentación (ratas y conejos); esta reducción parece deberse a la disgregación de los linfocitos y va acompañada de un aumento de la concentración de las proteínas del suero [WHITE y DOUGHERTY (1944 b)]. En el aumento de las proteínas del suero desencadenado por las hormonas parece que participan los anticuerpos, es decir, las globulinas inmunes, cuando el animal de experimentación se encuentra en fase de inmunización activa. J. H. CHASE, A. WHITE y T. F. DOUGHERTY (1946) [véase también DOUGHERTY, WHITE y CHASE (1944)] inmunizaron ratones, ratas y conejos con hematies de oveja, toxina estafilocócica, suero de caballo u ovalbúmina, unas veces adicionando y otras no extracto de cápsulas suprarrenales; los animales que habían recibido antígeno + hormona originaron anticuerpos con título aproximadamente doble que los animales que sólo habían recibido el antígeno. Cuando se administra a un conejo hiperinmunizado con hematies de oveja una única dosis de antígeno, no se observa dentro de las primeras veinticinco horas ninguna elevación del título de aglutinación; sin embargo, después de recibir la única dosis de extracto de cápsulas suprarrenales se observa un aumento de título que se mantiene durante seis a doce horas, pasadas las cuales desciende al nivel anterior. Si las inyecciones de hormonas se administran con suficiente frecuencia a los animales hiperinmunizados, se puede mantener el alto nivel de anticuerpos durante catorce a dieciséis días sin necesidad de renovar la inyección del antígeno. Por último, cuando los anticuerpos han desaparecido por completo del torrente circulatorio, pueden reaparecer en la sangre a consecuencia de una sola inyección de la hormona adrenotropa de la hipófisis, resultado experimental que recuerda al fenómeno serológico conocido como "reacción de anamnesis". En opinión de los autores citados, los anticuerpos que aparecen en la corriente sanguínea a consecuencia de la inyección de la hormona proceden de los linfocitos disueltos, que liberan las globulinas inmunes que contienen; la disolución de los linfocitos eleva simultáneamente el título de anticuerpos del suero y su contenido de proteínas. En favor de esta afirmación se han aducido argumentos positivos y negativos. Como argumentos positivos se aduce que los linfocitos de animales cuyos sueros están exentos de anticuerpos, contienen cantidad considerable de la globulina inmune específica, y que la reaparición del anticuerpo en el suero subsiguiente a una inyección de hormona coincide con alteraciones regresivas en los tejidos linfoides y con la leucopenia de la sangre [DOUGHERTY y WHITE (1943 a 1944)]. Un argumento negativo que también se ha hecho valer es que el acetato de desoxicorticosterona, incapaz de provocar

la reacción de anamnesis, tampoco provoca alteraciones en los tejidos linfoides ni leucopenia. Por otra parte, el benzol y el arsenito potásico provocan una exaltación de la función de la corteza de cápsulas suprarrenales, linfocitosis y linfopenia en los ratones blancos, y son, por consiguiente, capaces de liberar anticuerpos, es decir, de desencadenar la reacción de anamnesis cuando las cápsulas suprarrenales están intactas. Los ratones que han sufrido la extirpación de las cápsulas suprarrenales mantienen el nivel de anticuerpos después de haber recibido los citados productos tóxicos. Por último, en ratones con las cápsulas suprarrenales extirpadas se puede provocar una reacción de anamnesis, es decir, la reaparición de los anticuerpos en la sangre, por la administración de extracto de cápsulas suprarrenales, pero no por la hormona adrenotropa de la hipófisis. T. F. DOUGHERTY, CHASE y WHITE (1945), autores de las experiencias citadas, consideran que la liberación por los linfocitos de los anticuerpos que contienen en un mecanismo estimulado, en primer lugar, por la hormona de las cápsulas suprarrenales y, sólo ocasionalmente, también por la hormona de la hipófisis.

H. N. EISEN, M. M. MEYER, D. H. MOORE, R. TARR y H. C. STOERK (1947) toman posición en contra de estos experimentos y de las conclusiones deducidas de ellos. Señalan que acerca de la producción de anticuerpos después de la extirpación de las cápsulas suprarrenales existen datos contradictorios, puesto que muchos autores no observan ninguna influencia y otros observan disminución e incluso exaltación de la formación de anticuerpos. En pruebas propias extirparon las cápsulas suprarrenales a ratas blancas e inmunizaron los animales con suspensiones en formol del neumococo del tipo I. A las ratas de uno de los grupos les inyectaron repetidas veces, durante la inmunización, extracto de cápsulas suprarrenales, lo que no efectuaron con los animales del segundo grupo, testigo. La concentración de anticuerpos (precipitinas contra el polisacárido del neumococo) y la de la globulina γ , resultaron idénticas en ambos grupos de animales, de lo que se deduce que la función de las cápsulas suprarrenales no ejerce ninguna influencia decisiva con respecto a la producción y liberación de los anticuerpos y de la globulina γ . Sin embargo, este experimento no invalida de ningún modo todos los de DOUGHERTY y colaboradores; el futuro nos dirá lo que resulte de las comprobaciones que se efectúen. En un punto, no sin importancia, EISEN, MEYER y colaboradores confirman los resultados de DOUGHERTY, CHASE y WHITE (1945). En conejos previamente inmunizados con neumococo I, una sola inyección de extracto de cápsulas suprarrenales provoca una elevación de los anticuerpos que, según determinaciones de nitrógeno, alcanza al 30 por 100. Esta reacción de anamnesis inespecífica se mantuvo durante doce horas y se observó principalmente en conejos con débil producción de anticuerpos. Por este resultado EISEN y colaboradores conceden que el reforzamiento de la función de la corteza de las cápsulas suprarrenales puede ejercer una influencia pasajera sobre la distribución de los anticuerpos "ya existentes".

En la comunicación sobre el modelo experimental de las reacciones anamnésticas DOUGHERTY, CHASE y WHITE (1945, pág. 139) hacen notar también que la presencia de anticuerpos en los linfocitos no debe considerarse como prueba suficiente de que estas células los produzcan. Ahora bien, estos autores no responden a la pregunta que

su consideración plantea, a saber, *cómo los anticuerpos alcanzan los linfocitos*, y se contentan con señalar que los linfocitos pueden designarse como un almacén (*storehouse*) de los anticuerpos, y que el anticuerpo aparece como un componente del plasma del linfocito. Coincidiendo con HARRIS, GRIMM, MERTENS y EHRICH (véase pág. 65), rechazan la explicación de que los linfocitos absorban los anticuerpos del líquido que los baña, por haber podido encontrar cantidades considerables de anticuerpos en los linfocitos (tejidos linfoides) de animales cuya sangre no contiene anticuerpos. Si el suero no contiene nada de globulina inmune, es evidente que los linfocitos no pueden absorberla de él. Este argumento, sin embargo, sólo sería válido si pudiera demostrarse que el suero del animal de experimentación tampoco contuvo anticuerpos en ninguna fase anterior; en otro caso, resulta insegura toda afirmación acerca de la procedencia de los anticuerpos encontrados en el tejido linfoideo cuando no existan en el suero.

Sin querer tomar una posición de repulsa frente a los resultados objetivos de los experimentos efectuados con linfocitos y tejidos linfoides, lo que sólo puede efectuarse después de labor experimental propia, deseamos llamar la atención sobre los siguientes puntos, importantes en nuestra opinión: 1. Los tejidos linfoides (ganglios linfáticos, bazo) no están constituidos exclusivamente por linfocitos, sino que, en especial los "*centros germinales*", contienen células que difieren de los linfocitos maduros tanto por la morfología como por su capacidad fagocitaria. *Los centros germinales faltan en el tejido fetal y, en la vida postnatal, aumentan en número cuando se inyectan antígenos*, como han señalado T. HELLMAN y G. WHITE (1930), G. GLIMSTEDT (1936) y G. OESTERLIND (1938). W. EHRICH y T. N. HARRIS (1942) también pudieron comprobar, después de inyecciones periféricas de antígeno, *el desarrollo de grandes centros germinales en los ganglios linfáticos regionales*, lo que, sin embargo, no relacionaron con la formación de anticuerpos, porque no precedía de modo marcado a la aparición de anticuerpos en la linfa de los vasos eferentes de los ganglios linfáticos, sino que, en general, se producía de modo simultáneo a esta aparición y, en ocasiones, incluso más tarde; por ello consideran que el proceso decisivo es la hiperplasia linfocitaria (véase pág. 59). 2. En las discusiones acerca del lugar de la producción de anticuerpos se han atribuido funciones particulares a formas celulares homogéneas en cuanto a la morfología y a su modo de teñirse (macrófagos, granulocitos, reticulocitos, linfocitos, etc.). Esto no debe ser correcto, como enseña la fisiología (músculos del esqueleto rojos

y pálidos, endotelios capilares de diversos lugares). Según ello, los reticulocitos fagocitarios pudieran comportarse, con respecto a la producción de anticuerpos, de modo muy distinto según cual sea el órgano o tejido en que estén insertados. Esta posibilidad no se ha tenido siempre en cuenta. 3. DOUGHERTY y colaboradores utilizaron como antígeno hematíes de oveja para inmunizar conejos y ratones blancos; consideraron los resultados como equivalentes y con validez general. Sin embargo, los hematíes de oveja no constituyen un antígeno unitario, sino complejo y en forma celular. Contienen: el antígeno de Forssman, sustancias que participan en sus reacciones con el suero de los enfermos de la enfermedad del suero y con el suero de pacientes que sufren de mononucleosis infecciosa, el antígeno específico de especie y otras sustancias con reactividad serológica. Ahora bien, el conejo pertenece a los animales FORSSMAN negativos, y el ratón, a los FORSSMAN positivos; por ello el conejo al ser inmunizado con hematíes de oveja puede dar lugar a anticuerpos de FORSSMAN, y el ratón no. Con ello hay que relacionar que, en el suero de conejos *normales*, se encuentran habitualmente anticuerpos de FORSSMAN, que, en opinión de la mayor parte de los autores, se forman de modo espontáneo, aunque, según FORSSMAN (1946), la presencia se debe a una inmunización a través del intestino (por la alimentación con plantas que contengan antígeno de FORSSMAN). En el suero del ratón no se encuentra este anticuerpo normal. Por ello se debe investigar, al menos, si difieren entre sí los tejidos linfoides de conejos *normales* y de ratones *normales* en lo que respecta a su contenido de anticuerpos que reaccionan con los hematíes de oveja. 4. La velocidad de transporte de una proteína en un campo eléctrico y su localización consiguiente en el diagrama electroforético no bastan para identificarlo con la globulina y existente en el suero del animal de que procede. Por ejemplo, hay que considerar que una proteína electroforéticamente homogénea puede no serlo de hecho; los preparados de globulina y del suero humano que en la electroforesis se comportan como homogéneos en un 99 por 100, se descubren en cambio como no homogéneos en la ultracentrífuga, la que contienen un componente, cuya cantidad puede determinarse, que se sedimenta más rápidamente que la seroglobulina ordinaria. JOHN T. EDSALL (1947, pág. 401), que ha hecho este descubrimiento, censura en el mismo lugar el excesivo valor que se concede a los descubrimientos electroforéticos; aunque la electroforesis es, indudablemente, un auxiliar indispensable en el estudio de las proteínas del plasma y en su fraccionamiento, no debe considerarse más que como una de las distintas técnicas que se aplican a este fin, y los datos

electroforéticos deben siempre someterse a crítica e interpretarse a la luz de otros datos. Además, no toda globulina γ , incluso cuando pueda identificarse por suficientes criterios con el componente sérico del mismo nombre, es un anticuerpo, es decir, una globulina inmune, ni toda globulina inmune tiene el comportamiento electroforético de una globulina γ .

Debe quedar sentado que hasta la fecha los nuevos embates contra la teoría reticulocítica no han llevado a ninguna conclusión satisfactoria. La inseguridad con respecto al modo y lugar donde se forman las globulinas inmunes (anticuerpos) no sólo no se ha superado, sino que incluso ha tomado mayor cuerpo. Esto se pone de manifiesto en que EHRICH y colaboradores consideraban indudable que *los anticuerpos se formen en los linfocitos*, mientras que DOUGHERTY, WHITE e I. H. CHASE sólo se atreven a afirmar el *almacenamiento* del anticuerpo en esas células, considerando inseguro el lugar donde se originen. Además, EHRICH se apoya en el papel de los reticulocitos para explicar la transformación de los antígenos formes hacia un estado que permite la función de los linfocitos, aunque no da ninguna solución con respecto a la naturaleza de este estado. Por otra parte, DOUGHERTY y colaboradores tampoco pueden dar ninguna explicación con respecto a cómo se produce la concentración de anticuerpos en los linfocitos.

Los defensores de la teoría de los reticulocitos toman a su vez la palabra. A. FAGRÅUS (1947) estableció que el tejido, rico en linfocitos, del timo, en los cultivos de tejidos fagocita a los antígenos formes en cantidad completamente insuficiente y que *in vitro* no producen nada de anticuerpos. Además, el mismo FAGRÅUS (1948) señala que, en conejos previamente tratados de modo específico, las inyecciones intravenosas de antígeno, especialmente del *S. typhi* producen un fuerte aumento de células plasmáticas del bazo que están localizadas, casi exclusivamente, en la pulpa roja del órgano. Estas células plasmáticas se desarrollan, según FAGRÅUS, a partir de los reticulocitos, pasando por una serie de fases intermedias, y, en las condiciones del ensayo, podrían considerarse como las células que ceden los anticuerpos a la circulación. En favor de esta concepción habla también el hecho de que los trozos de pulpa roja de bazo, rica en células del plasma, si se cultivan *in vitro*, en el momento de la formación de anticuerpos producen muchos más anticuerpos que el folículo linfático del parénquima del bazo, rico en linfocitos, pero pobre en células del plasma. También T. N. HARRIS, J. RHOADS y J. STOKES, Jr. (1948) están convencidos de la incapacidad del tejido de timo para formar anticuerpos, pero no estiman este hecho incompatible con que los linfocitos sean la fuente de los anticuerpos; el timo tiene otra estructura que los órganos linfoides, y, además, *hasta ahora no se sabe en qué fase de los linfocitos se produce la formación de anticuerpos*. En cuanto al papel del bazo, T. N. HARRIS y colaboradores consideran que este órgano interviene de modo predominante en la formación de anticuerpos,

pero sólo cuando el antígeno se inyecta por vía intravenosa; cuando el antígeno se inyecta por vía subcutánea, los extractos de bazo no rinden cantidades de anticuerpo dignas de mención.

La inseguridad con respecto al *lugar donde se forman los anticuerpos* se debe en parte a lo defectuoso de nuestros conocimientos con respecto a la *formación de las proteínas del plasma*. Como regla, ambos problemas deben considerarse idénticos; en el lugar donde se produzcan las globulinas inmunes han de formarse también las normales. Esta conclusión concuerda con la hipótesis que admite que las globulinas inmunes se desarrollan como consecuencia de la desviación de la síntesis intracelular de las globulinas motivada por la presencia de un antígeno. Ahora bien, no cabe duda de que es más probable que las globulinas se transformen en globulinas inmunes cuando están en estado naciente, que una vez terminadas y dotadas de cierta estabilidad [consúltese R. DOERR (1947 a, pág. 67)]. Sin embargo, debe tenerse presente que, prescindiendo de la capacidad de reaccionar de modo específico con el antígeno, no se sabe en qué se diferencia la globulina inmune de la normal, si bien puede afirmarse que no deben ofrecer entre ellas grandes diferencias si se considera la identidad de las funciones antigénicas de ambas globulinas. Por ello es posible que el marcaje específico de las globulinas no se produzca en el lugar de su síntesis. La hipótesis anteriormente citada, por lo demás, habla simplemente de síntesis de globulinas; pero no *todas* las seroglobulinas que pueden diferenciarse electroforéticamente se "marcan", es decir, se transforman en anticuerpos, sino únicamente las globulinas γ y β ; ahora bien, si todas las globulinas se sintetizan en las mismas células, no parece explicable *por qué razón una porción importante de las mismas no se marca; es decir, su síntesis no se influye por la presencia del antígeno*. Por último, los mismos diagramas electroforéticos de los sueros inmunes no pueden interpretarse, sin más, en el sentido que pide la hipótesis si nos limitamos a la zona favorecida. Pues no es que se formen globulina γ inmune *en lugar* de globulina γ normal, sino más bien que se descubren simultáneamente *ambas*. La globulina γ inmune es, por consiguiente, *un producto adicional*, y, por consiguiente, la afirmación de que la producción de globulinas se exalta, y una parte de las globulinas formadas se modifica por el antígeno, es evidente en su primera parte, pero arbitraria en la segunda mientras no se encuentre una explicación para el hecho de que *una parte de la globulina γ resulte intangible por el antígeno*.

Si hacemos abstracción de los anticuerpos y resumimos lo que se

conoce acerca de la formación de las proteínas normales de la sangre, aparecen muchas contradicciones y en especial en el capítulo que aquí nos interesa de la formación de las seroglobulinas [consúltense entre otros a L. HEILMEYER (1942), H. HEINLEIN (1943), F. WUHRMANN (1947)]. Sólo parece seguro que las albúminas se producen en el hígado desde el que alcanzan, terminadas, la sangre circulante, y que la protombina, que es una globulina, también se produce en el hígado; la producción intrahepática del fibrinógeno también se considera probable. Según numerosas investigaciones parece también indudable que debe existir un mecanismo de regulación que mantiene la proporción recíproca de las proteínas del plasma. Se han observado aumentos de globulinas no sólo en procesos de inmunización, sino en estados patológicos muy diversos; cualquiera que sea la causa de tales aumentos siempre van acompañados de una disminución de las albúminas; las seroglobulinas especiales que pueden diferenciarse electroforéticamente también están en una dependencia mutua evidente, ya que un aumento considerable de una globulina va acompañado de la reducción de las otras. Los resultados de este mecanismo de regulación son patentes, pero enteramente hipotético cómo se produzcan. Como el hígado no sólo produce las albúminas, sino que también las almacena, F. WUHRMANN y CH. WUNDERLY (1944, 1945, 1946) y M. BJORNEBOE (1943, 1945, 1946) opinan que cuando aumenta la cantidad de globulinas del plasma sanguíneo, el hígado interrumpe la cesión de sus albúminas a la sangre coloidosmótica, con el fin de mantener la presión, y almacena las que forma en mayor proporción. Pero esta explicación no aclara cómo el hígado ejerce esta función, ni cómo se produce la coordinación con las globulinas.

El lugar y la forma de producirse las seroglobulinas es actualmente objeto de especulaciones. Se ha impugnado con bastante frecuencia la opinión de que se forman a partir de las albúminas "en estado de dispersión fina" por una especie de transformación coloidal, pero vuelve a reaparecer en forma enmascarada. Las globulinas, sin embargo, no sólo difieren de las albúminas por presentarse en estado de dispersión grosera, sino que también difieren de ellas químicamente; sus diferencias serológicas son tan grandes que las albúminas y globulinas del mismo suero sanguíneo no ofrecen reacciones de parentesco [H. DALE y P. HARTLEY (1916), R. DOERR y W. BERGER (1922 a, b), H. B. TREFFERS, D. M. MOORE y M. HEIDELBERGER (1942)]; en cambio entre las albúminas o entre las globulinas de especies no emparentadas se aprecian reacciones cruzadas (por ejemplo entre las de caballo y cabra), y por una inmunización forzada puede

ponerse de manifiesto incluso una especificidad de mamífero más o menos amplia [consúltese R. DOERR (1947 a, pág. 94)]. Estas observaciones negativas limitan el círculo de las posibilidades hipotéticas, pero no ofrecen un camino para la solución del problema. Los puntos de vista positivos sitúan la formación de las seroglobulinas en el sistema reticuloendotelial (sistema que se ha definido de distintos modos), en las células plasmáticas de la médula ósea, en los monocitos de la sangre y de la médula ósea; la diversidad de opiniones atestigua la relativa debilidad de los argumentos en que cada una se apoya. A lo anterior hay que añadir que los elementos del sistema reticuloendotelial están distribuidos entre numerosos órganos (ganglios linfáticos, bazo, hígado, médula ósea, cápsulas suprarrenales, hipófisis) y que el papel de los reticulocitos en el proceso de formación de las globulinas se supone distinto según los lugares, atribuyéndose, por ejemplo, por muchos autores una mayor participación a la porción intrahepática del sistema que al resto. En general, las opiniones se inclinan más bien a aceptar que la síntesis de las globulinas tiene lugar en varios centros (con lo que parece estar de acuerdo el fenómeno de la formación de anticuerpos) o a admitir la cooperación de los reticulocitos de varios órganos, en especial del hígado, de la médula ósea y quizás también del bazo. *Sin embargo, no he tenido noticia de que ningún investigador que se haya ocupado de modo profundo de la fisiología y patología de las proteínas de la sangre considere que los linfocitos son los productores de las seroglobulinas.* Esta opinión no parece probable por dos razones. En primer lugar, porque las globulinas, tanto normales como inmunes, se sintetizan a partir de los aminoácidos procedentes de las proteínas de los alimentos, desdobladas por los fermentos. Esta afirmación se deduce de experimentos efectuados con aminoácidos marcados (pág. 59) y también porque los animales que, por haber sido alimentados durante mucho tiempo con una dieta pobre en proteínas, agotan las reservas proteicas, experimentan proteinemia y simultáneamente reducen su capacidad de formar anticuerpos (aglutininas, precipitinas y hemolisinas) [P. R. CANNON, W. E. CHASE y R. W. WISSLER (1943), CANNON, WISSLER, R. L. WOOLRIDGE y E. P. BENDITT (1944)]. Además, P. R. CANNON (1945 a) pudo demostrar que en estado de inanición grave se atrofian las células fagocitarias y disminuyen en número. Si los animales cuyo depósito proteico se ha agotado vuelven a alimentarse con una dieta rica en proteínas, desaparecen rápidamente la hipoproteinemia y las alteraciones de los reticulocitos, recuperando la capacidad para una producción normal de anticuerpos. No sólo parece inadmisibles,

sino que está en contradicción directa con los resultados experimentales de G. W. WHIPPLE y colaboradores, la opinión de que los aminoácidos de las proteínas de los alimentos que entran por la vena porta hacia el hígado atraviesan inalterados este órgano para ser captados en primer lugar por los linfocitos, donde se agrupan para originar las complejas proteínas propias que en ellos encuentran un gran depósito. En efecto, P. R. CANNON (1945 b) subraya con razón que si se considera la larga duración de la inmunidad subsiguiente a la acción del antígeno, parece muy poco probable que un tejido tan lábil, tanto desde el punto de vista morfológico como funcional, como el tejido linfático esté en una relación tan directa con el "mecanismo de los anticuerpos". En otro lugar (véase pág. 80) se aducirá que esta objeción debe tomarse más en serio de lo que pueda parecer a primera vista.

Las consideraciones anteriores se refieren casi exclusivamente a los anticuerpos producidos por inmunización, por lo que parecen fuera de lugar, al menos expuestas tan por extenso, en una obra que se ocupa de los anticuerpos naturales. Sin embargo, los anticuerpos naturales se encuentran en las fracciones de globulinas del suero sanguíneo y, como los anticuerpos inmunes, no son con toda probabilidad sino globulinas especiales marcadas, es decir, dotadas de afinidad específica; de modo que para los dos grupos de anticuerpos tienen igual trascendencia una serie de problemas, entre ellos el lugar y modo de formarse tales sustancias, y el conocimiento de las seroglobulinas fisiológicas y su relación con las albúminas. Los anticuerpos existentes en sueros normales pudieran haberse formado, al menos en parte, a consecuencia de estímulos antigénicos inadvertidos (criptogenéticos) [G. H. BAILEY (1927), J. FORSSMAN (1946) y otros] y, por consiguiente, pertenecer por la comunidad de origen a la categoría de los anticuerpos inmunes. Otro es el caso de los anticuerpos naturales que se forman espontáneamente por causas internas, especialmente por una aptitud heredada; por ejemplo, las *isoaglutininas*. Aquí falta el estímulo antigénico exógeno es decir, que resulta insostenible la hipótesis de que tales anticuerpos se hayan formado por la síntesis intracelular de las globulinas en presencia de un antígeno; pero estas globulinas son, sin embargo, "marcadas"; es decir, están dotadas de afinidades específicas; en definitiva, resultan *marcadas sin haberlo sido*. Este hecho suena como una paradoja, como han señalado muchos autores. K. LANDSTEINER (1945, pág. 133) opina que tal vez quepa considerar que el número de variantes de las moléculas de globulinas es posible que sea mucho mayor que lo que

sería de esperar del examen físico y químico del suero, y que muchas de ellas podría tener afinidades fortuitas con una u otra sustancia con la que se comportarían como anticuerpos. Este ya no es el punto de vista antes defendido por LANDSTEINER y E. PRÁSEK (1911) (véase pág. 44). Ahora bien, la concepción de la existencia de tales anticuerpos fortuitos atribuida a la gran diversidad de seroglobulinas no resulta *válido para los casos en que las afinidades específicas están determinadas por la herencia y por la especie*. Apenas queda otra posibilidad que situar la especificidad de tales anticuerpos naturales en el mismo plano que las diferencias entre las otras globulinas fisiológicas de un suero y considerar tales anticuerpos como variantes de las globulinas condicionadas y determinadas por la raza y la especie.

Aunque las isoaglutininas se encuentran entre las globulinas del suero, también se ha investigado el contenido de tales anticuerpos en diversos líquidos orgánicos, tanto exentos o pobres como ricos de proteínas, y en diversos exudados y secreciones de individuos cuya sangre contiene tales isoaglutininas. Han dado resultados positivos la leche, linfa, exudados, líquidos císticos y en parte también la saliva, lágrimas y semen; el título de las isoaglutininas resulta, en general, más bajo que en el suero; en la orina normal, en el líquido cerebroespinal y en el líquido amniótico no han podido descubrirse isoaglutininas [CAVALIERI (1922), P. EMILE-WEIL y P. ISCH-WALL (1923), J. HAPP (1920), HEIM (1926); SCHWARZMAN (1928), KAN-ITI YOSIDA (1928), G. LENART y J. KÖNIG (1928), T. PUTKONEN (1930) y otros]. Parece que no se han efectuado ensayos para descubrir en los órganos las isoaglutininas existentes en la sangre (1). Sin embargo, esta falta se ha cubierto en parte por la observación de que el título de las isoaglutininas y de otros anticuerpos naturales puede elevarse de modo muy considerable por la inmunización con aquellos antígenos sobre los cuales actúan. Por ello hay que admitir que los anticuerpos naturales se producen en el mismo lugar que las globulinas inmunes dotadas con la misma especificidad, lo que nos vuelve a situar ante la inseguridad acerca del lugar de la síntesis de las globulinas. Ya en la página 71 se dijo que se echan muy de menos datos acerca del contenido de anticuerpos naturales en los linfocitos y en el tejido linfático.

(1) G. LENART y J. KÖNIG encontraron isoaglutininas en el "jugo de los tejidos", bajo cuya designación no entienden un extracto de las células de los tejidos, sino el líquido de las ampollas obtenidas por la acción de la cantaridina sobre la piel, es decir, un trasudado inflamatorio.

g) *La persistencia de los anticuerpos naturales en la sangre circulante.*

Los anticuerpos naturales *persisten* una vez que han aparecido en la sangre. No desaparecen del plasma, sino que se mantienen en él durante toda la vida, aunque en concentración variable. Estas afirmaciones resultan válidas, en primer lugar, para las isoaglutininas del suero del hombre y de los animales, y para aquellos anticuerpos naturales en que resulte sumariamente probable el origen espontáneo, es decir, sin estímulo específico de un antígeno; pero también para otros anticuerpos como las hemolisinas naturales para la sangre de oveja existentes en los sueros humano y de cobayo [FRIEDBERGER, BOCK y FÜRSTENHEIM (1929)], o para la antitoxina diftérica natural, cuya formación, en opinión de la mayor parte de los autores, aunque no de todos, se debe a la acción del estímulo específico de la toxina [FRIEDBERGER y HEIM (1929), L. HIRSZFELD (1926)].

A este respecto no puede deducirse una diferencia fundamental frente a los anticuerpos inmunes, puesto que éstos, en algunos casos, persisten durante toda la vida en la sangre circulante sin necesidad de renovar el estímulo inmunizatorio (sarampión, fiebre amarilla, enfermedad de Weil); sin embargo, se trata de casos excepcionales; pero, como regla, los anticuerpos obtenidos por inmunización después de haber alcanzado un título máximo pierden rápidamente su concentración, y, por último, desaparecen totalmente de la sangre.

Los anticuerpos naturales, como los inmunes, son proteínas del plasma, y, como éstas, se han producido en el metabolismo; según la opinión de H. KEILHACK (1936), las proteínas del plasma poseen una vida aproximada de tres a cuatro semanas. Estos datos concuerdan con los de la vida media de las moléculas de anticuerpos determinados por SCHÖNHEIMER, RATNER, RITTENBERG y HEIDELBERGER (1942) en conejos con ayuda de anticuerpos marcados (cuatro semanas); teniendo en cuenta la intensidad del metabolismo proteico, la vida de los anticuerpos no debe sobrepasar nunca de diez semanas [consultese R. DOERR (1947 a, págs. 57 y siguientes)]. *Por consiguiente, los anticuerpos, tanto si son normales como si se han formado por inmunización, para que persistan deben compensar por una renovación continua su demolición, también constante* [R. DOERR (1947 a, páginas 43 y siguientes)]. No se sabe con seguridad por qué en los anticuerpos inmunes la demolición en general predomina sobre la formación, lo que trae como consecuencia la desaparición de los anticuer-

pos de la sangre circulante; aunque, como se ha dicho, existan excepciones en que sucede lo contrario, es decir, el predominio de la formación sobre la demolición, y los anticuerpos persistan largo tiempo. Hasta la fecha no puede decidirse por qué razón los anticuerpos normales, al menos en los casos comprobados hasta la fecha, siempre son persistentes. Con respecto a esto, sin embargo, podemos hacer una afirmación completamente comprobada: *la formación de un anticuerpo determinado puede persistir durante años, incluso durante toda la vida, sin necesidad de repetir el impulso específico. La producción de anticuerpos puede ser independiente del estímulo antigénico; es decir, puede producirse de modo autónomo, fenómeno que R. DOERR (1929 b) fué el primero en demostrar, sin posible objeción, con ensayos de anafilaxia activa en cobayos.* Desde la inclusión de la producción y desaparición de los anticuerpos en el marco del metabolismo proteico no puede ya extrañar que estas sustancias activas alcancen a producirse de modo permanente sin necesidad de estímulo antigénico continuo o repetido permanentemente. Los anticuerpos, cuando son producidos por un organismo mismo (por vía activa), son en cierto sentido globulinas inmunes propias de él, y una alteración persistente de la formación de globulinas en un sentido determinado parece concebible desde el punto de vista fisiológico, especialmente si se tiene en cuenta que la diferencia entre globulinas normales e inmunes es relativamente pequeña, ya que nunca ha podido apreciarse que implique una modificación de la función antigénica.

La persistencia de los anticuerpos inmunes en la sangre o en el organismo (1) puede depender de la dinámica del estímulo antigénico, o también del grado en que la globulina inmune formada por inmunización difiera de la globulina normal, por el cual resulta, en mayor o menor medida, extraña al organismo o a la sangre. Pero no hay cri-

(1) Además de los anticuerpos libres circulantes en la sangre hay que tener en cuenta, como es sabido, los anticuerpos ligados a los tejidos, o depositados en determinados órganos, que pueden descubrirse en los extractos de los tejidos de modo análogo a los anticuerpos del suero sanguíneo (consúltese la pág. 66), o apreciarse su presencia por la capacidad de determinados tejidos de reaccionar de modo específico al ponerse en contacto con el antígeno (resultado positivo en el experimento de SCHULTZ-DALE con útero aislado de hembra de cobayo sensibilizada en cuya sangre no puede apreciarse ya el anticuerpo anafiláctico). Al hablar del problema de la presencia de anticuerpos no es necesario deslindar de modo acusado ambas localizaciones; más bien parece conveniente referirse en general a la presencia o ausencia del anticuerpo en la sangre, como un indicador más cómodo y mejor conocido de su persistencia en el organismo.

terio para enjuiciar la influencia de ambos factores en un caso determinado. Se desconoce, por ejemplo, por qué motivo el efecto de la infección por el virus del sarampión resulta tan persistente que, de por vida, nunca cesa la producción de anticuerpos, aunque se observe una disminución de su intensidad, y en cambio por qué en otras inmunizaciones naturales o artificiales sucede lo contrario. Ciertamente que en una mezcla de plasma de los dadores de sangre puede demostrarse una población miscelánea de más de 20 anticuerpos distintos [J. F. ENDERS (1944)]; pero de este descubrimiento no puede de ningún modo sacarse la conclusión de que todos los anticuerpos tengan tendencia a persistir en el suero de todos los individuos; en efecto, téngase en cuenta que el producto investigado era una *mezcla de plasma sanguíneo de numerosos hombres adultos, cuya historia inmunológica no se conocía con exactitud*. Para sacar conclusiones se requieren, pues, datos fidedignos.

Del experimento de anafilaxia pasiva se deduce que una reacción anafiláctica sólo se produce cuando en el organismo del animal que reacciona existen anticuerpos correspondientes al antígeno que desencadena. Si se sensibiliza un cobayo por una única inyección subcutánea de 0,01 a 0,001 ml. de suero de caballo, se mantiene durante un año o más en estado anafiláctico, mientras que la anafilaxia activa inducida por el mismo antígeno, pero en otras especies animales (conejo, perro), desaparece en breve tiempo. Parece, pues, que tal persistencia se debe no a la naturaleza del antígeno, sino a la especie del animal que se inmuniza. Ahora bien, esta afirmación no tiene aplicación general, como se deduce de los siguientes hechos, en estrecha relación con el tema en estudio.

Las isoaglutininas del hombre son permanentes; aparecen entre los tres y seis meses después del nacimiento, y se aprecian en el suero hasta las edades más avanzadas, aunque el título después de los diez años se reduce de modo paulatino (véase pág. 56). Si a una persona del grupo B se le inyecta por vía intravenosa la sustancia A, sube el título de las aglutininas α ; individuos del grupo O reaccionan frente a la inyección intravenosa de A + B con una elevación del título de las aglutininas α y β . La cima se alcanza a los diez-doce días de la inyección, es decir, más tarde de lo que cabría esperar de la circunstancia de que, en ambos casos, la producción de las hemaglutininas correspondientes ya estaba en marcha, de modo que la inyección de A en el primero, o de A + B en el segundo, debía actuar acelerando como una *injection de rappel*. Después de alcanzado el punto culminante, este título, alcanzado de modo artificial, comienza de nuevo a

reducirse. E. WITEBSKY, N. C. KLENDSHOJ y C. McNEIL (1944) de cuya comunicación se toman estos datos, no dicen cuándo se recupera el nivel anterior a la inyección, porque las personas inyectadas sólo se mantuvieron en observación dos meses, pasados los cuales el título continuaba por encima del nivel inicial. Ahora bien, del hecho de que la elevación del título provocado por vía artificial sea transitoria hay que deducir que la producción continua de las isoaglutininas espontáneas (es decir, producidas sin estímulo antigénico) se producen de modo distinto y por otra vía que las accidentales; es decir, que no responden al mismo estímulo antigénico.

Si se acepta que la acción del antígeno se reduce a un estímulo que tiene como consecuencia la formación de los anticuerpos [véase R. DOERR (1947 a), pág. 14], sólo puede concebirse la renovación continuada de los anticuerpos (condición necesaria para su mantenimiento duradero en la sangre) si se admite que las células estimuladas son también persistentes, o que las modificaciones de la síntesis de las globulinas provocadas por el estímulo, se transmiten de generación en generación de células. Este postulado parece tanto más incomprensible si se considera que la hipótesis tiene como base la idea de que los anticuerpos se producen por la modificación de la síntesis intracelular de las globulinas debida a la presencia espacial de un antígeno. Ni el antígeno ni ningún derivado desconocido del mismo pueden persistir durante tiempo ilimitado en las células sintetizadoras, sino que deben desaparecer de ellas en pocos días; si las células siguen produciendo anticuerpos, sólo cabe la explicación de que persiste la desviación determinada en la síntesis de las globulinas, y cuando esta desviación prosigue durante meses y años hay que admitir que la célula influida es, a su vez, persistente o capaz de transmitir a sus descendientes la anomalía adquirida en su síntesis de globulinas. Las células que, como los hematíes (exentos de núcleo), tienen vida breve y no puedan multiplicarse por partición, quedan, pues, excluidas. ¿Es cierto que los linfocitos, como opina P. R. CANNON (véase pág. 75), se asemejan en esto a los hematíes y son tan lábiles como ellos desde el punto de vista morfológico y funcional? Los hematólogos contestan de modo diverso (1). Muchos autores atribuyen a los linfocitos genuinos una vida de pocos días, mientras que otros se refieren a las investigaciones de A. MAXIMOW (1928), según las cuales los linfocitos y monocitos de la sangre de mamíferos en cul-

(1) Agradecemos esta información a los doctores M. ALLGÖWER (Basilea) y E. UNDRITZ (Basilea).

tivos de tejidos se transforman en formas ameboides fagocitarias, en las que pueden observarse, aunque rara vez, mitosis; en estas formas se desarrollan, finalmente, fibroblastos. A. CARREL y A. H. EBELING (1922) observan que las células *mononucleares pequeñas y de tamaño medio* de los cultivos que se ven en gran número durante las primeras semanas desaparecen después espontáneamente; admiten que es posible su transformación en otras formas de mayor tamaño, tal como la describe MAXIMOW; ahora bien, la última transformación en células mayores semejantes a los fibroblastos sólo han podido observarla en los mononucleares grandes y únicamente en determinadas circunstancias. Esta divergencia de los puntos de vista está relacionada con la dificultad de distinguir entre sí las diversas formas de los leucocitos mononucleares: debido a ello no tiene aún respuesta definitiva la cuestión de si puede atribuirse a los linfocitos la capacidad de mantener de modo duradero por la nueva vía una síntesis de globulinas desviada por estímulo antigénico.

3. LAS CATEGORÍAS DE LOS ANTICUERPOS NATURALES Y LOS MODOS DE PRODUCIRSE.

Los dos puntos de vista concernientes a la producción de los anticuerpos naturales (es decir, existentes en sueros normales), el que defiende su origen espontáneo y el que atribuye la formación a estímulos inmunizantes criptogénicos o latentes, no pueden enfrentarse con el carácter de una disyuntiva general, sino prevalecer uno u otro en cada caso particular, según sea el tipo de anticuerpo y el del antígeno que reacciona con él. La alternativa expuesta debe resolverse de modo distinto, según se trate de hemaglutininas que actúen sobre hematies propios del individuo, propios de la especie (aunque extraños al individuo) o propios de otra especie—es decir, de auto, iso o heterohemolisinas—, de aglutininas bacterianas, de bacteriolisinas o de antitoxinas. Los anticuerpos, según esto, sólo poseen una propiedad que sea común a todos ellos, a saber: su especificidad con respecto al antígeno, gracias a la cual se combinan con él; *por ello, bastaría con que pudiera establecerse con seguridad, para un anticuerpo la génesis espontánea, para admitir como posible para todos los anticuerpos esta forma de producirse*, con independencia de que sus reacciones con el antígeno se ofrecieran a simple vista como aglutinación, precipitación, citólisis o neutralización de una toxina. En el fondo no es la denominación del anticuerpo lo que debe influir en nuestra opinión sobre

su origen, sino la consideración de las posibilidades que haya tenido el antígeno para inmunizar al hombre o a una determinada especie animal; cuando la eventualidad de tales contactos sea grande, debe considerarse como seguro, o muy probable, que la producción del anticuerpo se deba a impulsos inmunizantes exógenos, aunque en contra de esta opinión hablen muchas circunstancias. La génesis espontánea sólo debe admitirse cuando a ello no fueren determinadas razones, e incluso entonces hay que intentar buscar una interpretación que haga válida la otra explicación. En consideración al estado del problema, una exposición general del tema sólo puede tener valor limitado, y ha de completarse por el estudio especial de la formación de los diversos tipos de anticuerpos naturales.

A. LAS ISOAGLUTININAS.

a) *Las isoaglutininas en el suero del hombre.*

a) *Las isoaglutininas del sistema A-B.*

Como es sabido, distinguimos 4 grupos fundamentales en el hombre, a saber:

}

O α β

A β

B α

A B θ

Las mayúsculas latinas designan la sustancia específica de grupo de los hematíes, es decir, los isoaglutinógenos; las minúsculas griegas, las isoaglutininas. De las sustancias específicas de grupo sabemos que se heredan como características raciales, obedeciendo a las leyes de MENDEL. Según la teoría de F. BERNSTEIN (1925), dirigen esta herencia 3 genes alelomorfos A, B y O, de los cuales A y B dominan sobre O. Como cada célula germinal sólo puede contener uno de estos 3 genes, las combinaciones libres de las 3 especies posibles de espermios con las 3 posibles especies de óvulos dan lugar a 6 genotipos que, a consecuencia de la dominancia de A y B sobre O, dan lugar a 4 fenotipos. La tabla 3, tomada de A. S. WIENER (1945, página 180), pone de manifiesto la hipótesis de BERNSTEIN.

Carece de alcance para lo que sigue que la hipótesis de BERNSTEIN sea justa o que deba admitirse una de las otras dos teorías que sólo

admiten dos genes alelos A y B. En todo caso no cabe duda de que los isoaglutinógenos de los hijos se heredan de los padres, y que después de la formación del cigote se fijan de modo invariable; los factores a que deben su formación ya existen en potencia antes de que el individuo se engendre; es decir, antes de que tenga lugar la fecundación del óvulo a consecuencia de la cual se desenvuelve el individuo. Pero si revisamos todos los símbolos de los cuatro grupos principales, observamos inmediatamente que *estas afirmaciones también son válidas para las isoaglutininas*. Si los hematíes contienen A, el suero (prescindiendo de los primeros periodos después del nacimiento) contiene también aglutininas para los hematíes B (β); del mismo modo están asociados B y α ; O y α , β ; AB y la ausencia de ambas aglutininas. Estos hechos pueden desdoblarse en dos afirmaciones. En la aseveración negativa de que en un individuo jamás coexisten A y α , B y β , y AB y α o β (*ausencia de la isoaglutinina incompatible*), y en la aseveración positiva de que existe siempre la aglutinina, que no puede reaccionar con la sustancia específica del hematíe (*presencia de la isoaglutinina incompatible*).

TABLA 3
Herencia de los isoaglutinógenos, según
BERNSTEIN.

Fenotipos.	Genotipos.	
	Homocigote.	Heterocigote.
AB	AA	AB
A	BB	AO
B	OO	BO
O		

La ausencia de aglutinina incompatible puede atribuirse a la gran cantidad de sustancia específica de grupo que existe en los hematíes; debido a esto, a medida que se produzca la aglutinina puede combinarse (saturarse) de modo permanente con esta sustancia; de esta forma comenzaría estando en forma enmascarada y después sería eliminada. Un hombre del grupo sanguíneo A, según esto, no sólo produciría la aglutinina β , sino también la aglutinina α , pero ésta sería adsorbida *in dosi refracta* a la masa inagotable de sustancia A, neutralización que, por efectuarse fraccionadamente, resultaría inocua. Esta hipótesis, denominada *de la fijación*, ha sido defendida por numerosos investigadores de este campo especial, y hasta ha ofrecido un punto de partida para amplios corolarios, "porque muestra que también puede existir un iso o un autoanticuerpo, aunque no pueda descubrirse por los métodos usuales, y además que los anticuerpos incompatibles pueden neutralizarse o inactivarse por procesos de combinación específica"

[C. HALLAUER (1946)]. Sin embargo, resulta difícil de concebir que en el funcionamiento bioquímico del organismo se sintetice durante toda la vida una aglutinina, es decir, una globulina específica, sólo para combinarse de modo continuo en los hematíes y para de este modo hacerse inocua. Además falta demostrar tanto la producción de una tal globulina como su origen, y como tampoco ha podido descubrirse su combinación en los hematíes, hay que dar preferencia a otras hipótesis que no estén lastradas por tantas condiciones "antibiológicas". A ello además nos obliga el considerar que no sólo se trata de que falta la aglutinina incompatible, sino de que *la aglutinina distinta se encuentra siempre en la sangre.*

F. BERNSTEIN (1925) busca una salida suponiendo que todos los hombres forman tanto la aglutinina α como la β , opinión fundada en la existencia fenológica del grupo O α β , pues en él faltan A y B, y de acuerdo con ello existen siempre α y β . Para poner de acuerdo la falta de las aglutininas incompatibles en los otros tres grupos principales, BERNSTEIN se refiere a la hipótesis de fijación cuya esencia ya hemos expuesto. Sin embargo, si todo hombre no sólo pudiera formar ambas aglutininas, sino que de hecho las produjera durante toda la vida, se trataría de una función común a todos los hombres y que se realizaría siempre, es decir, de un *carácter de la especie no subordinado a las leyes de MENDEL, es decir, al mecanismo de la mixovariación, en contraste estricto con el modo de heredarse las sustancias específicas de grupo de los hematíes.* Esta tendencia a atribuir a la herencia de los isoaglutinógenos un mecanismo distinto que el de la herencia de las isoaglutininas, se encuentra también en L. HIRSZFELD (1926) y O. THOMSEN (1927, 1929, 1930), quienes, como BERNSTEIN, consideran que la aparición de isoaglutininas es una "función de la especie".

Por la hipótesis de BERNSTEIN se excluye teóricamente la formación *inmunizatoria* de las isoaglutininas *en condiciones naturales.* Según BERNSTEIN, el hombre produce estas globulinas inmunes como una función propia de su especie, sin necesidad de que un estímulo antigénico desencadene su producción, y las sintetiza de modo análogo a otras globulinas, a la albúmina, fibrinógeno, etc. Si un individuo del grupo A formara de modo prolongado la aglutinina α , incompatible, como el antígeno correspondiente existe en el mismo individuo, tal aglutinina podría considerarse como un autoanticuerpo, pero no como un autoanticuerpo producido por autoinmunización, sino como un producto del metabolismo proteico que posee una afinidad casual con un isoaglutinógeno producido de otro modo. *De este modo parece*

destruirse toda relación entre el isoaglutinógeno y la isoaglutinina, aunque nadie al examinar el cuadro de los grupos sanguíneos pueda perder la impresión de que tal dependencia existe.

Influídos evidentemente por tal impresión, F. SCHIFF y L. ADELBERGER (1924) formularon su *hipótesis de la autoinmunización*. Partieron de la posibilidad de que los hombres del grupo A, junto con el factor A dominante, por cantidad o por mayor actividad antigénica, poseen una mínima cantidad de B que no puede demostrarse serológicamente, pero que resulta suficiente para producir por autoinmunización aglutininas β . Estas aglutininas persisten en el suero porque la cantidad de componente B, relativamente pequeña, no alcanza a fijarla por adsorción. Lo dicho para B, si la hipótesis fuera cierta, valdría también para A; es decir, A formaría también por autoinmunización el correspondiente anticuerpo, es decir, la α -aglutinina, que, por la gran cantidad de A, estaría neutralizada por completo en los hematíes. El esquema vale evidentemente también para los grupos sanguíneos B α y A B θ ; pero es necesario prescindir de él porque carece de base experimental [véase V. FRIEDENREICH (1931)]. Por lo demás, es también insostenible desde el punto de vista teórico. La concepción de que en la sangre de un hombre del grupo A β exista una cantidad de sustancia B justamente necesaria para provocar una violenta producción de anti-B (β), pero no suficiente para fijar el anti-B producido, no sólo resulta poco probable, sino que descuida enteramente el hecho de que la cantidad hipotéticamente pequeña del factor B debe existir a lo largo de toda la vida, y no sólo en el momento en el que se produzca la "autoinmunización", ya que el anti-B circula permanentemente en la sangre.

T. FURUHATA (1927) formula otra variante de la hipótesis según la cual *existen genes especiales para la producción de las isoaglutininas*. Según esta teoría, el carácter fenotípico de pertenecer a un determinado grupo sanguíneo está regulado por cuatro genes:

Gene A, que provoca la formación de la sustancia A específica de grupo.

" a, que condiciona la aparición de la aglutinina α ,

" B, que determina la síntesis del aglutinógeno B,

" b, que determina la aparición de la aglutinina β .

Además se admite que A domina sobre a y B sobre b, que los 4 genes forman 3 pares (A b), (aB) y (ab), y, por último, que los dos genes de cada par están íntimamente copulados entre sí, de modo que el par sólo puede heredarse como un todo. Los 3 pares de genes corresponden a los genes A, B y O de la teoría de BERNSTEIN, y por ello en

el curso de la herencia pueden resultar los mismos fenotipos, como se observa al comparar la tabla 3 con la tabla 4.

Según la hipótesis de FURUHATA para explicar que no se producen aglutininas incompatibles, no es necesario recurrir a hipótesis de fijación ni a ninguna otra que se apoye en autoimmunizaciones; la hipótesis reduce al mismo principio la herencia de las sustancias específicas de grupo y la de las isoaglutininas; por su edificación armónica y generalidad sobrepasa a la teoría de BERNSTEIN. Pero está edificada sobre la hipótesis auxiliar de que el grupo sanguíneo O $\alpha\beta$ es solamente negativo; es decir, que está caracterizado por la ausencia

TABLA 4

Herencia de los grupos sanguíneos, según FURUHATA.

Fenotipos.	Genotipos.	
	Hemocigote.	Heterocigote.
O	(ab) (ab)	
A	(Ab)(Ab)	(Ab) (ab)
B	(aB)(aB)	(aB) (ab)
AB		(Ab) (aB)

de A y B, de modo que el símbolo O no corresponde a ninguna sustancia específica de grupo (a ningún aglutinógeno especial); además se trata de un sistema rígido en el cual los aglutinógenos A y B y las aglutininas $\alpha\beta$ (en la tabla 4 designadas a y b) se representan como componentes de reacción únicos, singulares e invariables. Ahora bien, investigaciones ulterio-

res han enseñado que no puede admitirse O como "antígeno nulo", ni la unidad de A, B, α y β (1).

aa) *El antígeno O como sustancia específica de grupo y la aglutinina anti-O.*—Del mismo modo que no pueden distinguirse entre sí por análisis químicos A de B, tampoco por este procedimiento puede demostrarse la existencia de una sustancia O específica de grupo [K. LANDSTEINER y HARTE (1940, 1941)]. Actualmente sólo hay un medio de conseguir este fin: se han encontrado sueros que aglutinan de modo selectivo los hematíes del grupo O. Tales sueros se han conseguido por tres métodos:

1. Entre las personas que pertenecen a los subgrupos (véase página 92) A_1B o A_1 , y más raramente al grupo sanguíneo B, se encuentran algunos cuyo suero aglutina los hematíes de todos los

(1) En una nota de A. S. WIENER (1945, pág. 194) se ha hecho notar además que las parejas de genes inseparables, tal como las admite FURUHATA, se consideran normalmente por los genéticos como acciones múltiples producidas por un único gene.

individuos del grupo O. El título anti-O de estos sueros suele ser bajo; pero, según P. DAHR (1947), está íntimamente adaptado a la porción específica de grupo de la sustancia O. Tampoco cabe opinar que reaccionen con la porción específica de especie de O (2), porque se trata de sueros humanos, y el hombre, según la regla de EHRlich del *horror autotoxicus*, no puede formar anticuerpos contra un antígeno específico de su especie (consúltese el punto 2).

2. En el suero normal de muchas especies animales puede descubrirse circunstancialmente, es decir, en determinados individuos, una aglutinina O. Los primeros resultados positivos utilizando suero vacuno normal fueron comunicados simultáneamente por F. SCHIFF (1927) y por E. WITEBSKY y OKABE (1927). PETER DAHR (1938, 1939) extendió sus investigaciones a otros sueros normales y encontró aglutininas O en el 16 por 100 de las vacas, 5,7 por 100 de los perros, 3 por 100 de los cerdos, 1,3 por 100 de las ovejas, 7,6 por 100 de los gatos, pero nunca en cobayos o caballos. También obtuvo siempre resultados negativos en los sueros normales de conejo y de cabra. Sin embargo, los datos negativos concernientes a conejos, caballos y cabras se han impugnado posteriormente por J. SCHMIDT-SCHLEICHER (1940), fundándose en numerosos ensayos propios. Las aglutininas O de los sueros animales normales poseen en general título bajo, es decir, habitualmente no aglutinan sino a concentraciones elevadas los hematíes humanos, y esta afirmación es válida tanto para los del grupo sanguíneo O como para los de otros tipos de sangre, aunque ciertamente en menor grado y con la excepción de los hematíes del subgrupo A₂, que en ocasiones resultan aglutinables en el mismo grado que los hematíes O.

Con auxilio de un suero normal de bovino que aglutina los hematíes O. PETER DAHR (1947) intenta demostrar que es probable que la sustancia O no sea homogénea, es decir, que esté compuesta de un

(2) Bajo la designación de "específica de especie" en este lugar no debe entenderse la propiedad que determina las diferencias entre los hematíes del hombre y los hematíes de los animales. La expresión se refiere más bien a la hipótesis de L. HIRSZFELD (1934), según la cual todos los hematíes del hombre, cualquiera que sea el grupo sanguíneo a que pertenezcan, poseen un componente O común, aunque contenido en distinta proporción, que (dentro de esta hipótesis) puede designarse como un "receptor de especie" (no condicionado por un genotipo). El adjetivo "específico de especie"—que, ciertamente, se presta a confusión—no hace más que marcar la oposición con respecto a un segundo componente de la sustancia O condicionado de modo específico por el genotipo, cuya existencia se ha esforzado en demostrar P. DAHR.

componente específico de especie y de otro de grupo. Tituló el suero primeramente con hematíes O, volvió a adsorber a hematíes A₂B, y volvió a titular; por último, efectuó una segunda adsorción a hematíes A₂B. Los resultados de las titulaciones se resumen en la tabla 5.

TABLA 5

Adsorción de la aglutinina O de suero normal de bovino, a los hematíes A₂B del hombre.

Diluciones del suero.	Suero bovino normal titulado con hematíes O del hombre.			
	Sin adsorber.	Después de una adsorción a hematíes A ₂ B.	Después de una nueva adsorción a A ₂ B.	Después de la 3. ^a adsorción a A ₂ B.
1	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	++
4	+++	++	++	+
8	+++	+	±	—
16	++	—	—	—
32	+	—	—	—
64	+	—	—	—

DAHR comenta así este experimento: en primer lugar considera que la reducción del título conseguida por la primera adsorción con A₂B es lo bastante grande para considerarla específica; en segundo lugar, que no toda la aglutinina O del suero de bovino puede eliminarse, sino sólo una parte que, además, no puede ser específica de grupo porque en el genotipo del grupo sanguíneo A₂B no está contenido el factor hereditario para O (según la teoría de BERNSTEIN); en tercer lugar, que las adsorciones posteriores a A₂B no reducen de modo manifiesto el título de aglutininas, y en cuarto lugar, que las aglutininas O que aun resten después de la adsorción pueden separarse por adsorción a hematíes O (lo que no se recoge ni en la tabla anterior ni en los protocolos del experimento de DAHR, aunque se da en el texto de la publicación de este autor). Este resto sería, pues, idéntico al componente específico de grupo de la sustancia O, el cual está condicionado genóticamente, y por ello sólo puede existir en los hematíes cuya fórmula sea OO, o en los que pertenezcan a los genotipos heterocigóticos AO y BO, pero no en los hematíes de individuos que pertenezcan a los genotipos AA, BB, o AB o A₁B y A₂B (consúltese la tabla 6).

Con respecto a las importantes conclusiones que deduce P. DAHR de sus experimentos con suero de vaca aglutinables por O, sería de

desea una base experimental más convincente que la recogida en la tabla 5. Lo poco satisfactorio de los resultados se debe a la dificultad de encontrar sueros normales con elevado título, y también en parte a la forma poco concreta de delimitar los diversos grados de intensidad de los resultados de la reacción.

3. M. v. EISLER (1930, 1931) inmunizó cabras con bacilos de la disentería de SHIGA muertos por formol, y obtuvo un antisuero que no sólo aglutinaba los bacilos de SHIGA, sino los hematíes humanos de todos los grupos sanguíneos, pero no los hematíes de carnero. La acción aglutinante de tal suero sobre los hematíes humanos fueron comprobadas por K. LANDSTEINER y LEVINE (1930 a), K. LANDSTEINER (1931), F. SCHIFF (1934) y L. HIRSZFELD y KOSTUCH (1938), de cuyos trabajos se deduce que los hematíes O y los del subgrupo A₂ se aglutinan habitualmente, aunque no sin excepción [J. SCHMIDT-SCHLEICHER (1940)], con más intensidad que los hematíes humanos de otros grupos sanguíneos. Tales sueros de cabra anti-SHIGA, en oposición a los sueros normales mencionados, sub 1 y sub 2, poseen un título elevado (1: 500 a 1000), y, por consiguiente, resultan más apropiados para efectuar investigaciones comparadas de la aglutinabilidad de los hematíes humanos de diferentes grupos sanguíneos. Si se adsorbe un suero de cabra anti-SHIGA a bacilos SHIGA, a los que aquél aglutina, los bacilos no sólo fijan las aglutininas bacterianas, sino también las hemaglutininas. Por el contrario, los bacilos de SHIGA no son capaces de fijar la aglutinina O de un suero vacuno normal o de un suero humano normal [F. SCHIFF (1934), M. v. EISLER (1930)]. Además, M. v. EISLER, en 1930, ha observado que por la adsorción a hematíes humanos de un suero de cabra anti-SHIGA sólo se separan las hemaglutininas dirigidas contra él, pero no las aglutininas para los bacilos de SHIGA; mientras que, como se ha dicho, los bacilos de SHIGA fijan ambas aglutininas parciales; por consiguiente, la prueba de adsorción al bacilo de SHIGA no es recíproca. Los sueros de cabra anti-SHIGA y sus propiedades volverán a discutirse en otro lugar.

Poco después de haberse efectuado las experiencias reseñadas acerca de "el antígeno O en cuanto sustancia específica de grupo y la aglutinina O" apareció una publicación de W. T. J. MORGAN y W. M. WATKINS (1938), donde se expone una concepción que difiere de las conclusiones anteriores en puntos fundamentales; esta concepción, aunque no enteramente exenta de posibles objeciones, está, sin embargo, muy bien fundamentada desde el punto de vista serológico.

por lo que se considerará en este lugar (véanse también págs. 100 y siguientes).

Según W. T. J. MORGAN y W. M. WATKINS, los sueros normales, los sueros anti-SHIGA de cabra y los sueros inmunes de conejo no deben sus propiedades a la denominada sustancia O (bajo cuyo nombre se designa una sustancia que, como los factores A y B, es el producto de un gene especial que podría denominarse gene O), sino a un antígeno heterogenético que, para evitar confusiones, podría designarse con la letra "H" (inicial de "heterogenético"). Los sueros que reaccionan con este antígeno H se designarían bajo el nombre común de sueros "anti-H". La denominada sustancia O, encontrada por H. SASAKI (1932) en la saliva, por E. WITEBSKY y N. C. KLENDSHOJ (1941) en la mucosa del estómago y por W. T. J. MORGAN y R. V. HEYNIGEN (1944) en los quistes ováricos pseudomucinosos, y caracterizada por W. T. J. MORGAN y WADDELL (1945) como un mucoide muy semejante a las sustancias A y B, no sería, según MORGAN y WATKINS, sino la misma sustancia H muy difundida y no el verdadero producto de un gene O. La primera prueba de que la sustancia H debe ser distinta del factor O condicionado por un genotipo es el hecho de que los individuos de fórmula sanguínea A_1B , en que debe faltar el gene O, no sólo segregan en su saliva las sustancias A y B en forma hidrosoluble, sino también la sustancia mal denominada O, cuya presencia en la secreción sería indudable, sin que pueda considerarse como un producto cuya presencia está condicionada por un gene, ya que éste no existe en la fórmula hereditaria A_1B .

Como se ve a primera vista, estas opiniones se acercan mucho al punto de vista defendido por PETER DAHR (1947), según el cual la sustancia O de los hematíes humanos no es homogénea, sino que se compone de un "receptor de especie" que existe en todos los hematíes (es decir, no condicionado por un genotipo) y de un componente condicionado por un genotipo, que se encuentra solamente en los hematíes de la fórmula homocigótica OO o de las heterocigóticas AO y BO, pero no en los hematíes de los individuos cuyos genotipos sean AA, BB, A_1B o A_2B . DAHR, sin embargo, intenta aislar los anticuerpos contra la sustancia O condicionada por la herencia (genotípica), por la adsorción de suero normal de bovino a hematíes A_2B (véase páginas 86 a 89); lo que, según MORGAN y WATKINS, es imposible, porque el suero normal de bovino sólo contiene un anticuerpo anti-H, pero no un verdadero anti-O.

Según MORGAN y WATKINS, hasta 1948 no existía ninguna prueba directa de la existencia de un factor O condicionado por un gene

especial. Por primera vez este año K. BOORMAN, B. DODD y B. E. GILBEY (1948) encontraron unos pocos sueros humanos que aglutinaban los hematíes O y que diferían de todos los sueros animales y humanos conocidos hasta entonces que poseen esta propiedad en que la aglutinación no se inhibía por las sustancias equivocadamente denominadas O, que inhiben en cambio por completo las aglutinaciones denominadas O provocadas por suero normal de bovino, suero de cabra anti-SHIGA, etc. Los datos comunicados por BOORMAN y colaboradores fueron comprobados y ratificados por MORGAN y WATKINS. Según ello, hasta la fecha no poseemos más que un único reactivo para demostrar el verdadero antígeno O (condicionado genotípicamente): un suero humano que aglutina los hematíes O sin que la reacción sea inhibida por la sustancia H.

MORGAN (1947) ha publicado recientemente una extensa revisión de conjunto de las propiedades químicas y físicas de las sustancias A, B y H. Según esta comunicación, las tres sustancias son extraordinariamente semejantes, y entre sus propiedades comunes se encuentra algunas de carácter tan singular que parecen demostrar que poseen una estructura idéntica: las diferencias probablemente deben consistir tan sólo en la presencia o ausencia de pequeños grupos o en la configuración esteroquímica de grupos comunes. Este parentesco químico-físico se aprecia también serológicamente. L. HIRZFELD y R. AMZEL (1940 a) han encontrado que la aglutinabilidad por un suero anti-A y un suero anti-H se ofrece como una función aditiva de suma constante, y MORGAN y WATKINS confirmaron que entre la aglutinación por anti-A (o anti-B) y anti-H puede apreciarse un comportamiento recíproco, ya que los hematíes que se aglutinan enérgicamente por anti-A (o anti-B) sólo dan una débil reacción con anti-H, y recíprocamente. Por último, un suero anti-H reacciona con hematíes de la fórmula A_2 o A_2B , de modo que aquí también tenemos una relación entre la extendida sustancia H y un factor de los hematíes condicionado por herencia. En el próximo capítulo se expondrá cómo MORGAN y WATKINS resuelven la contradicción de que el heterogenético H, que no debe considerarse realizado por un factor de herencia, esté en tan íntima relación serológica y química con los factores de los grupos sanguíneos condicionados por herencia (genotípicos).

En muchos casos se encontraron sueros humanos, que contenían la aglutinina anti-O verdadera (no inhibible por la sustancia H), que se dejaban influir de modo antagónico por el líquido de los quistes ováricos. MORGAN y WATKINS se inclinan por ello a opinar que la sustancia O genotípica, igual que las A y B, existe también en forma

hidrosoluble, aunque es segregada, en general, en concentraciones mucho más bajas. Según ello, el contenido de los quistes ováricos en las muestras investigadas hasta ahora pudiera poseer, junto a grandes cantidades de H, pequeñas cantidades de O, lo que, junto con la semejanza físico-química de ambas sustancias, debe dificultar considerablemente el aislamiento de O puro. MORGAN y WATKINS esperan, sin embargo, resolver este problema, y obtener por inmunización con O puro un reactivo enérgico, es decir, un suero anti-O de título elevado (véase pág. 100) más fácilmente asequible que los raros sueros anti-O humanos. Esta esperanza nace de la hipótesis de que la sustancia H se transforma en la O por sucesivas mutaciones; se pueden encontrar individuos en que la mutación sea completa, es decir, en que todo el H esté transformado en O en los que se habría logrado la finalidad propuesta (véase pág. 101).

ββ) *Las variantes de la sustancia A y su significación biológica* (L. HIRSZFELD).—La singularidad de la sustancia A fué puesta en entredicho por E. v. DUNGERN y L. HIRSZFELD ya en 1911. Encontraron que los sueros de los individuos del grupo B (a) por adsorción a los hematíes de los grupos A o AB reducían siempre su efecto aglutinante sobre los hematíes usados, pero conservaban la capacidad de aglutinar los hematíes de otros hombres de estos dos grupos. Propusieron por ello una subdivisión del grupo A en A y a, designaciones que K. LANDSTEINER y LEVINE (1929, 1930 b) consideraron conveniente sustituir por A₁ y A₂. El estudio de la herencia de estos subgrupos, iniciada por LANDSTEINER y LEVINE (1927) y proseguida por ellos y por otros autores, obligó a O. THOMSEN, FRIEDENREICH y WORSAAE (1930 a, b) a ampliar el esquema de BERNSTEIN (véase página 83) de modo que en lugar de los tres genes de este autor se admiten cuatro genes alelomorfos A₁, A₂, B y O, de los cuales A₁, A₂ y B dominan sobre O, y A₁ domina sobre A₂. Los genotipo y fenotipos que resultan de esta hipótesis se resumen en la tabla 6.

Si la hipótesis conviene o no con el proceso hereditario real, tanto en éste como en otros esquemas, sólo puede saberse si se conocen los grupos sanguíneos a que pertenece el mayor número posible de parejas de padres y de sus hijos, cuya descendencia legítima se haya establecido con suficiente seguridad, y examinar si en la lista se observan combinaciones irreconciliables con la teoría y establecer, además, la proporción en que tales combinaciones se encuentran con respecto al número de las que están conformes con la teoría. Según las observaciones de varios especialistas reunidas por A. S. WIENER (1945, pág. 120), que se extienden a 1.068 familias, la hipótesis de

THOMSEN, FRIEDENREICH y WORSAAE resiste tan rigurosamente esta prueba que el pequeño número de casos que se apartan de lo previsto pueden ser atribuidos a la procedencia ilegítima de los hijos.

Con el desdoblamiento del factor A, que antes se tenía por unitario, en A_1 y A_2 no se ha llegado, sin embargo, al término del proceso de diferenciación. La siguiente

etapa fué el establecimiento por W. FISCHER y F. HAHN (1935) y V. FRIEDENREICH (1936, 1937 a) de una tercera variante A_3 que se caracteriza porque sólo reacciona débilmente con suero anti-A incluso de título elevado. Como esta variante también resulta ser hereditaria, FRIEDENREICH considera un quinto gene aleomorfo A_3 que, según sus observaciones, domina sobre el O, lo mismo

que los A_1 y A_2 , pero en cambio resulta recesivo frente a éstos. Por consiguiente, a los seis fenotipos de la tabla 6 deben añadirse los A_3 y A_3B que, aunque raros, han podido ser, sin embargo, observados algunas veces por FRIEDENREICH en sus investigaciones, que abarcan a varios millares de personas. Según nuevas publicaciones de FRIEDENREICH (1937 b), L. HIRSZFELD y R. AMSSEL (1940), A. GAMMELGAARD y P. V. MARCUSSEN (1940) y otros, se deduce que con el descubrimiento de A_3 no parece agotada la variabilidad del factor A, pareciendo probable la existencia de variantes A_4 y A_5 . En investigaciones sistemáticas sobre 60.000 muestras de sangre, A_4 no se encontró sino en un solo caso, y a A_3 únicamente en 22. Ahora bien, GAMMELGAARD y MARCUSSEN se han referido a una familia de 64 miembros, de los cuales 24 poseían la variante A_4 , y esta familia "se comportaba en cuanto a la herencia como sería de esperar si se admitía la existencia de un cuarto gene A aleomorfo que fuera dominado por los A_1 y A_2 ".

L. HIRSZFELD intenta interpretar las relaciones biológicas existentes entre las variantes de la sustancia A por una teoría que se apoya en una serie de trabajos [L. HIRSZFELD y Z. KOSTUCH (1938); existen también ulteriores datos en la literatura] de la que ha vuelto a dar su

TABLA 6

Herencia de los grupos sanguíneos y de los subgrupos A_1 y A_2 según THOMSEN, FRIEDENREICH y WORSAAE.

Fenotipos.	Genotipos.	
	Homocigote.	Heterocigote.
O	OO	
A	$A_1 A_1$	$A_1 O$ y $A_1 A_1$
A_1	$A_2 A_3$	$A_2 O$
B_2	BB	BO
$A_1 B$		$A_1 B$
$A_2 B$		$A_2 B$

autor una revisión de conjunto en una de sus últimas publicaciones. L. HIRSZFELD (1947).

El suero anti-Shiga de cabra (véase pág. 89), según las observaciones de HIRSZFELD, actúa sobre los hematíes humanos que pertenecen a distintos grupos y subgrupos, aglutinándolos en forma distinta; de modo que puede establecerse una serie de la 'fórmula

$$O > \lambda_2 > B > \lambda_1$$

en la que la aglutinabilidad de los hematíes disminuye de izquierda a derecha. De ello HIRSZFELD deduce, en primer lugar, que el factor designado como O no puede ser un "antígeno nulo", como antes solía expresarse, sino, como A y B, un antígeno específico de especie existente en todos los hematíes humanos, y, en segundo lugar, que el suero de cabra anti-SHIGA ofrece un indicador cuantitativo para apreciar el contenido de O en los hematíes humanos, que también en la serie antes expuesta disminuye de izquierda a derecha con arreglo a la siguiente medida: por ejemplo, si hematíes O se siguen aglutinando por un suero de cabra anti-SHIGA diluido 400 veces, los hematíes A_1 sólo se aglutinan a la dilución máxima de 1:50; es decir, estos hematíes contienen ocho veces menos sustancia O que los anteriores (porque se admite que el antisuero sólo está adaptado de modo específico para la sustancia O); por lo que el 12,5 por 100 de los hematíes son hematíes O. Siguiendo la idea de BERNSTEIN de que O, A y B pueden producirse por mutación de un gene único, HIRSZFELD admite que este proceso no se verifica en una sola fase hasta llegar a su fin ideal, sino que existen formas intermedias. Si admitimos que O es la forma de partida, el primer estadio de la transformación se caracterizaría por estar serológicamente más próximo a O que las formas que se formarían después, de modo que los hematíes correspondientes se aglutinarían más enérgicamente por un suero anti-O, como corresponde a su mayor contenido de sustancia O (véase antes). Si consideramos en primer término la transformación de O en A, las variantes conocidas de A pueden ordenarse de la siguiente forma:

$$O \rightarrow \lambda_5 \rightarrow \lambda_4 \rightarrow \lambda_3 \rightarrow \lambda_2 \rightarrow \lambda_1 \rightarrow A_c.$$

en la que la cantidad de sustancia O disminuye de izquierda a derecha a la vez que, en la misma medida, aumenta la de sustancia A, hasta que, en la forma final (hipotética), la sustancia O está completamente sustituida por la sustancia A (A_c). Una serie análoga podría establecerse para la transformación hipotética de O en B, pero sólo si pu-

diéramos disponer como indicador de un suero anti-O, de cuyo poder de aglutinación para los distintos hematíes pudiera deducirse la existencia de formas intermedias; sin embargo, en la serie O \rightarrow B falta demostrar un punto, que (siguiendo siempre a HIRSZFELD) juega gran papel en la serie A, a saber, la existencia de subgrupos sumamente acusados con fundamento genotípico que regule su herencia, y, por otra parte, son de esperar diferencias de aglutinabilidad menos delimitadas, ya que la herencia de estos caracteres no se han demostrado, al menos de modo seguro.

HIRSZFELD explica que el suero del hombre sólo rara vez posea aglutininas para los hematíes del grupo O, porque los hematíes humanos, casi siempre en formas de transición, contienen más o menos sustancia O; los anticuerpos que pueden reaccionar en condiciones fisiológicas con antígenos circulantes están casi siempre enmascarados, porque o bien no se producen o se adsorben inmediatamente de haberse producido.

HIRSZFELD ha ilustrado su teoría con dibujos esquemáticos, que reproducimos en forma algo simplificada de una de sus últimas publicaciones (fig. 6).

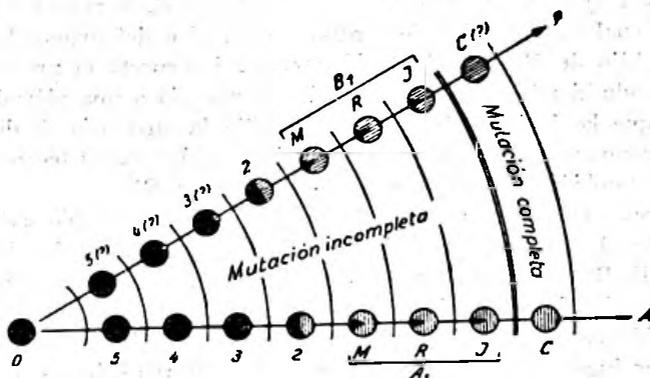


Fig. 6. Representación gráfica de la transformación de O en A y B. Los círculos representan hematíes, cuya porción coloreada de negro corresponde a su contenido de sustancia O; la porción rayada verticalmente marca la sustancia A, y la rayada horizontalmente la sustancia B. Los arcos de círculo encierran las denominadas por HIRSZFELD «pleyades», es decir, los hematíes con el mismo contenido de O y con la misma proporción del resto de O con respecto a la sustancia A o B, formada por mutación. Por ejemplo, la forma designada con 2 en la línea A está en la misma pleyade que la forma marcada por la misma cifra en la línea B.

Aunque sólo se trate de una mera representación simbólica, las expresiones de HIRSZFELD ofrecen una expresión adecuada para representar la aglutinabilidad O y las aglutinabilidades A y B; o, lo

que, según HIRSZFELD es equivalente, el contenido de O y A o de O y B para completar una suma constante. Según HIRSZFELD, el contenido en los hematíes de sustancia A y B puede deducirse, por diferencia, de su aglutinabilidad por un suero anti-O, siendo, según su hipótesis tanto mayor cuanto menor es su aglutinabilidad O, es decir, la cantidad de sustancia O que contienen; pero también, según este autor, *existe un criterio positivo en la dominancia de las formas de transformación posteriores con respecto a las previas*. En la serie de mutación de $O \rightarrow A$, en los procesos de herencia, A_1 domina sobre A_2 , A_2 sobre A_3 , etc.; en la línea de $O \rightarrow B$, B_1 domina sobre el B_2 , y todas las formas de transición dominan sobre O. Considerando la regla de la dominancia habría que admitir la existencia de un gran número de genes alelomorfos, y la subdivisión del subgrupo A_1 en M, R y J se funda también en observaciones según las cuales A_1 parece dominar sobre A_r , A_r sobre A_m y A_m sobre A_2 . En un apéndice a la publicación citada HIRSZFELD se esfuerza en demostrar que muchas observaciones que parecían incomprensibles, fundándose en las teorías de la herencia reconocidas, pueden aclararse de modo sencillo por la dominancia de las pléyades altas sobre las bajas; así explica, por ejemplo, un dato de L. E. YOUNG y E. WITEBSKY (1945) según el cual de un padre del grupo B y madre del grupo A_2B resultó un hijo de fórmula A_3B ; HIRSZFELD interpreta el proceso hereditario admitiendo que la B del padre pertenecía a una pléyade más elevada que la de la madre, y que por ello la sustancia A del hijo resulta menos acusada. HIRSZFELD señala además que su teoría puede aplicarse también al comportamiento del factor Rh.

La concepción de que en el hombre originalmente sólo existía el factor O y de que después se desarrollaron por mutación los factores A y B [F. BERNSTEIN (1925, 1930), L. H. SNYDER (1926, 1930)] no se admite, de ningún modo, por todos los autores que se ocupan de este problema. Se han hecho las siguientes objeciones principales: en primer lugar, que los aglutinógenos A y B también se observan en los monos antropoides y, en segundo lugar, que el grupo O es raro en los monos y que de los antropoides sólo existen chimpancés O, mientras que en los hombres predomina numéricamente el grupo O, hecho que nos acerca más bien a pensar de que el O sólo se ha producido por mutación cuando A y B ya existían, y que su predominio numérico se produjo por las isoimmunizaciones a consecuencia de los apareamientos heterocigóticos, inmunizaciones que han conducido a una paulatina extinción de los descendientes cuyos grupos sanguíneos eran incompatibles con los de la madre. Acerca del origen de los

grupos sanguíneos humanos existen opiniones tan diversas que ni las objeciones aducidas pueden hacerse valer con seguridad contra la teoría de HIRSZFELD. Según W. C. BOYD y L. G. BOYD (1937), en momias egipcias de cinco mil años de antigüedad puede apreciarse que las sustancias A y B ya existían en aquel tiempo y que, por consiguiente, la mutación de O en A y B, si es que verdaderamente ha tenido lugar, hubo de producirse en épocas prehistóricas [consultese A. S. WIENER (1945, págs. 316 y siguientes)].

La debilidad de la teoría de HIRSZFELD radica en su base puramente serológica. Es cierto que no se dispone de otro camino. Según el estado actual de nuestros conocimientos, los isoaglutinógenos de los hematíes humanos son polisacáridos que contienen nitrógeno, y que fundamentalmente están constituidos por galactosa y hexosamina; contienen además cierta proporción de nitrógeno que no puede atribuirse a la hexosamina, sino a aminoácidos, porque tales polisacáridos dan resultado positivo en el ensayo de la ninhidrina según VAN SLYKE [K. LANDSTEINER y M. W. CHASE (1936), K. FREUDENBERG, O. WESTPHAL y P. GREENWOOD (1936), W. F. GOEBEL (1938), K. LANDSTEINER y R. A. HARTE (1940, 1941)]. En los hematíes y en los órganos están combinados con lipoides, a lo que se debe que, como han observado F. SCHIFF y L. ADELSBERGER (1924) y K. LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1925), puedan extraerse con alcohol.

LANDSTEINER y HARTE (1940, pág. 560) opinan que los aminoácidos tal vez participen en las diferencias de especificidad. Se conocen muchos polisacáridos hapténoides que por su estructura química se asemejan a los isoaglutinógenos, especialmente a la sustancia A; además, el gran número de sustancias con distinta especificidad serológica que se han determinado con seguridad en los hematíes humanos resultaría más comprensible si, además de los hidratos de carbono, participaran aminoácidos en la determinación inmunológica de los isoaglutinógenos. Sin embargo, un experimento importante de W. T. J. MORGAN y de S. M. PARTRIDGE (1940) no puede ponerse de acuerdo con esta opinión. Estos autores, a partir de un polisacárido no antigénico, que poseía la misma especificidad que la sustancia A de los hematíes humanos, y del antígeno somático del bacilo de la disentería de SHIGA, prepararon un antígeno complejo energicamente inmunizante que suministraba un antisuero que aglutinaba los hematíes A a elevadas diluciones. En este caso era, naturalmente, el polisacárido el determinante de la especificidad, y la proteína bacteriana conjugada actuaba únicamente transformando el polisacárido (que aislado poseía propiedades de hapteno) en un antígeno completo. Como, por lo

demás, con polisacáridos de otra procedencia se obtuvieron resultados análogos, puede aceptarse, con gran probabilidad, *que las diferencias entre las variantes de los isoaglutinógenos deben deberse a las diferencias de los polisacáridos que los constituyen*. No se conoce exactamente la estructura química de estos polisacáridos; hasta la fecha no se posee ningún punto de partida aceptable que permita diferenciar entre sí los polisacáridos de las sustancias A, B y O, y no puede ni plantearse siquiera el problema de una caracterización por la estructura química de las variantes A₁, A₂, A₃, A₄ y A₅. Las diferencias específicas, hasta la fecha, sólo pueden apreciarse de modo serológico. *Sin embargo, para aceptar la teoría construida por HIRSZFELD sobre descubrimientos puramente serológicos, de una transformación gradual mutativa de O en A o B, debe admitirse que simultáneamente con este proceso se deben producir modificaciones en la estructura química de los polisacáridos que condicionan la especificidad*. Lo que, en opinión del autor, no es concebible; para ello, en la estructura química del polisacárido de la sustancia O, y tras períodos extraordinariamente grandes (véase pág. 97), deberían repetirse unas modificaciones mutativas dirigidas en el mismo sentido que tuvieran como consecuencia una demolición sucesiva de los determinantes inmunológicos de O y una sustitución dinámicamente equivalente por determinantes para A (o para B). Si se considera a lo improbable de este proceso parece recomendable comprobar el fundamento experimental de la hipótesis.

El punto de partida nos lo brinda la afirmación de que un antisuero obtenido por inmunización de cabras con el *Shigella dysenteriae* aglutina hematíes humanos de diferentes grupos sanguíneos (O, B, A₁, A₂, y en pequeño grado, aunque no constantemente, A B). El *S. dysenteriae*, en la forma S contiene un polisacárido determinante de la especificidad que fué obtenido en forma muy pura y analizado por W. T. J. MORGAN (1931, 1936, 1937 y 1938); consta de unidades constituidas por una molécula de un aminoazúcar acetilado y cuatro moléculas de hexosa, y rinde en la hidrólisis d-galactosa y l-ramnosa. Si se inmuniza con *S. dysenteriae*, el anticuerpo obtenido está adaptado específicamente a *este polisacárido*, y si actúa también sobre el polisacárido de los hematíes humanos, esto únicamente significa que el polisacárido del *S. dysenteriae* y el polisacárido de los hematíes aglutinables poseen una estructura química semejante que permite la observación de reacciones de parentesco; pero no justifica, naturalmente, establecer una relación filogénica entre el bacilo de la disentería y los hematíes del hombre. *Del mismo modo tampoco debe exis-*

tir una relación genética entre los diferentes tipos de hematies humanos que se aglutinan por un suero anti-Sigma de cabra. Si se formula esto de modo general, hay que decir que los parentescos genéticos que existan pueden ponerse de manifiesto en reacciones serológicas idénticas o dominantes, pero que no suele ser justa la proposición recíproca que deduce de un parentesco serológico la comunidad de historia de desarrollo. De la reacción de WEIL-FELIX no puede deducirse, sin más, que las estirpes X de los bacilos *Proteus* sean variantes de las rickettsias del tifus exantemático [consúltase R. DOERR (1948, página 145)]; ejemplo especialmente instructivo, porque la especificidad de los objetos que se comparan está determinada también por polisacáridos. Por otra parte, los antígenos del mismo organismo muestran en ocasiones diferencias de especificidad absolutas (albúmina y globulina del suero sanguíneo de la misma especie de mamífero).

La cuestión inmediata de si no existirán también otras especies animales capaces de formar sueros anti-SIGMA que aglutinen los hematies humanos del mismo modo que lo hacen los sueros anti-SIGMA de cabra, no se ha investigado a fondo, en opinión nuestra. M. v. EISLER (1930) comunicó solamente que el suero de conejos inmunizados con el *Shigella dysenteriae* no reacciona con los hematies humanos. No se puso en claro a qué se debía esta diferencia de comportamiento. EISLER apunta únicamente que los sueros de cabra no contienen anticuerpos de FORSSMAN, lo que es comprensible porque el antígeno F puede descubrirse en gran cantidad en los hematies de esta especie animal; los antisueros de conejo, por el contrario, por su contenido de anticuerpos F pueden lisar los hematies de carnero, porque el conejo, por ser una especie exenta de antígeno F, responde ante el antígeno F del *S. dysenteriae* con formación del anticuerpo heterogénico. Ahora bien, así no se responde satisfactoriamente, ni se precisa la relación con la existencia o ausencia de aglutininas para los hematies humanos. Se conoce, sin embargo, una analogía interesante. Los antisueros obtenidos por la inmunización de caballos con neumococos del tipo XIV aglutinan los hematies humanos de los cuatro grupos principales, dando precipitados específicos, por una parte, con el polisacárido del tipo XIV, y, por otra, con la sustancia A, obtenida de peptona comercial [M. FINLAND y E. CURNEN (1938), P. B. BEESON y GOEBEL (1939)]; pero si se inmunizan conejos con el mismo tipo de neumococo se obtiene un antisuero que flocula energicamente con el polisacárido bacteriano correspondiente, pero que, sin embargo, no aglutina los hematies humanos ni precipita la sustancia A [BEESON y GOEBEL (1939)]. También en este caso se observa una

diferencia sorprendente entre una especie F-positiva (caballo) y una negativa (conejo), y los neumococos pertenecen también a las bacterias capaces de originar anticuerpos heterogénicos (de FORSSMAN).

Las diferencias específicas de los isoantígenos de los hematíes sólo han podido apreciarse, como se ha dicho, por una reacción serológica, más precisamente por aglutinación (aplicando la adsorción selectiva). Ahora bien, el que los eritrocitos se aglutinen por un suero determinado y hasta qué grado se mantenga el resultado positivo al diluir el antisuero no sólo depende del contenido de anticuerpos en el suero y de la adaptación más o menos estricta del anticuerpo con respecto a la sustancia aglutinable de los hematíes, sino también de la participación de lipoides, tanto del antisuero como de la superficie celular, y además del modo de estar distribuida la sustancia aglutinable en el cuerpo del hematíe, particularmente de la proporción de ella contenida en la superficie, factor cuya importancia HIRSZFELD ha destacado y puesto de manifiesto por dibujos esquemáticos [véase HIRSZFELD (1934, pág. 97)]. Según esto, de la determinación del título de aglutinación de un suero de cabra anti-SIGMA no puede deducirse ninguna conclusión segura con respecto a la cantidad de sustancia O contenida en las diversas variantes de los hematíes del grupo A, incluso prescindiendo de que tales sueros no se obtienen por la inmunización con sustancia O purificada o con hematíes humanos del grupo O, sino por tratamiento con bacterias que contienen polisacáridos. Según un dato de P. DAHR (1947, pág. 847), G. HOLL y H. SCHMIDT, en 1945, consiguieron obtener la sustancia O pura en forma de hapteno; debe intentarse—como señala DAHR—transformar este hapteno en un antígeno completo y preparar con su ayuda sueros inmunes anti-O de título elevado. No hemos tenido noticia de que se hayan efectuado estos trabajos. Es posible que pudiera aclarar el estado real de las cosas quizá en un sentido inesperado.

En los últimos tiempos, W. T. J. MORGAN y W. M. WATKINS (1948) han propuesto una modificación de la teoría de HIRSZFELD, basada en la diferenciación entre una sustancia H y el factor sanguíneo O, fundado en la acción de un gene especial (véase pág. 90). MORGAN y WATKINS consideran inadmisibles la concepción de HIRSZFELD, porque HIRSZFELD determina el contenido relativo en los hematíes del factor sanguíneo O condicionado por un genotipo, por la medida de su aglutinabilidad por un suero inmune de cabra anti-SIGMA y tal antisuero no contiene nada de anti-O, sino sólo anti-H. Pero E. WITEBSKY y N. C. KLENSHOJ (1941) han observado que una sustancia obtenida del estómago de dos individuos del grupo AB

no sólo poseía las propiedades de A y de B, sino también de O. Los autores citados admiten la posibilidad de una suerte de sustancia básica que constituya la masa principal de los factores de los grupos sanguíneos; a esta sustancia fundamental, designada como O, probablemente de modo incorrecto, podrían asociarse o faltar las propiedades A o B como grupos específicos. Este pensamiento armoniza con los resultados de las investigaciones de MORGAN y WATKINS, y recibió un desarrollo posterior en el sentido de que los genes para A, B y O son debidos a mutaciones de un gene básico primario, responsable de la formación de H. Entre las formas no mutadas de H, factor que juega el papel de una fase previa (precursor) y las formas puras de genes, A, B y O existirían (de modo análogo a como se admite en la teoría de HIRSZFELD) una serie de formas de transición con un contenido diverso de A y H, B y H, O y H; los productos finales serían $A_e B_e$ y O_e , carentes por completo de H. Según la regla de la presencia constante de las isoaglutininas compatibles, los sueros de los hombres en cuyos hematíes falte H contienen anti-H. Efectivamente, estos antisueros se han encontrado en una mujer del genotipo A O; los hematíes de esta persona no reaccionaban con el suero anti-H, pero se aglutinaron enérgicamente por un suero anti-O auténtico. Según la teoría, sólo pueden observarse anti-H en el suero de aquellos individuos cuyos dos genes estuvieran mutados por completo; es decir, en las raras combinaciones $A_e A_e$, $B_e B_e$, $O_e O_e$, $A_e O_e$, $A_e B_e$. Simultáneamente también es comprensible que el anticuerpo anti-H, tal como existe en el suero normal de bovino, en el suero anti-SIGMA de cabra y en muchos sueros humanos, pueda actuar aglutinando la gran mayoría de los hematíes con independencia de sí, en cuanto al genotipo, son homocigotes o heterocigotes. Según la opinión de que todas las mutaciones proceden de H, todos los hematíes O y todos los heterocigotes A O y B O que contienen O y, por tanto, son aglutinables por los sueros anti-O, no deberían reaccionar con $A_1 B$, $A_1 A_1$ y $B B$, lo que fué confirmado por BOORMAN y colaboradores y por MORGAN y WATKINS. Además, con las relaciones postuladas por la teoría de HIRSZFELD entre la sustancia H y la sustancia O coinciden las experiencias acerca del efecto neutralizador de la sustancia H, de procedencia animal o humana, sobre las dos especies de suero anti-O. Todos los preparados obtenidos a partir de estómago de cerdo, de quistes ováricos y de ciertas salivas, inhiben el suero anti-H; en cambio no inhiben, o lo hacen débilmente y por excepción, la aglutinación de hematíes O por el suero anti-O humano. Finalmente, MORGAN y WATKINS aprecian también que el

suero anti-O de hombre reacciona casi tan enérgicamente con el factor sanguíneo A_2 como con el factor O, de acuerdo con la opinión de A. S. WIENER (1944), de que el suero anti-O reacciona con los factores de los hematíes determinados por los genes O y A_2 .

Para representar la modificación de la teoría de HIRSZFELD propuesta por MORGAN y WATKINS en el esquema representado en la figura 6 deben considerarse, en lugar de dos, tres direcciones de mutación, que además deben salir no de O, sino de H y dirigirse a través de varias fases intermedias a los puntos finales A_c , B_c y O_c . MORGAN y WATKINS no pretenden que su modificación consiga explicar de modo satisfactorio todos los hechos conocidos; pero, en su opinión, hace comprensibles las reacciones de todas las formas de hematíes y de las secreciones serológicamente activas con los dos tipos de sueros anti-O.

Pero frente a esta modificación pueden levantarse casi todas las objeciones aducidas contra la teoría inicial de HIRSZFELD. Incluso puede hacerse otra más difícil de contestar. MORGAN y WATKINS opinan que los genes para A, B y O se forman por mutaciones a partir de un gene basal para H, y sitúan por tanto este gene para H, puramente hipotético, en el mismo plano—desde el punto de vista de la teoría de la herencia—que los genes de los grupos sanguíneos. Sin embargo, no ha podido probarse e incluso no parece probable que el gene para H, caso de que exista en forma de un factor de herencia unitario, esté localizado en el cromosoma, como es necesario admitir para los genes A, B y O dado su modo de ser heredados. La sustancia H existe en el organismo humano y animal y en las bacterias como heterogenético, como señala incluso la elección del símbolo H, y tales antígenos heterogenéticos sin duda no se heredan del mismo modo que los factores de los grupos sanguíneos; no son específicos de especie, pero, como enseña el paradigma del antígeno de FORSSMAN, están ligados a la especie y ofrecen un punto de partida para admitir que la formación de tales sustancias no depende del genoma, sino del plasmon [consúltase entre otros autores a H. ROSS (1946)]. En todo caso resulta evidente que la modificación de la teoría de HIRSZFELD tiene un fundamento muy poco seguro.

Esta modificación, cuando se encontraba aún, por decirlo así, en estado naciente, experimentó una nueva conformación que, por carecer del original, daremos según los datos resumidos de MORGAN y WATKINS. K. BOORMAN, B. DODD y B. E. GILBEY (1948) consideran también a H como el punto de partida para la formación de A, B y O; pero en lugar de tres sólo admiten dos series de mutaciones,

a saber, H-O, y H-B. En la serie de mutaciones primeramente nombrada se transforma uno de los dos genes OO, copulados entre sí, a consecuencia de una mutación en AO, dando lugar así al complejo A₂; el otro gene existente en AO puede a su vez mutarse y formar AA₁, que corresponde al antígeno A₁, y finalmente debe admitirse la forma terminal A_c A_{1c}. Es comprensible que sobre el subgrupo A₂ deben actuar dos anticuerpos, a saber, el anti-A (= α) y anti-O, y sobre el subgrupo A₁ los anticuerpos anti-A (= α) y anti-A₁ (= α_1). La diferencia entre ambos genes A, que deben haberse producido por las sucesivas mutaciones de OO en AO y de AO en AA₁, tal vez deba atribuirse a relaciones estereoquímicas [compárese el esquema de las reacciones de α , α_1 y α_2 (anti-O) con A₁, A₂ y O en la figura 7 de la página 107].

Se adquiere verdaderamente la impresión de que no se trata de teorías derivadas de la observación y del análisis serológico, sino de opiniones arbitrarias que se han creado y combinado de modo que puedan adaptarse a parte de los datos experimentales.

γγ) *El origen de las isoaglutininas del sistema A-B.*—La investigación de los grupos sanguíneos se sigue efectuando prácticamente de modo exclusivo por métodos serológicos, es decir, mediante reacciones antígeno-anticuerpo. Los dos componentes de la reacción constituyen por ello un objeto único de investigación, hecho que debe, naturalmente, tenerse en cuenta en toda exposición de los problemas pertinentes. Esta observación vale también para el problema principal que aquí se plantea, a saber, si las isoaglutininas se producen de modo espontáneo o a consecuencia de estímulos inmunizadores; apenas puede comprenderse una discusión acerca de estas disyuntivas sin apoyarse íntimamente sobre los resultados experimentales y las hipótesis que se refieren a los isohemaglutinógenos. Como hemos cumplido esta condición previa en las consideraciones que acaban de exponerse, podemos pasar a ocuparnos acerca de los *modos de originarse las isohemaglutininas*.

Hay que señalar que se ha defendido cada una de las siguientes combinaciones teóricamente posibles:

1. La producción por *autoinmunización* [F. SCHIFF y L. ADELBERGER (véase pág. 85)].
2. La producción debida a *determinados factores hereditarios* (genes) localizados en los cromosomas (FURUHATA). Esta hipótesis atribuye la carencia de aglutininas incompatibles a que no pueden formarse como consecuencia de la dominancia de los genes para las correspondientes sustancias específicas de grupo; A es dominante

con respecto a α , B con respecto a β . Con todo, simultáneamente, debe también explicarse por qué coexisten siempre con las aglutininas los antígenos compatibles; lo que se consigue teóricamente por la hipótesis de que la formación de los fenotipos se apoya en la transmisión de parejas indivisibles de genes consistentes en el gene para la sustancia específica de grupo y en el gene para la aglutinina compatible, es decir, que corresponden a las fórmulas $A\beta$ y $B\alpha$. Pero como en el grupo $O\alpha\beta$ aparecen constantemente ambas aglutininas, es necesario admitir la existencia de una tercera copulación de genes que no consta de un gene para un aglutinógeno y un gene para la aglutinina compatible, sino de los genes para ambas aglutininas ($\alpha + \beta$). Esto supone, naturalmente, una falla en la estructura de la hipótesis que también, por otras razones, resulta insostenible en la forma propuesta, como ya se expuso en la página 86. Por ello el autor no puede dar como sentado que, según el pensamiento fundamental de FURUHATA, la formación de las isoaglutininas, así como la de los aglutinógenos, se deba a la existencia de genes especiales, y que la idea de la copulación de los factores hereditarios para antígenos y anticuerpos (compatibles) en el mismo cromosoma sea verdaderamente la clave para el entendimiento del proceso hereditario que conduce a la formación de los genotipos.

3. *Las isoaglutininas α y β deben producirse sin excepción por todo hombre; son, por consiguiente, productos fisiológicos de la síntesis proteica que el organismo humano forma en virtud de pertenecer a una especie, del mismo modo que forma otras proteínas del plasma;* las aglutininas incompatibles no pueden descubrirse porque están adsorbidas a las sustancias específicas de grupo de los hematies (F. BERNSTEIN). Para que esta adsorción pueda producirse cuando aparezcan las aglutininas incompatibles en el plasma sanguíneo, deben preexistir las sustancias específicas de los tejidos; esto es lo que, como es sabido, sucede, ya que los aglutinógenos regularmente pueden observarse en el momento del nacimiento e incluso en el feto, mientras que las aglutininas sólo se observan en la mitad de los recién nacidos e incluso en los casos positivos se atribuye al paso trasplacentario de las aglutininas maternas a la sangre del feto [L. HIRSZFELD y H. ZBOROWSKY (1925), L. HIRSZFELD (1928), POLAYES, LEDERER y WIENER (1929), A. S. WIENER y SILVERMAN (1940)]. Ahora bien, como las isohemaglutininas *autóctonas* siempre se producen sólo después de transcurrido un tiempo considerable desde la aparición de los isoaglutinógenos, la opinión de que las aglutininas incompatibles se

producen también regularmente y son adsorbidas en estado naciente puede sostenerse como hipótesis.

Pero la formación, distanciada en el tiempo, de isoantígenos e isoanticuerpos posee aun otra significación independiente de la teoría de BERNSTEIN. Puede uno preguntarse si la sucesión temporal de una y otra formación no está determinada causalmente; es decir, que la existencia de los aglutinógenos desencadene la producción de aglutininas. No puede, naturalmente, pensarse en un estímulo inmunizatorio porque a la aparición de A o de B sigue la de los anticuerpos heterólogos β o α , respectivamente. Tal vez únicamente se trate de que el organismo en estado embrionario y en los primeros meses después del nacimiento es incapaz de producir anticuerpos, es decir, globulinas inmunes (véase págs. 50 y siguientes), y no existir, por consiguiente, ninguna conexión causal. Con respecto a esto se puede hacer notar —entre paréntesis— que tampoco de la teoría de FURUHATA ha de deducirse que A y β o B y α deban aparecer simultáneamente, porque sus predisposiciones en los genes estén, en opinión de este autor, copuladas entre sí.

La teoría de BERNSTEIN se apoya en dos hechos: en primer lugar, en que en el grupo sanguíneo O $\alpha\beta$ siempre coexisten ambas aglutininas y, en segundo lugar, en que en cualquier otro caso siempre se encuentra el antígeno compatible. Como réplica puede aducirse la existencia de *grupos sanguíneos defectivos (incompletos)* en los que faltan las aglutininas compatibles; por ejemplo, en los casos de sangre de fórmula A θ (ausencia de β) o de fórmula O α (ausencia de β). Se entiende que estos descubrimientos no se refieren a sangres de niños recién nacidos, que regularmente son defectivas (véase antes), sino de personas adultas en las que constituyen casos sumamente raros [K. LANDSTEINER (1928, pág. 899), O. THOMSEN (1928), A. S. WIENER (1945, pág. 26)], en los que cabe aún preguntarse si la técnica utilizada en la investigación era impecable, especialmente cuando la atención del observador se dirige a aglutininas que actúan muy débilmente.

Sin embargo, en los animales son frecuentes los grupos sanguíneos "defectivos". En las ovejas pueden distinguirse tres grupos sanguíneos que se designan como R θ , O anti-R y O θ , aunque también se designan como A θ , O α y O θ , a causa del parentesco entre R y el A humano; los grupos R θ y O θ resultan ser defectivos, ya que la aglutinina compatible anti-O no suele descubrirse y falta el anti-R que existe en la combinación O anti-R [T. ANDERSEN (1936), B. KACZROWSKI (1928)]. También en los cerdos se observan circunstancias análogas [Z. SZYMANOWSKY, St. STETKIEWICZ y B. WACHLER (1926),

O. HARDT (1937), A. KAEMPFER (1932)]. En los caballos, KAEMPFER (1935) pudo establecer la existencia de seis pares de aglutinógenos y de aglutininas: A α , B β , C γ , D δ , E ϵ y F ϕ , de los cuales sólo los dos primeros obedecen a las leyes de los grupos sanguíneos clásicos del hombre establecidos por K. LANDSTEINER (1901); las otras aglutininas (γ , δ , ϵ , ϕ) sólo se descubren en raros caballos, en los cuales falta el aglutinógeno correspondiente.

4. La formación de las isoaglutininas, como la de otros anticuerpos naturales, puede también atribuirse a una *inmunización criptogénica exógena*. Por ejemplo, DUPONT (1934) afirma que el hombre se inmuniza *per os* por alimentos y posiblemente por bacterias que contienen los antígenos A y B. A. S. WIENER (1945, pág. 195) sé aparta de esta hipótesis, en primer lugar, porque las isoaglutininas se descubren en poblaciones alimentadas de modo enteramente distinto; en segundo lugar, porque las aglutininas anti-A se observan regularmente en el suero de determinadas especies de monos inferiores (*Macacus rhesus*), y las aglutininas anti-B, en el de otras especies de monos (*Cercopithecus nictitans*); en tercer lugar, porque las sustancias A y B que proceden de productos no humanos difieren ordinariamente de los factores A y B de los grupos humanos; en cuarto lugar, porque el título de las isoaglutininas en el suero del mismo individuo se mantiene a la misma altura, mientras que los títulos de los sueros de distintas personas pueden diferir entre sí considerablemente, y en quinto lugar, porque, según los datos de E. BÜHLER (1935), los mellizos monovitelinos suelen poseer, con más frecuencia que los bivitelinos, el mismo título de aglutininas, hecho que ciertamente no han podido comprobar F. OTTENSOOSER y TOBLER (1937).

K. LANDSTEINER (1945, pág. 130) no considera necesario dar una réplica tan extensa, y considera la formación de las isoaglutininas por inmunización *per os* como una especulación insostenible (*suggestion entirely unsupported*). LANDSTEINER considera que el hecho de que las isoaglutininas del suero humano siempre estén en una relación regular con los isoaglutinógenos, que indudablemente se heredan, constituye una demostración directa de que la formación de estos anticuerpos está también condicionada genéticamente, lo que tampoco pierde fuerza si se quisiera admitir la hipótesis de la autoinmunización. Efectivamente cabe opinar, con una probabilidad próxima a la certeza, que las aglutininas α y β se forman por causas fisiológicas, es decir, a consecuencia de determinadas predisposiciones hereditarias. Pero el mecanismo del proceso de la herencia no ha podido hasta ahora establecerse de un modo exento de objeciones, ni tampoco la

causa de las relaciones regulares con los isoaglutinógenos con que siempre coexisten. La inseguridad se refleja en las diversas hipótesis de las cuales ninguna posee generalidad [consúltese V. FRIEDENREICH (1931), A. S. WIENER (1945, págs. 194 y siguientes)], y en todas resulta manifiesto que los elementos hipotéticos han debido desplazarse o combinarse hasta conseguir una coincidencia admisible con las observaciones conocidas. A ello hay que añadir la existencia de *isoaglutininas irregulares* [K. LANDSTEINER y PH. LEVINE (1926, 1929), O. THOMSEN (1928)].

88) *Las variantes α_1 y α_2 de la aglutinina- α .*—En parte, en las isoaglutininas irregulares se trata de variantes de la α -aglutinina que reaccionan con los hematíes A_1 y A_2 , es decir, con los hematíes de los subgrupos A_1B y A_2B , por lo que se designan como α_1 y α_2 . Pero α_2 reacciona con los hematíes del grupo sanguíneo O más intensamente que con los del A_2 ; por ello ha sido considerada por O. THOMSEN como una aglutinina dirigida directamente contra la sustancia O, es decir, como anti-O [O. THOMSEN (1932)]. En el esquema que sigue se dan las relaciones entre las variantes α y los hematíes A_1 , A_2 y O; la intensidad de la reacción se señala por la fuerza con que se marcan los trazos de unión.

Según LANDSTEINER y H. LEVINE (1929), existe una relación recíproca entre las sustancias de los grupos sanguíneos y las variantes α : la presencia de A_1 en las células sanguíneas (subgrupos A_1 y A_1B) lleva aparejada la existencia de α_2 en el suero, y la existencia de A_2 la de α_1 ; ahora bien, y este es el punto notable, estas asociaciones no son forzosas, sino que más bien α_1 y α_2 sólo se encuentran excepcionalmente. También es sorprendente que A_2 y α_1 deban existir juntas, si bien α_1 , aunque sólo débilmente, reacciona con A_2 , por lo que, aunque en grado secundario, debieran ser incompatibles.

Las variantes α_1 y α_2 pertenecen a las denominadas *aglutininas frías*, es decir, sólo aglutinan a temperatura baja; la máxima temperatura a que los hematíes se precipitan y agrupan depende, según K. KETTEL (1930), de la intensidad de la acción del suero, siendo tanto más alta cuanto más elevado el título. La aglutinina α regular actúa a todas las temperaturas entre 0° y 37° , pero contiene, como FRIEDENREICH (1931 a) ha podido demostrar, componentes fríos; si se absorbe un suero anti-A a 37° por hematíes A, deja de aglutinar a esta tem-

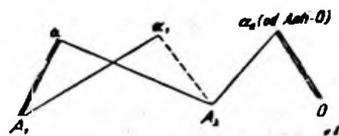


Fig. 7. Reacciones de α_1 , α_2 y α , con A_1 , A_2 y O (de A. S. WIENER, 1945, pág. 204; compuesto según V. FRIEDENREICH).

peratura, pero no, en cambio, a temperaturas más bajas, y tanto más fuertemente, es decir, a diluciones tanto más altas cuanto más baja sea la temperatura a que se efectúe la reacción; por ejemplo, si a 20° precipita a diluciones 1:16, a 0° lo hará a 1:64. Las mismas observaciones efectuó O. THOMSEN (1932 a) y, ya en 1923, W. BIALOSUKNIA y L. HIRSZFELD habían conseguido un resultado análogo con las heteroaglutininas para hematíes de caballo normales del suero de conejo. V. FRIEDENREICH (1931 a) de este fraccionamiento saca la conclusión de "*que lo que designamos como 'una isoaglutinina' no es una sustancia única homogénea, sino una suma de componentes que difieren en especificidad, avidéz y posibilidad de ser influidos por la temperatura, aunque posean la propiedad común de reaccionar con los receptores A o B*". FRIEDENREICH añade que el fenómeno pudiera también explicarse porque la fijación de la aglutinina fuera incompleta a temperatura alta, quedando un resto que puede ponerse en acción a temperatura baja más favorable para la reacción. Pero esta explicación debe rechazarse por dos razones. En primer lugar, como pudo señalar FRIEDENREICH, por la absorción a diferentes temperaturas se fijan distintas cantidades de aglutinina; si, por ejemplo, por la absorción a 37° se reduce a un sexto el título del suero, por las absorciones a 20° ó a 3° no se consigue, de ningún modo, una reducción del título tan fuerte (por ejemplo a 3° sólo a la mitad). Y, en segundo lugar, los anticuerpos ligados a 37° y a 3° pueden volverse a separar por calefacción de los hematíes a 53°, obteniéndose dos fracciones de aglutinina que, aunque posean a 0° el mismo título, difieren a temperaturas más altas, ya que la combinada en frío y luego separada no aglutina o sólo lo hace débilmente a temperaturas altas (13° a 37°), mientras que la fracción combinada a 37° (del mismo modo que la que se fijó a 21°) continúa siendo activa en caliente después de desdoblada.

Hay que decir únicamente que el poder demostrativo de los experimentos de FRIEDENREICH resulta disminuido porque las isoaglutininas, en general, y en particular las utilizadas en los experimentos de este autor, poseen un título bajo que impide apreciar muy exactamente las gradaciones de intensidad de la reacción, incluso observadas por un investigador experto; lo que juega un gran papel al intentar repetir los resultados. También se aplica a este caso la afirmación de K. LANDSTEINER (1945, pág. 129), de que los métodos ordinarios para valorar aglutininas por la determinación de la más alta dilución del suero, que continúa siendo activa, no puede ser muy exacta (*not very accurate*). Si se considera, sin embargo, como demostrado que las isoaglutininas están compuestas de "una suma de componentes", el problema de su formación adquiere un carácter más complejo que si se tratara de una única globulina especial.

β) *Las isoaglutininas del sistema M-N.*

La existencia de relaciones recíprocas, obligadas, entre los isoaglutinógenos y las isoaglutininas sólo tienen validez, en el hombre, entre los grupos sanguíneos clásicos y sus subclases, pero falta, en circunstancias enteramente análogas, entre los factores sanguíneos M y N. Todos los hombres poseen estas sustancias, cuya herencia está determinada por dos genes alelos M y N; sin embargo, sólo son posibles tres genotipos MM, NN y MN, a los que corresponden los fenotipos M, N y MN. Si entre estos grupos se dieran las mismas relaciones que entre los grupos sanguíneos clásicos, en el suero M debería existir una aglutinina anti-N, en el suero de N una aglutinina anti-M y faltar ambas aglutininas en el suero MN. Pero, como se deduce de un gran número de investigaciones, la aglutinina anti-N hasta ahora nunca se ha observado en el hombre (1), y la anti-M sólo en casos muy raros [E. WOLFF y B. JONSSON (1933), W. FRIEDENREICH (1937), T. MOUREAU y J. LAMBERT (1939), DAVIDSOHN y SCHIRMER (1941), J. L. H. PATERSON, R. R. RACE y G. L. TAYLOR (1942)]. Por consiguiente, en este caso la presencia en los hematíes de uno de los dos factores específicos de grupo no determina de ningún modo la existencia de la aglutinina compatible en el suero, sino que una de las aglutininas no se encuentra nunca y la otra sólo excepcionalmente. Por ello parece probable, hasta un cierto grado, que en los grupos sanguíneos clásicos, la aparición de las aglutininas compatibles, α , β o $\alpha + \beta$ tampoco se deba al contenido en los hematíes de B, de A, o a la falta de B y A, respectivamente, sino que se deba a un mecanismo independiente.

Hasta la fecha no puede responderse con seguridad por qué los grupos sanguíneos clásicos difieren tan manifiestamente de los factores M y N en lo que respecta al contenido de aglutininas en el suero. Sólo indicaremos una circunstancia a la que tal vez quepa atribuir alguna significación. A y B son antígenos energéticos para todo hombre en cuyo organismo falten. Los hombres del grupo sanguíneo O reaccionan frente a la administración parenteral de las sustancias A y B con una energética estimulación de la formación de aglutininas para las células A y B; si la mezcla se administra a los individuos del gru-

(1) Posteriormente ha llegado una excepción al conocimiento del autor. L. de KROMME y L. A. M. van der SPECK (1947 a) pudieron descubrir en el suero de una mujer, aglutinina anti-N; con respecto a esto, consúltese la página 238.

po A, se exalta la producción de aglutininas para las células B, mientras que en las personas del grupo B provoca el aumento de aglutininas para las células A. [E. F. AUBERT, K. E. BOORMAN y B. E. DONN (1942), E. WITEBSKY, KLENDSHOJ y MCNEIL (1944)]. Después de transfusiones de sangre incompatible se ha observado también, repetidamente, la producción de aglutininas por isoimmunización [L. BLANCALANA y ST. TENEFF (1930), ST. HOOKER (1941), A. S. WIENER (1941, 1945)]. La transfusión de hematíes M, por el contrario, no provoca en general en el hombre la formación de anti-M (1) [J. CLAUSEN (1934)], ni las transfusiones de hematíes N, como se desprende de la literatura difícil de revisar concerniente a este punto, casi nunca ocasiona la producción de anti-N. *La falta de anti-N y la extraordinaria rareza de anti-M en el suero humano en circunstancias naturales, pudiera deberse a que el organismo del hombre no es capaz de sintetizar estas aglutininas o sólo puede hacerlo excepcionalmente.*

En el comportamiento de diferentes especies animales frente a la inmunización con hematíes M y N se encuentran algunos puntos de apoyo para esta interpretación. Los datos que siguen se refieren a conejos [K. LANDSTEINER y LEVINE (1927, 1928)], a cabras [K. LANDSTEINER, citado por A. S. WIENER (1945, pág. 220)], a gatos [A. S. WIENER (1945, pág. 220)] y a ratas [S. OLBRICH (1937)]. Se observa inmediatamente que la capacidad de formar anti-M y anti-N, deducida de las medidas efectuadas en los sueros inmunes producidos, es muy diversa. Los conejos son los únicos animales que pueden suministrar sueros testigo utilizables para fines forenses; el suero de gatos y ratas sólo aglutina a concentraciones altas. El suero de conejos, por lo demás, ofrece diferencias individuales y reacciona de modo desigual con respecto a M y N, lo que ofrece especial importancia en la cuestión planteada. Casi todos los conejos forman aglutininas anti-N, pero sólo en dos tercios de los animales el título es suficientemente elevado para ser utilizado en la práctica de la medicina legal; a M no responden sino aproximadamente el 75 por 100 de los conejos; sin embargo, entre los que reaccionan positivamente se encuentran con alguna frecuencia ejemplares que suministran sueros de un título 1:128 y más alto [K. M. WHEELER, P. B. SAWIN y C. A. STUART (1939)]. De índole particular y dignos de investigaciones ulteriores son los descubrimientos efectuados en ratas por S. OLBRICH (1937). Según este autor, la inmunización de ratas con hematíes N O humanos rinden antisueros que después de una adsorción a hematíes M, efectuada inmediatamente o después de pasado algún tiempo, resultan manifiestamente con especificidad N. Por el contrario, por la inmunización con sangre M O no se obtiene ninguna aglutinina específica para M, aunque se adsorba a

(1) Puede estudiarse en A. S. WIENER y S. FORER (1941) y A. S. WIENER (1942), dos casos de transfusión con hematíes M que originaron aglutininas anti-M.

hematías N O o N A; pero, sin embargo, si tales antisueros se adsorben a hematías M (según los datos de OLBRICH, que deben ser comprobados), se les descubre una especificidad N, aunque el producto inyectado a los animales no contenía N. En las ratas, por consiguiente, N actúa inmunizando, pero no M, mientras que en el hombre M actúa como antígeno débil y N prácticamente como no antígeno.

γ) *Las isoaglutininas en el sistema P-Q.*

Entre las isoaglutininas irregulares debe contarse también la aglutinina que, inicialmente, K. LANDSTEINER y PH. LEVINE (1929) designaron como extraaglutinina I; actúa sobre los hematías que contienen el factor P, descubierto por estos autores en 1928, posee un título bajo y puede descubrirse en el suero de individuos de los cuatro grupos sanguíneos, siempre que sus hematías carezcan de P; sin embargo, rara vez se encuentra esta aglutinina [K. LANDSTEINER y PH. LEVINE, CLARA NIGG (1930), A. S. WIENER (1945, pág. 257)]. El factor P es hereditario, y la herencia se regula por un par de genes P y p, de los cuales P (producción del factor) domina sobre p (ausencia del factor). Del estudio de gran número de parejas de padres y de sus hijos se deduce que las observaciones corresponden a esta teoría y que los hijos ilegítimos pueden deducirse con seguridad porque el ayuntamiento de individuos exentos de P nunca da lugar a hijos con P; también en las combinaciones $P + \times P +$ y $P + \times P -$ las proporciones entre los $P +$ y los $P -$ corresponden a los valores calculados [K. LANDSTEINER y PH. LEVINE (1930, 1931), PETER DAHR (1929 b), P. DAHR, OFFE y WEBER (1940), P. DAHR y ZEHNER (1941)]. Una nueva prueba convincente de la transmisión por herencia del factor P fué aducida por P. DAHR, OFFE y WEBER (1940) al investigar 134 parejas de gemelos monovitelinos y 188 de bivitelinos: los gemelos del primer tipo siempre coincidían en lo que respecta a la presencia o ausencia del factor P, mientras que de las 188 parejas de bivitelinos, 43 daban resultados discordantes.

En lo que respecta a la aglutinina anti-P natural, su falta en el suero de los individuos P positivos se explica desde el punto de vista de la incompatibilidad; pero como tampoco se observa en el suero de los hombres P negativos, este sistema no obedece de modo estricto a la regla de la incompatibilidad. P. DAHR (1939 a) observa aquí una analogía con lo raro de la presencia de anti-M y con la carencia de anti-N en el suero humano. Con ello concuerda que, al parecer, rara vez se observe elevación de las isoaglutininas anti-P como con-

secuencia de transfusiones repetidas de sangre con contenido de P a individuos exentos de P [A. S. WIENER y PETERS (1940), A. S. WIENER (1942)]. Ahora bien, puede deberse a una predisposición hereditaria la capacidad que algunos hombres poseen de formar anti-P [CLARA NIGG (1940)]. NIGG, por ejemplo, estudió una familia (padre, madre y tres hijos); el padre y dos hijos pertenecen al grupo sanguíneo O, la madre y el tercer hijo al grupo B y el anti-P sólo se observa en el suero de la madre y del tercer hijo. Como se explica por la rareza de anti-P, no se conoce ningún otro caso de este tipo, lo que limita la fuerza demostrativa de la interesante observación de C. NIGG. Pero aun en el caso de que, efectivamente, la presencia de anti-P debiera considerarse como la manifestación fenotípica de un gene dominante especial, no se observa que exista ninguna relación entre este gene y el gene para el factor sanguíneo P, que es su antagonista serológico, conclusión que también hubo que considerar como posible al estudiar las relaciones entre las sustancias específicas de grupo y las isoaglutininas en el marco de los cuatro grupos sanguíneos clásicos (véase con respecto a esto pág. 109).

La independencia entre el anti-P y el factor P existe también en los sueros normales animales en que pueda demostrarse la aglutinina [K. LANDSTEINER y PH. LEVINE (1931), P. DAHR (1939)]. Cerdos y caballos son los animales cuyos sueros contienen con mayor frecuencia, no constantemente, anti-P. El título anti-P del suero normal de cerdo alcanza en ocasiones valores muy altos, de modo que con auxilio de tales sueros pueden distinguirse fácilmente entre sí los hombres P negativos y P positivos; P. DAHR y colaboradores (véanse las publicaciones citadas en la página 111) utilizan con éxito esta posibilidad para investigar la herencia en el hombre del factor P. No parece investigado si la aparición de anti-P en sueros normales *animales* está determinada por herencia; tampoco se ha dado respuesta a la cuestión de si en el organismo de los caballos o cerdos en cuyo suero *no* exista anti-P puede descubrirse el factor P.

En este caso, como en todos aquellos en que sueros normales animales aglutinen hematíes humanos de un determinado grupo, se trata de *heterohemaglutininas*, si se considera la procedencia del suero, y de *isohemaglutininas*, si se considera su adaptación a sustancias específicas de determinados grupos de hematíes humanos. Aunque esta doble formulación pueda parecer a primera vista una mera manipulación carente de alcance con expresiones especializadas serológicas, oculta en realidad los conflictos con que se lucha para fundamentar el origen de las isoaglutininas. La afirmación de que la predisposición

hereditaria resulta decisiva no supone ninguna ayuda para resolver este conflicto; si esto ya podía apreciarse en el campo de los cuatro grupos sanguíneos clásicos, donde ofrecía un valioso punto de apoyo la existencia alternada de determinados isoaglutinógenos y las correspondientes aglutininas, con mucha más fuerza se impone en los sistemas donde no existen constelaciones análogas o al menos no pueden demostrarse con seguridad.

Por ejemplo, al factor P se contraponen un factor Q. Ambos, según los cálculos, no parecen independientes entre sí, sino estar en relación recíproca. Tanto P como Q se heredan, al parecer, como simples genes dominantes. Con auxilio de sueros normales de cerdo absorbidos del modo correspondiente, se pueden distinguir entre sí cuatro grupos de individuos, a saber:

$$\begin{array}{l} P + Q + \\ P + Q - \\ P - Q + \\ P - Q - \end{array}$$

Coincidiendo con S. IMAMURA (1935) y A. S. WIENER, DAHR, OFFER y WEBER (1940) afirman que P y Q se presentan juntos con relativa frecuencia (P + Q +), también es frecuente que falten simultáneamente ambos (P - Q -), y en cambio, de 83 casos sólo en 9 existía un factor y faltaba el otro (P + Q - o P - Q +). Por consiguiente, se obtiene un esquema semejante al existente entre los grupos sanguíneos AB, A, B y O. Ahora bien, mientras que en este sistema siempre se observa la presencia de las aglutininas compatibles (A B θ , A β , B α , O $\alpha \beta$), no sucede lo mismo en el esquema P Q. Entre 3.530 individuos investigados por DAHR y colaboradores, 846 (el 23,97 por 100) eran P negativos; en cambio, la aglutinina anti-P muy rara vez se encuentra en el suero humano, y al autor no ha llegado noticia de la existencia de anti-Q (1). La semejanza, subrayada por DAHR, con el sistema MN (véase pág. 111), es sólo imperfecta, ya que no existen individuos en los que falten tanto M como N (en analogía con los P - Q -). Hay que pensar ahora que todo hombre puede pertenecer a los tres sistemas A - B, M - N y P - Q y que las isoaglutininas en el sistema A - B (prescindiendo de α_1 y α_2) manifiestan una relación

(1) Con respecto a la herencia de Q véase T. FURUHATA y S. IMAMURA (1935), S. IMAMURA (1935) e IMAMURA y SUZUKI (1936); consúltese también S. WELLSCH (1938).

constante con los isoaglutinógenos, mientras que en los sistemas M—N y P—Q las aglutininas compatibles rara vez aparecen o faltan por completo; aunque en los tres sistemas la predisposición hereditaria fuera en realidad decisiva para la presencia o ausencia de las aglutininas en el suero, no se concibe cómo poner de acuerdo el comportamiento dispar de los tres sistemas. Hay que limitarse, pues, a registrar observaciones particulares renunciando de antemano a una coordinación general. Entre las observaciones que señalan el carácter hereditario de las globulinas normales hay que contar también un dato de K. LANDSTEINER y PH. LEVINE, según el cual la descendencia de conejos en cuya sangre existe la aglutinina anti-P presenta esta aglutinina en un tanto por ciento considerablemente más elevado que la de otros conejos cualquiera. Además, C. A. STUART, SAWIN, WHEELER y BATTEY (1936) descubrieron en el 39 por 100 de los conejos una aglutinina para los hematies humanos del grupo A, y en el 16 por 100, una para los del grupo B; en cuanto a las aglutininas A, específicas, la herencia debe estar condicionada, probablemente, por un gene recesivo.

En la sangre de los hombres normales el número de isoaglutinógenos específicos es mayor que el de las isoaglutininas, es decir, se conoce una serie de sustancia aglutinables que sólo se descubren por sueros inmunes o normales de origen animal que para este fin deben someterse a las absorciones correspondientes, mientras que en la sangre de los hombres en que falta la sustancia, tampoco existe la isoaglutinina (en este caso compatible). En el factor N hemos visto ya un ejemplo típico de esta clase a la que también pertenecen Q y, probablemente, el factor X, que por cierto es tan frecuente (94 por 100) que no se ha investigado la existencia de anti-X en el hombre X [P. H. ANDRESEN (1935)], el factor descubierto por K. LANDSTEINER, W. R. STRUTTON y W. M. CHASE (1934), observado rara vez y hasta ahora sólo en la sangre de personas de los grupos M y MN, y cierto número de otros aglutinógenos que aquí no se estudiarán en particular (1).

δ) *La aglutinina del factor Rh.*

Según investigaciones serológicas, el denominado antígeno Rhesus (Rh) no es único, como se admitía en un principio, sino que por lo menos existen tres variedades del mismo que se designan por diversos símbolos; en la moderna literatura, principalmente, por Rh₀, Rh' y Rh''; en la sangre del hombre pue-

(1) Consúltese S. WELLISCH (1938) y A. S. WIENER (1945, pág. 264).

den encontrarse aislados o, L_0 que es mucho más frecuente, en distintas combinaciones, $Rh_0 + Rh'$, $R_0 + R''$, o, muy rara vez, también en forma $Rh' + Rh''$ (sin Rh_0). Además se ha observado que a las tres variantes Rh se contraponen tres variantes de un antígeno emparentado "Hr"; en los hematíes que no contienen ninguno de los tres antígenos Rh pueden descubrirse las tres variantes de Hr. Como Rh y Hr se heredan según leyes determinadas, aunque no establecidas con claridad en todas sus relaciones, que rigen genes alelos especiales [según las últimas publicaciones de A. S. WIENER (1945 c), que se ocupa de este tema, deben existir ocho genes alelos], y los fenotipos están en relaciones recíprocas regulares, puede hablarse de un sistema *Rh-Hr* semejante a los que constituyen los factores A—B, M—N o P—Q. La variabilidad del factor Rh se manifiesta serológicamente en que a las tres variantes Rh_0 , Rh' y Rh'' corresponden tres anticuerpos, o antisueros, a saber, los anti- Rh_0 , anti- Rh' y anti- Rh'' , de modo que el título de este apartado, "la aglutinina del factor Rh", parece enjuiciar un estado de cosas en contradicción con los resultados de la investigación serológica que acaban de resumirse brevemente. Ahora bien, la exposición que sigue se ocupa únicamente de la existencia natural de isoaglutininas y de su oposición a la posibilidad de que se produzcan por inmunización, y esta relación es independiente de la pluralidad del factor Rh y de las correspondientes aglutininas. Los complicados detalles genéticos y serológicos, y la nomenclatura, siempre en estado de reforma crónica del sistema Rh, se estudiarán en otros volúmenes de las investigaciones inmunológicas; puede conseguirse una orientación para este terreno en la monografía de E. L. PORTER (1947).

En correspondencia con los casos en los cuales, contra lo previsto por analogía, falta la isoaglutinina compatible, parece digno de mención especial el hecho de que en el suero de los individuos Rh-negativos no se encuentre ninguna aglutinina anti-Rh normal (1); la aglutinina anti-Rh sólo se produce por inmunización, bien con un feto Rh positivo, o por transfusión de sangre que contenga Rh a una persona Rh negativa; en las páginas 110 y 111 se ha expuesto que la ausencia o la suma rareza de los anticuerpos anti-N, anti-M y anti-P en el suero humano normal debe atribuirse a que el organismo humano no es capaz de formar estas isoaglutininas, ya que la inmunización con los antígenos correspondientes no da lugar, sino rarísima vez, a la producción de anticuerpos en el hombre. Al antígeno Rh no puede aplicarse esta explicación porque aunque el suero de los individuos Rh negativos no posee nunca anti-Rh normal, la inmunización, con relativa frecuencia, aunque no siempre, conduce a la formación de anti-Rh (consultese la tabla 7).

(1) Esta afirmación se funda en los datos de numerosos autores; P. DAHR y H. KNÜPPEL (1944), entre 1.587 investigaciones no han descubierto ningún resultado positivo.

TABLA 7

Frecuencia de la presencia de aglutininas anti-Rh en el suero de 141 madres Rh negativas cuyos hijos nacieron con eritroblastosis, según P. LEVINE, BURNHAM, KATZIN y VOGEL (1941).

<i>Tiempo transcurrido desde el último parto de un niño enfermo</i>	<i>Existen aglutininas.</i>	<i>No existen aglutininas.</i>
2 meses postpartum	33	37
2 meses a 1 año postpartum	5	15
1 año o más postpartum	2	39
Durante el siguiente embarazo	2	5
Sin fecha	0	3
TOTAL	42	99

Si la eritroblastosis, conforme a la opinión dominante, fuera debida a que la madre Rh negativa se inmuniza por el Rh del feto y los anticuerpos producidos en ella, al penetrar por vía placentaria en la sangre del feto, desencadenaran en éste una reacción patógena antígeno-anticuerpo, sorprende en esta estadística el gran número de casos (más del 50 por 100) en que la sangre de la madre, a los dos meses del nacimiento del hijo, está ya exenta de anti-R. Para explicar esta contradicción se ha admitido que las aglutininas anti-Rh tienen tendencia a fijarse espontáneamente en las células de los tejidos, de modo que la cantidad de aglutininas circulantes no ofrece una medida de la cantidad total de aglutininas que realmente existe en el cuerpo (1). Esta opinión puede aducir un caso análogo. De la sangre de un cobayo sensibilizado de modo activo, por una mínima cantidad de suero de caballo los cuerpos anafilácticos desaparecen a los 60-90 días de la preparación del animal; éste, sin embargo, continúa en estado anafiláctico, y sus órganos aislados (cuernos del útero, intestino) conservan la reactividad frente al contacto del antígeno en la prueba de SCHÜLTZ-DALE; y si se trata de una hembra, después de un año de la sensibilización continúa alumbrando crías anafilácticas, lo que sólo puede explicarse por el paso del anticuerpo (que no puede descubrirse en el suero) desde la madre al feto [R. DOERR y S. SEIDENBERG (1931)]

(1) Pero también sería posible que la aglutinina anti-Rh existente en el suero sanguíneo de la madre sensibilizada por el feto se encontrara en un estado tal que no pudiera descubrirse por aglutinación directa, sino como un anticuerpo incompleto (*low grade antibodies*) capaz de combinarse con los hematíes Rh, pero no de aglutinarlos (consúltese el capítulo "Conglutinina").

e) *Resumen de los datos acerca de la existencia de diversas isoaglutininas en el suero del hombre, en condiciones fisiológicas y después de estímulos inmunizantes.*

En la tabla 8 se reúnen algunos de los datos bien comprobados acerca de las relaciones entre las sustancias específicas de grupo del hombre y las isoaglutininas humanas correspondientes en condiciones fisiológicas e inmunizatorias, con el fin de poner de manifiesto que existen efectivamente las constelaciones posibles desde el punto de vista combinatorio. Pero se han hecho algunas observaciones seguras que caen fuera del cuadro; por ejemplo, A. S. WIENER (1942) ha comunicado que se produjo una aglutinación vigorosa al mezclar el

TABLA 8

Relaciones de las isoaglutininas humanas más importantes con las sustancias aglutinables correspondientes, en condiciones fisiológicas y después de actuar agentes inmunizadores.

Nombre de la isoaglutinina.	Demostrable en el suero normal del hombre en ausencia del antígeno.			Posibilidad de la producción inmunizatoria o de su exaltación en el hombre.		
	Constantemente.	Excepcionalmente.	Nunca.	Acusada.	Excepcional.	No existe.
Anti-A	+			+		
Anti-B	+			+		
Anti-M		+			+	
Anti-N			+			+
Anti-P		+			+	
Anti-Rh			+	+		

suero de un donante del grupo B con los hematíes de un paciente que pertenecía también al grupo B. El suero del donante contenía una aglutinina de alto título para las células de A, y no dió con varios cientos de muestras sanguíneas de todos los grupos ninguna reacción anormal; las células sanguíneas del receptor se aglutinaron siempre únicamente con sueros A, jamás con sueros B, y el suero del receptor contenía una aglutinina anti-A típica. De ello deduce WIENER que los hematíes del receptor debían contener un aglutinógeno excepcional y el suero del donante la aglutinina correspondiente extraordinariamente rara. La observación, indudablemente, era correcta y la formulación del resultado de acuerdo con la terminología serológica.

Pero aparecen dificultades si se intenta incluir entre los aglutinógenos sustancias—en el sentido de la química orgánica—autónomas, independientes entre sí, que existen en los hematíes. En el caso descrito por WIENER, los hematíes del receptor, además de B y del antígeno excepcional, deberían contener también M ó N, o incluso M y N, y, muy probablemente, también el factor Rh; pudieran coexistir, además, P ó Q, o ambos combinados, y como los hematíes humanos se diferenciarán de los de otros mamíferos, habría que añadir un aglutinógeno específico de especie presente en todos los hematíes humanos como factor de mayor campo de reacción. Todos estos aglutinógenos de los hematíes, teniendo en cuenta el volumen de estas células y el mecanismo de la reacción de aglutinación, deben estar localizados en la superficie de los eritrocitos o poder alcanzarla. Ahora puede afirmarse con certeza que en las partículas antigénicas de mayor tamaño (bacterias, partículas de extracto de corazón de vaca o corpúsculos de la sangre de carnero) basta que una parte de su superficie se ponga en contacto con las moléculas del anticuerpo para que se produzca una floculación visible [F. S. JONES (1928), F. S. JONES y R. B. LITTLE (1933), H. EAGLE (1935 a, b), M. HEIDELBERGER (1942), HEIDELBERGER y E. A. KABAT (1934, 1941), A. PIJPER (1938), D. PRESSMAN, CAMPBELL y L. PAULING (1942)]; pero más que las relaciones estereas entre antígeno y anticuerpo, lo que verdaderamente repugna a nuestra concepción de la organización de una célula es representarnos la superficie celular como un "mosaico de antígenos".

ζ) *Causas de error en la determinación de los grupos sanguíneos y de las isoaglutininas.*

En todas las investigaciones serológicas debe tenerse siempre presente que lo que realmente puede hacerse no es sino establecer reacciones, es decir, relaciones recíprocas, entre dos componentes, de los cuales uno (el anticuerpo) es de naturaleza desconocida, y el otro (el antígeno) sólo se conoce de modo serológico, es decir, en lo que de él descubre el anticuerpo [consultese R. DOERR (1947, págs. 84 y siguiente)]. Se intenta cada vez más aislar y purificar los isoaglutinógenos mediante métodos químico-físicos. De estos esfuerzos cabe esperar ciertos progresos, pero que hasta ahora no han podido realizarse sino en determinada proporción. La naturaleza química de las sustancias investigadas no se conoce con exactitud suficiente para comprender las diferencias de especificidad, y por ello no puede apreciarse de modo preciso el grado de pureza de los isoaglutinógenos

“aislados”; sin embargo, debe uno contentarse con volver a investigar tales preparados por vía serológica. Además, mediante los procedimientos de purificación no siempre se consigue un antígeno completo, sino un hapteno, e incluso en el caso de que tal hapteno, por fijar el anticuerpo y por pruebas de inhibición, pueda ser considerado como legítimo soporte de la especificidad, indudablemente se le ha escindido de la trama natural del citoplasma en el que puede encontrarse en otra forma y combinado con otras sustancias.

Finalmente, en este lugar debe recordarse que la aparición de una aglutinación no depende exclusivamente de que en los hematíes exista un aglutinógeno y en el suero añadido la correspondiente aglutinina. Precisamente en la hemaglutinación puede resultar decisiva una circunstancia que no entra en juego en otras reacciones serológicas (precipitación, aglutinación bacteriana, reacción de toxina y antitoxina). Desde los trabajos de G. HÜBENER (1926), F. SCHIFF y W. HALBERSTAEDTER (1926), O. THOMSEN (1927), V. FRIEDENREICH (1930), se sabe que las muestras de sangre pueden hacerse *panaglutinables* a consecuencia de impurificaciones bacterianas (especies de *Corynebacterium*, ciertos vibriones), *de modo que cualquier suero humano, incluso el de la persona de la que procede la sangre, puede aglutinarlas.*

Según FRIEDENREICH, las bacterias producen un enzima que activa un aglutinógeno latente del hematíe; este aglutinógeno, denominado T, una vez activado, debe reaccionar con una aglutinina T, existente en el suero de todo humano adulto. Esta panaglutinación o aglutinación-T se debe a una reacción antígeno-anticuerpo que FRIEDENREICH intentó demostrar por distintos experimentos. Por ejemplo, los hematíes transformados vuelven a poner de manifiesto el grupo a que pertenecen cuando se les mezcla con un suero testigo del que se ha separado la aglutinina T por su absorción con células-O transformadas. Además, los cobayos sensibilizados con hematíes transformados sólo reaccionan frente a una inyección desencadenante de hematíes transformados (no de hematíes normales) (1).

Los hematíes se vuelven panaglutinables no sólo *in vitro*, sino, al parecer, también *in vivo*, como se deduce de una observación del máximo interés comunicada por Ph. LEVINE y E. M. KATZIN (1938). Un muchacho de cuatro años, perteneciente al grupo sanguíneo O, enfermó de sarampión complicado con una neumonía (neu-

(1) Si no se ha hecho hasta la fecha consideramos recomendable comprobar estos experimentos, especialmente los ensayos anafilácticos.

mococo I) y fué tratado con suero antineumocócico de caballo (tipos I y III) y con sulfanilámid. A los veinticinco días de hospitalización se le tomó una muestra de sangre, de cuya investigación resultó que pertenecía al grupo O; pero los hematíes del paciente se aglutinaban por el 15 por 100 de los sueros de todos los individuos, cualquiera que fuera el grupo sanguíneo a que pertenecieran, sin excepcionar los del grupo O, es decir, que sus hematíes eran "panaglutinables". De los sueros capaces de aglutinar los hematíes del paciente pudo eliminarse la aglutinina que participaba en la reacción por la absorción en los hematíes aglutinables. Teniendo en cuenta el carácter específico de esta reacción se investigó si el aglutinógeno irregular se había desarrollado con arreglo a bases hereditarias. No era éste el caso, ya que ni el padre ni la madre poseían hematíes dotados de las propiedades observadas en los del hijo; se trataba, pues, de una aglutinabilidad de los hematíes anormal, adquirida, en favor de la cual también hablaba el hecho de que cuatro meses después habían perdido por completo esta propiedad. Hay que señalar que en la sangre del paciente pudo observarse la existencia de neumococos del tipo I. Los hematíes, por consiguiente, habían sufrido el efecto de bacterias y derivados solubles de ellas, aunque no se tratara del tipo de gérmenes capaces de provocar la panaglutinabilidad *in vitro*. LEVINE y KATZIN estiman probable que el suero de caballo, la sulfanilamida o quizás otros medicamentos, o tal vez "productos de la enfermedad", pudieran haber alterado los hematíes de modo que resultaran sensibles para una aglutinina fisiológica muy difundida. Si los hematíes se lavan repetidamente con grandes cantidades de disolución fisiológica de NaCl, no se elimina la modificación de su reactividad, y la desaparición de la propiedad a los cuatro meses debe atribuirse a la sustitución de los hematíes transformados por hematíes normales. Como se deduce de los datos circunstanciados de la comunicación citada, la observación se estudió y formuló desde el punto de vista serológico puro; es decir, como si el comportamiento, singular en muchos aspectos, de los hematíes del paciente no pudiera deberse a nada más que a la reacción entre un aglutinógeno especial y una aglutinina especial. La justeza de esta apreciación parece dudosa considerando un fenómeno de otro tipo.

Se da, por ejemplo, también el caso de que se frustre una hemaglutinación, a pesar de darse las convenientes condiciones serológicas, debido al estado de los hematíes. Si se inmunizan conejos con órganos que contienen el antígeno de FORSSMAN, por ejemplo con riñones de cobayo, se obtienen antisueros heterogenéticos que actúan tóxicamen-

te sobre el cobayo y disgregan los hematíes de carnero; pero si se pretende *aglutinar* los hematíes de carnero con hematíes frescos, se obtiene resultado negativo, y, en cambio, positivo después de conservar varios días la suspensión de hematíes [TROU-HIA-HSÜ (1922)]. La aglutinabilidad aumenta con la duración del tiempo de conservación, como se deduce del siguiente experimento de este autor:

TABLA 9

Acción aglutinante de un suero heterogénico de conejo sobre los hematíes de carnero, conservados a temperatura ambiente de 1 a 6 días.

Dilución del suero.	Duración de la conservación.					
	1 día.	2 días.	3 días.	4 días.	5 días.	6 días.
1: 10	—	—	+	++	++++	++++
1: 20	—	—	(+)	+	++++	++++
1: 40	—	—	—	+	++++	++++
1: 80	—	—	—	—	++++	++++
1: 160	—	—	—	—	++	++++
1: 320	—	—	—	—	++	++++
Control en blanco.	—	—	—	—	—	(+)

Otros autores han hecho observaciones análogas. El profesor J. TOMCSIK (1) se convenció, en unos experimentos efectuados en colaboración con H. SCHWARZWEISS, de que las hemaglutinaciones efectuadas con hematíes frescos, es decir, con muestras de sangre tomadas recientemente o con suspensiones de hematíes preparadas sin pérdida de tiempo, dan valores considerablemente más bajos que si las determinaciones seriadas se efectúan con los mismos hematíes, pero a las veinticuatro horas de efectuada la toma de sangre. Puede considerarse demostrado que se trata de modificaciones que los hematíes sufren durante la conservación de las muestras de sangre o de las suspensiones, ya que tanto los hematíes frescos como los viejos conservan inalterada su aglutinabilidad después de lavarlos con disolución fisiológica de NaCl. Según investigaciones de TROU-HIA-HSÜ, los hematíes recientes fijan la aglutinina igual que los conservados; es decir, que cuando se aplican hematíes frescos se produce la reacción. antígeno-anticuerpo, pero se inhibe su manifestación visible. No se trata, por consiguiente, de un caso aparte [consúltese R. DOERR:

(1) Comunicación verbal.

(1947, pág. 79)], pero tiene una importancia especial porque pueden cometerse errores si no se tiene en cuenta esta alterabilidad del antígeno forme.

La aparición o la exaltación de la aglutinabilidad como consecuencia de la conservación de muestras de sangre o de suspensiones de hematíes parece presentarse, en cuanto se conoce hasta la fecha, únicamente en determinados aglutinógenos y aglutininas que causan aglutinaciones de hematíes de carnero, y quizá también dependa de la procedencia de las muestras de sangre (hematíes de carnero). Para determinar el grupo sanguíneo a que pertenece una muestra de sangre humana los especialistas expertos [véase A. S. WIENER (1945, página 20)] recomiendan explícitamente utilizar suspensiones de hematíes completamente frescos, fundándose en que la sensibilidad de los hematíes se reduce paulatinamente incluso cuando se los conserva en nevera. Hasta la fecha no puede decidirse de modo seguro a qué se debe lo contradictorio de que la conservación de los hematíes pueda dar lugar tanto a una exaltación como a una reducción de la aglutinabilidad. Pero se sabe que para determinar el grupo sanguíneo a que pertenece un individuo hay que tener en cuenta otra circunstancia de mayor importancia, a saber: *las desviaciones individuales de la aglutinabilidad de los hematíes dentro de un mismo grupo sanguíneo*. F. SCHIFF y G. HÜBENER (1926) comprobaron con sendos sueros testigo α y β la aglutinabilidad de los hematíes A y B de distintas personas y observaron diferencias muy considerables. En las reacciones de las células A con una determinada aglutinina- α los títulos varían entre 1:25 y 1:800, y en las reacciones de las células B con una misma β -aglutinina, entre 1:25 y 1:400; el valor más frecuente en ambas series se encuentra en una dilución del suero de 1:100. El número de las personas investigadas fué pequeño (93 muestras de A y 29 de B), y las muestras se habían conservado veinticuatro horas en nevera; pero la variabilidad individual de la aglutinabilidad se comprobó de modo indudable por autores posteriores. La edad del hombre influye sobre esta propiedad, ya que según investigaciones de T. KEMP (1930) la sensibilidad de los hematíes aumenta ordinariamente hasta los veinte años, de modo que un suero testigo determinado aglutina los hematíes de un niño recién nacido en una dilución de 1:100, mientras que para los hematíes de un adulto manifiesta un título de 1:500 (1). Sin embargo,

(1) El mismo KEMP, como los otros autores, designan este aumento de la aglutinabilidad hasta los veinte años como "desarrollo de los isoaglutinógenos". En esta formulación se implica la concepción de un aumento cuantitativo de los

también se observan diferencias individuales en individuos de la misma edad, por lo que está bien fundada la prescripción de utilizar, para las determinaciones de grupos sanguíneos, sueros de título elevado. En estas circunstancias resulta claro que los hematíes con las propiedades A, B, M, N, P, etc., sólo pueden considerarse como antígenos constantes en sentido cualitativo, pero en cuantitativo hay que situarlos dentro de series y su posición varía además con el tiempo.

No todas las hemaglutinaciones, incluso las que posean cierto grado de especificidad, se deben a reacciones antígeno-anticuerpo, como enseñan los efectos hemaglutinantes, que se mencionan en la pág. 44. causados por las denominadas fitaglutininas y por distintas especies de virus. Estas acciones presentan el mismo cuadro que una floculación y una aglutinación de hematíes provocadas por un anticuerpo, y también se ha observado que ciertas fitaglutininas actúan de modo distinto sobre hematíes de diversa procedencia zoológica, así como que cada especie de virus está dispuesta para actuar sobre una determinada serie de especies de hematíes aglutinables. Hasta la fecha no sabemos por qué la fagina de las lentejas aglutina los hematíes de conejo y no los de paloma, mientras que la fagina de la judía aglutina seis veces más débilmente los hematíes de carnero que los de paloma. Del mismo modo tampoco nos es conocida la causa de que, por ejemplo, el virus de la gripe precipite un gran número de hematíes nucleados y exentos de núcleo, mientras que no causan ningún efecto sobre los hematíes de vaca, cerdo, caballo y gato [véanse más datos en E. CLARK y P. P. O. NAGLER (1943); véase también R. DOERR (1947, pág. 226)]. En tanto que no puedan entenderse estas extrañas circunstancias, sin duda no está justificado designar una sustancia procedente de una semilla vegetal o de un virus como aglutinina. Este nombre se introdujo para designar el efecto floculante sobre el antígeno forme correspondiente ejercido por un anticuerpo obtenido por inmunización, y, por consiguiente, no puede aplicarse a cualquier sustancia que, fuera de semejanzas externas inexplicadas, difiere en todos los aspectos de un anticuerpo. Por una aplicación sin espíritu crítico de tales términos se entronizan prejuicios que, como enseña la experiencia, no siempre resulta fácil dejar luego de lado.

Para terminar este apartado señalaremos aún un punto que posiblemente pudiera tener mayor importancia que la que hasta la fecha se le ha

“receptores específicos de grupo”; sin embargo, según lo expuesto en las páginas 119 y siguientes, pudiera tratarse de otro proceso fuera del mundo conceptual de la serología.

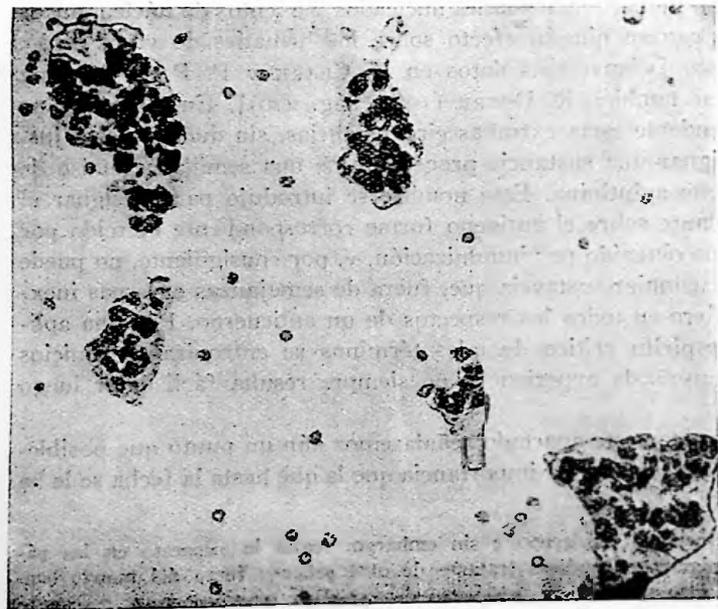


Fig. 8. Pseudoaglutinación. Imagen que corresponde a las figuras de la publicación de S. G. SHAYROCK. Se trata de la sangre de una embrazada que ofreció una sedimentación rápida. La reacción se reproducía al mezclar el suero de la mujer con sus propios hemates en un portaobjetos y extraer con un cubreobjetos. Los grumos, contenían pilas. (Reproducida con permiso de A. F. COCA).

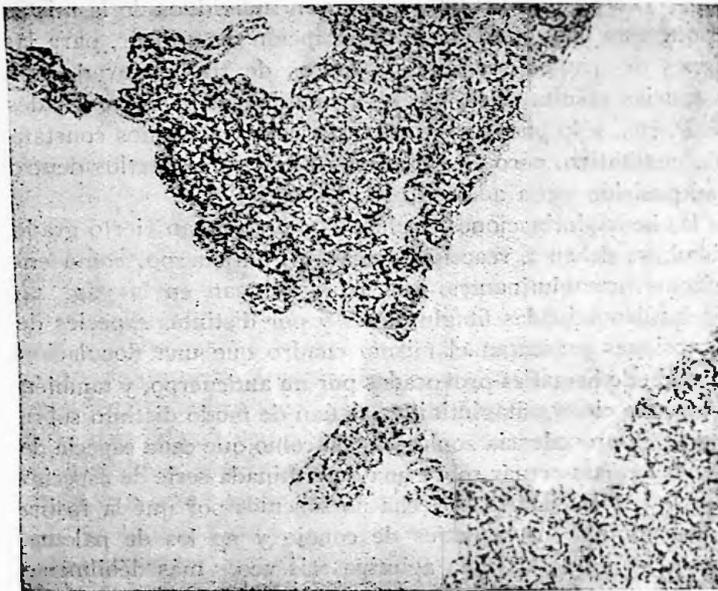


Fig. 9. Isoaglutinación. Las células aparecen íntimamente apelmazadas y fundidas entre sí. No se observan pilas. (Reproducida con permiso de A. F. COCA).

prestado. Desde hace mucho tiempo se sabe que los hematíes en el curso de enfermedades febriles, durante el embarazo, a consecuencia del desarrollo de tumores malignos y en algunos otros estados patológicos tienen tendencia a sedimentarse rápidamente, observaciones que fueron el fundamento de la velocidad de sedimentación introducida por R. FAHRÆUS en medicina clínica. La investigación microscópica enseña que la sedimentación rápida se debe a que los hematíes se superponen por los lados planos de modo que originan agregados en forma de pilas de monedas. Una discusión acerca de si S. G. SHATTOCK (1899, 1900) había descubierto el fenómeno de la isoaglutinación o solamente esta agrupación en pilas incitó a A. F. COCA (1931) a investigar microscópicamente tanto los aglutinados en forma de pilas (que en conexión con esto se denominaron "seudoaglutinaciones") y las isoaglutinaciones verdaderas y a publicar las imágenes fotográficas conseguidas. En los agregados por pseudoaglutinación se ven grumos de hematíes y pilas, especialmente en los bordes de los grumos: la isoaglutinación se caracteriza porque los hematíes aglutinados se fusionan entre sí y faltan las pilas. En las figuras 8 y 9 se reproducen dos ilustraciones de la comunicación de COCA, de las que se deduce que los hematíes se dañan gravemente en la isoaglutinación, y que las modificaciones deben producirse primero en la superficie; únicamente falta por preguntarse si en ambos casos las reacciones se han llevado a cabo en iguales condiciones y, en particular, si en la isoaglutinación no cooperó la centrífuga: en la pseudoaglutinación no se utilizó (véase la explicación al pie de la figura 8).

Si la investigación microscópica de los aglutinados se ampliara y extendiera a las distintas fases de las hemaglutinaciones, tal vez pudiera explicar muchas observaciones como, por ejemplo, el fenómeno de que los hematíes de gallina adsorban rápidamente el virus de la gripe y sean aglutinados por él, pero que el virus ligado se eluya casi completamente en el transcurso de cuatro a seis horas, y que los hematíes liberados resulten ya insensibles frente a una nueva acción del virus. es decir, que en lo sucesivo sean inaglutinables por él [G. H. HIRST (1942)].

b) *Las isoaglutininas de los animales.*

a) *Monos.*

aa) *Antropoides. Chimpancés.*—De los 92 chimpancés investigados 81 pertenecen al grupo sanguíneo A y 11 al O; hasta 1945 no existían datos acerca de chimpancés pertenecientes a los grupos B o AB. El aglu-

tinógeno B del chimpancé no difiere del factor humano del mismo nombre según las investigaciones de K. LANDSTEINER y C. PH. MILLER (1925). Teniendo en cuenta las reglas establecidas por LANDSTEINER para los cuatro grupos sanguíneos clásicos y el problema de la formación de las isoaglutininas, parece muy interesante la observación de que el suero del chimpancé que pertenece al grupo A contiene una β -aglutinina, y que los del grupo O tanto una β como una α -aglutininas (1). De modo que lo anterior confirma la regla de LANDSTEINER. Ahora bien, únicamente en parte porque no existen chimpancés de los grupos B y AB. Si se comparan las fórmulas de los cuatro grupos sanguíneos del hombre y los grupos del chimpancé hasta ahora conocidos, se obtiene el siguiente esquema:

<i>Hombre</i>	<i>Chimpancé</i>
O, α , β	O, α , β
A, β	A, β
B, α	falta
AB θ	falta

En el hombre se observa una simetría perfecta que parece señalar la razón de que existan siempre las aglutininas compatibles; en el chimpancé la β -aglutinina que se observa en el grupo O, α , β y en el A, β es, por decirlo así, "inmotivada" porque no se opone a ningún B. Se podía admitir, ampliando la hipótesis de F. BERNSTEIN (véase página 97), que el chimpancé, del mismo modo que el hombre, produce siempre ambas aglutininas a causa de su especie misma e independientemente de las sustancias específicas de grupo, y que las aglutininas incompatibles se eliminan por absorción; pero esta salida resulta aquí menos satisfactoria que en las aglutininas humanas.

Orangutanes.—Según los datos de P. DAHR (1937), hasta 1938 se habían investigado los grupos sanguíneos de 18 ejemplares de estos antropoides, a los que hay que añadir un animal estudiado posteriormente por A. S. WIENER y P. B. CANDELA. De estos 19 orangutanes 7 pertenecen al grupo A, 8 al grupo B y 4 al AB; las relaciones entre estos isoaglutinógenos y las isoaglutininas son las mismas que en el hombre, es decir, que las muestras de sangre A y B dan aglutinaciones en las pruebas cruzadas. El grupo O $\alpha\beta$ no se ha encontrado hasta la fecha, lo que en la opinión del autor puede considerarse

(1) Consúltese también P. DAHR (1938 a), donde se recogen datos acerca de la reacción del factor O del chimpancé con aglutinina animal anti-O.

como una prueba más de que O no es un "antígeno nulo" (véanse páginas 86 y siguientes).

Los *gibones* ofrecen las mismas relaciones que los orangutanes. K. LANDSTEINER (1928 a) pudo investigar siete animales que pertenecían a diversas especies y encontró que de dos *Hylobates lar*, uno era del grupo A y otro del grupo B, y de tres *Hylobates leuciscus* y dos *Symphalangus syndactylus*, los cinco pertenecían al grupo B. Como en los orangutanes falta el grupo O.

Gorilas.—K. LANDSTEINER (1928 a) investigó la sangre de un gorila de uno a dos años; sin embargo, le fué imposible incluirlo en ninguno de los cuatro grupos sanguíneos del hombre. H. WEINERT (1938) incluyó en el grupo A a tres gorilas por él estudiados; la determinación se efectuó, sin embargo, con auxilio de sueros humanos anti-A y anti-B no absorbidos, y por tanto tales sueros pudieran contener aglutininas específicas de especie para los hematíes del gorila, por lo que P. DAHR (1938) no admite estos datos. Restan aún los resultados de P. B. CANDELA, a los que sólo podemos referirnos basándonos en las comunicaciones de A. S. WIENER (1945, pág. 334) y las investigaciones de fundamental importancia de A. S. WIENER, P. B. CANDELA y L. J. GOSS (1942).

Las determinaciones de CANDELA se extendieron a 15 gorilas pertenecientes a las dos especies de Gorilla gorilla (gorila del valle) y *G. berengei* (gorila de la montaña) y se efectuaron en muestras de orina y en algunos casos también en extractos de órganos. El objeto de la investigación eran las sustancias específicas de grupo; no se pudieron hacer, naturalmente, observaciones acerca del comportamiento de las isoaglutininas. Los 13 gorilas del valle pertenecían todos al grupo B, y los 2 gorilas de la montaña, al grupo A.

WIENER, CANDELA y GOSS investigaron las reacciones de los hematíes de un gorila del valle con sueros inmunes de conejo anti-A, anti-B, anti-M y anti-N. El resultado fué notable en muchos respectos. Los hematíes contenían un factor emparentado con el isoaglutinógeno M del hombre, aunque no idéntico a él, y también posiblemente un componente semejante al N. Por el contrario, no pudieron descubrirse en los hematíes ni A, ni B. En el suero del animal investigado se encontraba una aglutinina anti-A, pero no, sin embargo, aglutinina anti-B, de modo que, con respecto a los hematíes, y prescindiendo del suero, se tenía la fórmula contradictoria cero a (no "O a "). Considerando que, en el hombre, las sustancias específicas de grupo no sólo se encuentran en los hematíes, sino también en órganos y líquidos orgánicos o en las secreciones (saliva, orina, etc.), se prepararon extractos de las

glándulas salivares que conseguían inhibir las reacciones de la sustancia B con sueros anti-B de conejo o humano, obtenidos por vía inmunizatoria; por consiguiente, las glándulas salivares y, probablemente, otros tejidos del gorila contienen una sustancia idéntica o muy semejante al factor B del hombre, lo que explica la carencia de aglutinina β , por lo que los gorilas, en cuanto a la regla de LANDSTEINER, puede considerarse del grupo de fórmula B α . WIENER y colaboradores pudieron encontrar, con auxilio de un procedimiento sistemático de la prueba de inhibición, la sustancia B en la orina y saliva de otros dos gorilas del valle [A. S. WIENER y J. KOSOFSKY (1941)].

Ahora bien, la regla de LANDSTEINER de la presencia constante de aglutininas compatibles sólo tiene alcance si puede aplicarse en *todos* los casos del sistema O —, A —, B, es decir, a *todo* el sistema. Pero si en el gorila del valle, como parece ser, sólo existe la combinación B α , esta especie no presenta sino un único caso del sistema por lo que la existencia de α en el suero resulta menos comprensible que las relaciones recíprocas en el sistema completo del hombre. Volveremos en el próximo capítulo a considerar la significación de *tales combinaciones singulares*, limitadas a las razas, de un *único isoaglutinógeno con una aglutinina compatible*.

Además, el factor B en el gorila no se encuentra en los hematíes sino sólo en los órganos (y líquidos orgánicos), y en cambio se descubre en los hematíes el factor M y quizás también un factor semejante al N, lo que plantea un nuevo problema. En el hombre los factores A y B se descubren tanto en los hematíes como en los tejidos y líquidos orgánicos, mientras que los M y N sólo en los hematíes [W. C. BOYD y L. G. BOYD (1934), A. S. WIENER y S. FORER (1941), PH. LEVINE y E. M. KATZIN (1941) y otros]. Si se contraponen estas observaciones tropezamos manifiestamente con el problema del *lugar de formación de los isoaglutinógenos*.

$\beta\beta$) *Monos inferiores*.—En los datos que poseemos acerca de las relaciones entre las sustancias específicas de grupo y las isoaglutininas de la sangre del *Macacus rhesus* se tropieza con lagunas y contradicciones aisladas, sobre todo al examinar las observaciones antiguas de E. v. DUNGERN y L. HIRSCHFELD (1911), K. LANDSTEINER y MILLER (1925), O. THOMSEN y T. KEMP (1930), S. VORONOFF y G. ALEXANDRESCO (1930). Una comprobación cuidadosa efectuada por L. BUCHBINDER (1933) confirmó inmediatamente la afirmación de K. LANDSTEINER y MILLER (1925) de que en los hematíes del *Macacus rhesus* no podía descubrirse ninguna sustancia que pudiera identificarse con los factores A o B del hombre; también confirmó los

datos posteriores de K. LANDSTEINER (1928 b) y de O. THOMSEN y T. KEMP (1930) de que en el suero de los rhesus existe una aglutinina para las células A del hombre que no puede distinguirse de la α -aglutinina del suero humano y que en cambio no existe ninguna aglutinina β . Nos encontramos, pues, de nuevo con un estado de cosas caracterizado por la fórmula Cero α . Teniendo en cuenta los resultados del análisis de una constelación idéntica en un gorila del valle (véase pág. 127), P. B. CANDELA, WIENER y GOSS (1940) investigaron la saliva de cuatro monos rhesus, y en los cuatro encontraron la sustancia B, por lo que en este caso la observación parece admitir la misma explicación.

La posesión de hematíes carentes de A o B acompañada de la existencia de anti-A o anti-B en el suero, se ha observado también en otros monos inferiores. Por ejemplo, H. HIRANO (1932) comunica que el *Cynomolgus philippinensis* no contiene en los hematíes ni A ni B, mientras que su suero puede aglutinar los hematíes humanos de los grupos A y AB, pero no los de los grupos O o B; la observación era idéntica a lo apreciado en el *Macacus rhesus*. A la inversa, el suero del *Cercopithecus nictitans* sólo contiene una β -aglutinina [LANDSTEINER (1928 b)], y lo mismo le sucede al suero del mono araña *Ateles ater* [WIENER, CANDELA y GOSS (1942)], asociada en ambos casos con hematíes carentes de isoaglutinógenos que sean idénticos o semejantes a los A o B humanos.

Si escribimos para mayor claridad en signos serológicos las combinaciones expuestas en las consideraciones anteriores, obtenemos los dos esquemas siguientes:

<i>Hematies</i>	<i>Organos</i>	<i>Suero</i>
A —, B —	A +, B —	α —, β +
A —, B —	A —, B +	α +, β —

La diferencia frente a los grupos sanguíneos del hombre y de los antropoides (el gorila parece constituir una excepción) consiste sólo en que los isoaglutinógenos no están localizados en los hematíes, sino en los tejidos. Del mismo modo caracteriza A. S. WIENER (1945, página 336) el estado del asunto, aunque en tal consideración sólo debe verse una paráfrasis de lo observado que deja sin resolver el problema de la distinta localización. La hipótesis de BERNSTEIN según la cual todo hombre produce las isoaglutininas α y β , y la falta de la aglutinina incompatible en el suero se debe a estar reprimida su capacidad potencial de formación o a adsorberse con la misma rapidez que se produce,

se extiende, según A. S. WIENER, a todos los primates a consecuencia de la demostración de isoaglutinógenos ligados a los tejidos.

El hecho de que todos los primates sin excepción no sólo puedan producir aglutininas α y β , sino que de hecho la formen cuando no lo impida ninguna inhibición, está en notable contradicción con el comportamiento de las sustancias A y B en los antropoides y monos inferiores, como se deduce de la tabla 10.

TABLA 10
Isoaglutinógenos existentes en el
hombre y en algunos monos.

	A.	B.	O.
Hombre.....	+	+	+
Chimpancé.....	+	-	+
Orangután.....	+	+	-
Gibón.....	+	+	-
Gorilla gorilla.....	-	+	-
Gorilla berengéi.....	+	-	-
Macacus rhesus.....	-	+	-
Macacus irus.....	+	+	+
Ateles ater.....	+	-	-
Ateles cucullatus.....	-	+	+
Cercopithecus nictitans.....	+	-	-
Cin molang philippin.....	-	+	-

Los chimpancés no producen sustancia B, el orangután y el gibón no producen sustancia O; de las dos especies de gorilas el uno produce la B y el otro la A; el *Macacus rhesus* sólo produce la B, y el *Macacus irus* posee (en sus tejidos) las A, B y O; en resumen, las especies emparentadas se comportan de modo completamente distinto. WIENER (1945, pág. 340) hace resaltar que, según las investigaciones de LANDSTEINER y MILLER (1925)—que se extienden a 20 monos del nuevo mundo y 57 del antiguo, y que comprenden numerosas especies de

ambos grupos—, el isoaglutinógeno B se encuentra siempre en los plattirinos del nuevo mundo, mientras que falta en los cercopitecos del antiguo. Ahora bien, los autores citados sólo investigaron los hematíes; si se investigan también los tejidos o las secreciones (saliva, orina), deja de cumplirse esta regla, como lo demuestra el comportamiento de los macacos y del *Ateles ater*. Los factores A, B y O existen por tanto en los primates, pero seleccionados de modo distinto según las especies (AO, AB, BO, A, B), y esta distribución no depende del parentesco zoológico de las especies (compárense las dos especies de gorilas y el *Macacus rhesus* con el *Macacus irus*); además, todos los ejemplares de una especie pueden poseer un mismo factor o la distribución de los factores puede variar ofreciendo grupos sanguíneos dentro de la misma especie. Se ha querido deducir conclusiones filogenéticas de los datos observados; por ejemplo, de que en el chimpancé sólo existan los factores A y O y en el orangután y gibón sólo los A y B; LANDSTEINER y MILLER pretenden deducir que los primates que poseen los tres factores se han producido por cruzamiento. El hecho de que O sea raro en los monos y que entre los antropoides sólo exista

en el chimpancé mientras que domina en el hombre, se intenta aducir como prueba de que O se ha desarrollado después que A y B [WIENER (1945, pág. 337)]. Pero se ha defendido también el punto de vista de que en el hombre originalmente sólo existía O, de cuya mutación se han originado posteriormente A y B [F. BERNSTEIN (1925, 1930), L. H. SNYDER (1926, 1930), R. R. GATES (1939), L. HIRSZFELD (véanse págs. 94 y siguiente)], fundándose en que O domina en todas las razas humanas y porque en los indios americanos cuando son de raza pura es el único factor que existe (en un 97 por 100). Estas investigaciones, que abarcan numerosos individuos, se limitan en general a la determinación de las propiedades de grupo de los hematíes; lo que no basta para asegurar la carencia de un factor en el organismo; al menos se debería determinar también las aglutininas existentes en el suero, y, en los monos, el contenido en los órganos o secreciones de A, B y O. Si esto se hiciera, resultarían inseguras todas las hipótesis concernientes al origen de los grupos sanguíneos, que han consumido un enorme trabajo experimental, de algunas de las cuales se sabe que no posee generalidad. De los 12 *Macacus irus* (especie de mono javanés) que CANDELA, WIENER y GOSS (1940) han investigado, comprobando el contenido de isoaglutinógenos en la saliva y de isoaglutininas en el suero, cinco pertenecen al grupo A β , tres al A B θ y uno al O α β (1). Resultados seguros porque lo descubierto en la saliva se comprobó y confirmó por el comportamiento recíproco de las isoaglutininas. El *Macacus irus*, especie de mono inferior, se comporta, prescindiendo de la localización de los factores específicos de grupo, como las razas humanas, en que pueden encontrarse los grupos sanguíneos; el escaso número de animales investigados no permite opinar acerca de la frecuencia de los grupos particulares, lo que carece de trascendencia, porque, como es sabido, la proporción porcentual de los grupos sanguíneos en el hombre manifiesta oscilaciones muy grandes según las razas investigadas [consúltese W. C. BOYD (1939)]. Por el contrario, en el suero de hombre de cualquier raza, en la de un chimpancé, de un *Macacus irus* o *Ateles cucullatus* (véase luego), siempre que pertenezcan al grupo O, aparecen las aglutininas α y β . Si se quisiera considerar este hecho como decisivo, se llegaría a la conclusión de que *no son los factores específicos de grupo lo que imprime a los primates unidad serológica, sino las aglutininas α y β que aparecen siempre que no lo*

(1) Los tres animales restantes no se aducen porque sólo se analizó su saliva, pero no el suero sanguíneo; en la saliva de estos tres monos se encontró una vez A, otra B y la tercera A B.

impida o dificulte su incompatibilidad y que, como "consecuencia", deben también considerarse genéticamente como las formaciones serológicas más viejas de los primates. El autor, sin embargo, no necesita subrayar que una aseveración de este tipo no corresponde a su propio punto de vista; sólo desea contraponerla al juicio acerca de la edad relativa de los grupos sanguíneos. Una de las formulaciones más cuidadosas se encuentra en WIENER, CANDELA y GOSS (1942, pág. 234), que escriben: "If it is at all permissible to draw conclusions concerning the relative antiquity of the blood group factors, then the only that seems justified is that group O is the most recent." Pero si O es un factor, una sustancia específica de grupo, esta conclusión no parece justificada, y si es un antígeno nulo, entonces llegaríamos a la conclusión de que las aglutininas α y β aparecen al comienzo de la diferenciación específica de los grupos.

Los resultados reunidos por WIENER, CANDELA y GOSS (1942) sobre cinco especies de monos arañas de la especie *Ateles cucullatus* (tabla II) demuestran que falta mucho por explicar en cuanto a las relaciones entre los isoaglutinógenos y las isoaglutininas A y B en el orden primates.

TABLA II

Factores de los grupos sanguíneos e isoaglutininas en el *Ateles cucullatus* [según WIENER, CANDELA y GOSS (1942)].

N.º del animal.	Título inhibidor de la saliva para los hematies del grupo.		Reacción de grupo de la saliva.	Reacciones de los hematies.	Aglutininas específicas de grupo existentes en el suero.	Grupos determinados.
	A.	B.				
2	—	2 ⁸	B	O	Anti-A, anti-B débil	B ¹
4	2 ²	2 ²	O	O	Anti-A, anti-B	O
8	2 ⁴	2 ⁸	B ¹	O	Anti-A, anti-B débil	B ¹
9	2 ²	2 ⁸	B ¹	O	Anti-A, anti-B débil	B ¹
11	2 ²	2 ⁸	B ¹	O	Anti-A, anti-B débil	B ¹

Testigos (saliva):

A de hombre 2¹¹ 0

B de hombre 0 2¹⁰

B¹ significa que el factor B de la saliva difiere del factor B del hombre (véase el texto).

La saliva de los monos designados con los números 2, 8, 9 y 11 ejercía también una inhibición enérgica para las células B, y débil o nula para las células A, pero el suero no sólo contiene aglutininas anti-A, sino también Anti-B,

de modo que parece también destruida en este caso la reciprocidad entre antígeno y aglutinina. Pero como el anti-B posee un título bajo y la saliva en ambos casos (números 8 y 11) no sólo inhibe la reacción con las células B, sino también, en menor grado, con las células A, los autores opinan que el B contenido en la saliva de este Ateles difiere cualitativamente del factor B humano, y hasta pretenden considerar la circunstancia de que a esta variante B¹ sólo corresponda en el suero una aglutinina α débil, como "una especie de confirmación de la regla de reciprocidad". Es posible que las cosas, de hecho, sucedan de este modo, es decir, que el inhibidor B contenido en la saliva sea cualitativamente diferente del factor B humano. Pero esto no modifica, en último término, el hecho de que el anti-B contenido en el suero esté asociado con un B de la saliva fuertemente inhibidor, de modo que parece existir una incompatibilidad de grado reducido (consúltese, sin embargo, la pág. 107). En todo caso lo observado en el animal núm. 4 corresponde a la fórmula $O\alpha\beta$, y la aglutinina β poseía, según el protocolo reproducido, no un título "anti-B débil", sino el correspondiente a una aglutinina ordinaria. El núm. 2, según los resultados de las pruebas de inhibición, era un B puro, y la designación del factor en la última columna, como B¹, parece arbitraria; señalar la existencia de una diferencia cualitativa porque se descubra en el suero del animal una anti-B débil fuerza a explicar lo que se aduce como explicación. Deben proseguirse las observaciones en esta especie de Ateles para esclarecer este caso, que no carece de interés teórico.

β) Otros mamíferos.

En las páginas 105-106 se reunieron los datos concernientes a los grupos sanguíneos de *ovejas*, *cerdos* y *caballos*. Nos referimos en aquel lugar, especialmente, a las investigaciones en caballos comunicadas por A. KAEMPFER (1935), según las cuales en los caballos habían podido establecerse seis combinaciones estrictamente específicas de isoaglutinógenos con isoaglutininas, pero de las cuales sólo dos grupos (designados A α y B β) son siempre completos, mientras que en los otros cuatro es frecuente que sólo pueda descubrirse el isoaglutinógeno, faltando en el suero la aglutinina compatible (*grupos "defectivos" o "incompletos"*).

En las vacas tropezamos con relaciones mucho más complicadas. Es cierto que R. B. LITTLE (1929) encontró en la sangre del ganado vacuno isoaglutininas con cuyo auxilio pretendió distinguir tres grupos principales; pero LITTLE añadió que muchos sueros dan reacciones que no se pueden adscribir a estos grupos, por lo que es necesario establecer grupos adicionales. Ya en 1910 C. TODD y R. G. WHITE publicaron las siguientes observaciones: Para obtener un suero antipestoso bovino se inyectaron a unas reses grandes cantidades de sangre de otras (dos a cuatro litros); el suero de estas vacas inyectadas lisan completamente los hematíes de otras vacas después de añadirle complemento de cobayo;

es decir, contiene amboceptores isolíticos. Si se reúnen varios sueros isolíticos de este tipo, la mezcla obtenida disgrega los hematíes de cualquier vaca; si tal mezcla se adsorbe a los hematíes de una vaca determinada, pierde su efecto sobre estos hematíes, pero conserva su efecto lítico para los de otra, de modo que con auxilio de una tal mezcla de sueros, "adsorbida individualmente", se puede descubrir entre 116 vacas la vaca de que proceden los hematíes adsorbentes. TODD y WHITE llegan a la conclusión de que la sangre de cualquier vaca debe poseer propiedades específicas que la distinguen de la de cualquier otro individuo no emparentado.

Treinta años después L. C. FERGUSON (1941) y FERGUSON, STORMONT e IRWIN (1942) llegaron a la misma conclusión. Para determinar las diferencias individuales utilizaron sueros inmunes, parte de los cuales se habían obtenido por la inmunización de una vaca con la sangre de otra; estos sueros isoimunes se hicieron reaccionar con los hematíes de otras vacas y con complemento, no apreciándose adsorción ni después una previa adsorción a hematíes del tipo utilizado en el ensayo. Además de estos sueros isoimunes se utilizaron también sueros de conejo, tratados con la sangre de determinadas vacas. Los resultados de la prueba justifican la conclusión de que en los hematíes de la vaca pueden apreciarse al menos 30 aglutinógenos que, por poseer independencia recíproca, permiten 230 combinaciones distintas; por ello, como conclusión práctica, puede decirse *que* (como habían afirmado TODD y WHITE), *de hecho, cada vaca representa una individualidad serológica y puede diferenciarse de otra vaca.* Se ha estudiado la herencia de los isoaglutinógenos en 500 parejas de animales, sin poder encontrarse nunca una ternera con un isoaglutinógeno que faltara en ambos padres; de ello se deduce que ninguno de los genes que rigen estas propiedades posee carácter recesivo. También pudo excluirse la posibilidad de que alguno de los 30 isoaglutinógenos se hubiera desarrollado por la cooperación de factores hereditarios complementarios. Tampoco se pudo encontrar entre los 30 aglutinógenos ningún par que, a semejanza del de los factores M y N, se heredara de modo alternado, de modo que todo individuo hubiera de poseer uno o los dos factores del par. No debemos entrar aquí en mayores detalles. FERGUSON, y colaboradores se han ocupado únicamente de los isoantígenos de los hematíes sin estudiar sus relaciones con las isoaglutininas e insolisinas *naturales*. De modo que sólo estamos informados (por R. B. LITTLE) de la existencia de isoaglutininas naturales. Sin embargo, ofrecería el mayor interés saber si en la vaca las isoaglutininas reflejan la gran multiplicidad de los isoantígenos y de si falta siempre la aglutinina especial

incompatible y de sí, en cambio, existe toda la serie de aglutininas especiales posibles y compatibles. Las investigaciones de TODD y WHITE y de FERGUSON y colaboradores, tan valiosas en sentido teórico como práctico (ya que permiten determinar la procedencia de las vacas), sólo han resuelto a medias el problema de la sorprendente individualización serológica de las vacas. También sería importante investigar si el número de isoaglutinógenos resulta tan grande en otras razas y especies de bóvidos como en las razas domésticas.

B. LAS HETEROHEMAGLUTININAS y HETEROHEMOLISINAS NATURALES.

α) *Hombre (heterohemaglutininas normales y patológicas con atención especial a los hematíes de carnero).*

El suero humano normal, como los sueros normales de numerosos animales, posee la capacidad de aglutinar una serie de hematíes de otras especies, entre ellos los de conejo, caballo, vaca, oveja [M. KINDERMANN (1935), F. SCHIFF (1937) y otros] y los de ratón [E. MACDOWELL y J. HUBBARD (1922/23), H. HARPOTH (1935)]. El hecho de que los serólogos, entre la heterogénea serie, hayan escogido los de la oveja como objeto preferente para el estudio de los hematíes aglutinables, se debe al descubrimiento de los *antígenos heterogenéticos o heterófilos* por FORSSMAN (1911). Es sabido que por la inmunización con riñón de caballo u órganos de cobayo de animales en cuyo organismo no existe el antígeno se obtienen sueros que lisan los hematíes de carneros. Como el hombre pertenece a los mamíferos que no poseen antígeno F en los órganos ni en los hematíes o líquidos orgánicos, muchos autores admitieron que la aglutinina para la sangre de oveja que contiene con frecuencia el suero humano normal [según M. KINDERMANN, en el 89 por 100 de los individuos] debe ser un "anticuerpo de FORSSMAN". La aglutinina posee siempre un título bajo (1:2 a 1:32 según KINDERMANN, y hasta 1:25 según F. SCHIFF). ¿Este anticuerpo se produce de modo espontáneo o por efecto criptogenético del antígeno de FORSSMAN?

Antes que nada debe discutirse la posibilidad designada en segundo lugar, porque hay que contar con posibles *infecciones por bacterias* que contengan el antígeno F y con *sensibilizaciones entéricas*, bien por alimentos que contengan F o por la flora bacteriana intestinal. Así, G. H. BAILEY (1927, 1928) encuentra que los conejos producen hemolisinas de alto título para los hematíes de carnero cuando se infectan

con una estirpe de *B. leipsepticus* (probablemente también por *Neisseria catarrhalis*) o si estas bacterias viven en las cavidades nasales como epifitos. J. FORSSMAN (1946) supone que el origen de la hemolisina "normal" de conejo para la oveja es una sensibilización enteral, por una parte, porque ciertos componentes vegetales contienen el antígeno F (escaramujos, yemas tiernas del *Pinus avies*) y porque, según FORSSMAN, por la inmunización de conejos con extractos alcohólicos del contenido del intestino ciego de otro conejo se estimula en algunos casos la producción de hemolisinas para el carnero, de título bajo. Los resultados experimentales de FORSSMAN no pueden considerarse, sin embargo, como pruebas concluyentes [consúltese R. DOERR (1948, página 278)], y la posibilidad de una inmunización por bacterias F no excluye la formación espontánea tanto en el conejo como en el hombre. En todo caso debe considerarse que tanto el suero normal humano como el de conejo contienen anticuerpos para los hematíes de carnero, y que tales anticuerpos aumentan con la edad tanto en el hombre como en el conejo a semejanza de las isoaglutininas humanas [FRIEDBERGER, BECK y FÜRSTENHEIM (1929), FRIEDBERGER y GAJZAGO (1930)]. Naturalmente, parece una deducción correcta, tomada de modo absoluto, que con la edad debe aumentar la probabilidad y frecuencia de los estímulos inmunizantes; pero el hombre y el conejo poseen una duración de vida muy distinta, se alimentan de modo diferente y están sometidos a muy distintas infecciones, por lo que este argumento parece extemporáneo. Ahora bien, si la aglutinina para la sangre de carnero se produjera en el suero humano sin estímulo exógeno, lo que indudablemente parece probable, no hay motivo para calificarla de "anticuerpo de FORSSMAN", simplemente porque éste también actúa sobre la sangre de carnero; tal calificación se desautoriza sin más que considerar que el suero normal humano no sólo aglutina los hematíes de esta especie, sino otros hematíes que no contienen antígeno de FORSSMAN, como los de conejo y de vaca. Es cierto que existe una prueba serológica de la naturaleza de FORSSMAN de la aglutinina para el carnero existente en el suero humano normal, que consiste en adsorberlo por riñones de caballo y, ante todo, por riñones de cobayo. Pero las adsorciones a órganos desmenuzados, que es el adsorbente aplicado en la mayoría de las pruebas, pueden rendir resultados inespecíficos o variables, especialmente si el anticuerpo existente en el suero sometido a la adsorción posee un título muy bajo, como sucede con las aglutininas para el carnero del suero normal humano. Para dar un ejemplo que revele el cuidado que debe tenerse al enjuiciar los resultados obtenidos en pruebas de adsorción pueden estudiarse los

resultados publicados por R. DOERR y R. PICK (1913) de las adsorciones de sueros normales tóxicos a órganos de diversas especies de animales. La toxicidad que ofrece para el cobayo el suero normal de vaca (en inyección intravenosa) puede impedirse o reducirse por adsorciones previas efectuadas a órganos de cobayo, caballo, perro, pero también a los de conejo, y la toxicidad del suero de anguila desaparece por adsorción a riñones de cobayo y de gato, pero no a los de conejo. Si se hubieran efectuado las experiencias desde un punto de vista unilateral, podría haberse llegado a la notable conclusión de que el principio tóxico existente tanto en el suero de vaca como en el de anguila es el anticuerpo de FORSSMAN. Ahora bien, el comportamiento de los riñones de conejo invalida esta conclusión. Por último, en las investigaciones concernientes a los anticuerpos del suero humano normal se han utilizado los denominados sueros de WASSERMANN, de los que pueden disponerse, *ad libitum*, en los laboratorios en que se efectúa el diagnóstico serológico de la sífilis; estos sueros no constituyen el material de investigación más apropiado. En estas circunstancias debe uno buscar otros argumentos que den cierta seguridad acerca de la naturaleza de las aglutininas humanas para los hematíes de carnero.

El título bajo que ofrece normalmente la aglutinina humana natural para los hematíes de carnero puede exaltarse en estados patológicos; este fenómeno se ha observado hasta la fecha en la *enfermedad del suero*, en la *mononucleosis infecciosa* y, posiblemente, en las reacciones alérgicas.

La elevación del título como consecuencia de la enfermedad del suero fué primeramente observada por N. HANGANUTZIU (1924) e inmediatamente después por H. DEICHER (1926) y por otros autores: de sus observaciones parece deducirse que el título se exalta después de administrar inyecciones de sueros de otra especie, especialmente del suero de caballo, aunque no se observen síntomas de la enfermedad del suero [J. DAVIDSOHN (1929), H. DEICHER (1926), K. KINDERMANN (1935)]. El hecho de que el título de aglutininas suela ser más alto al desarrollarse una enfermedad del suero [J. DAVIDSOHN (1928, 29), H. DEICHER, N. W. KAGAN (1931)] no posee una significación fundamental y tanto menos cuanto que la técnica de la titulación no siempre es la misma y muchas veces es inadmisibles [compárese J. DAVIDSOHN (1933 a) y O. KETELSEN (1938)]. En todo caso la producción o superproducción de aglutininas para los hematíes de carnero no puede considerarse como una reacción específica de la enfermedad del suero, puesto que en forma idéntica se produce en

la mononucleosis infecciosa. Consideradas de modo objetivo las cosas suceden sencillamente como si después de una inyección del suero extraño aparecieran en la sangre del hombre las aglutininas para los hematíes de carnero, y como si el intervalo entre la inyección y la aparición de la aglutinina correspondiera al término de la formación de anticuerpos después de una única administración parenteral de antígeno [H. DEICHER, M. KINDERMANN y J. DAVIDSHON (1928)], por lo que cabe preguntarse *cuál es el antígeno existente en el suero de una especie extraña responsable de la formación de aglutininas.*

Consideremos primeramente el caso de la inyección de suero de caballo, que es el observado con más frecuencia y estudiado con más exactitud. Como es sabido, en los tejidos del caballo el antígeno de FORSSMAN se descubre en concentraciones altas, y los riñones de caballo han sido el producto de partida utilizado preferentemente por casi todos los autores que han intentado aislar o purificar esta sustancia. Además, el antígeno se encuentra en la orina del caballo [R. DOERR y R. PICK (1914)] y en su suero [D. ORUDSCHIEW (1912), T. TANIGUCHI (1921), A. J. WEIL (1926)]. Por último, J. DAVIDSHON y S. G. RAMSDELL (1929) observan que los conejos reaccionan frente a la inyección (1) intraperitoneal o intravenosa de suero normal de caballo o de suero antiestreptocócico de caballo con una elevación del título normal de la hemolisina para el carnero y con que su suero se vuelve tóxico para el cobayo. Una globulina antitóxica aislada del suero antidiftérico de caballo resultó, por el contrario, inactiva. El antígeno existente en el suero de caballo *podría ser*, pues, el antígeno de FORSSMAN, y la aglutinina existente en el suero de hombres tratados con suero de caballo, el anticuerpo de FORSSMAN. Sin embargo, esta conclusión se desvirtúa por otras observaciones.

F. SCHIFF (1937) estableció después en el suero humano normal el título de aglutininas para diversas especies de hematíes, y encuentra, como título máximo, para los hematíes de oveja y vaca 1:25, para los de caballo 1:100, y para los de conejo 1:400. Ocho pacientes a los que se inyectó con fines terapéuticos grandes cantidades de *suero inmune de conejo* enfermaron, según informa F. SCHIFF, ofreciendo una enfermedad del suero de gravedad unas veces moderada y otras

(1) La dosis individual fué de 3 ml. de suero de caballo y se repitió cinco veces distanciadas entre cinco y siete días; tres animales recibieron hasta 13 inyecciones. Según ello, la cantidad total de suero de caballo que recibió cada conejo fué muy grande. Lo que es tanto más de notar cuanto *que las inyecciones subcutáneas no dieron nunca resultado.*

acusada, y los títulos de aglutininas se elevaron en dos de seis casos investigados con exactitud, a un nivel alto (véase tabla 12).

TABLA 12

Comportamiento de las heteroaglutininas humanas después de inyecciones de suero de conejo [según F. SCHIFF (1937, pág. 307)].

Caso núm.	Dosis de suero [ml.]	Enfermedad del suero.		Período entre las inyecciones del suero y las tomas de sangre.	Aglutinación para hemáticas de				
		Días después de la inyección.	Gravidad.		Conejo.	Oveja.	Vaca.	Caballo.	Rhe-sus.
1	40	11	acu-sada	8 días	50				
2	60			8 >	100			100	
3	120			12 >	400	25	50	200	25
4	120			13 >	800	1.600	200	300	400
5	5	11	mode-rada	15 >	3.200	800	1.600	3.200	3.200
6	30	9	>	15 >	200	25	100	100	
7	42	9	>	15 >	100	100	50	400	25
8	65			16 >	200	50	50	200	

Observación.—En el caso 4 se recibieron en el día primero 80 ml., y en el día quinto, 40 ml.; en el caso 6, en el día primero, 10, y en el día quinto, 20 ml.; y en el caso 7, en el día primero, 22, y el quinto, 20 ml.; en todos los restantes casos las cantidades de sueros consignadas en la tabla se administraron en forma de una sola inyección.

De la tabla 12 puede deducirse:

1. Que a consecuencia de la administración de inyecciones de suero de conejo puede aparecer la enfermedad del suero. Esta observación no es nueva, porque se ha observado la aparición de la enfermedad del suero a consecuencia de inyecciones de suero de bovino, de carnero y de gallina [M. PÉHU y P. DURAND (1920), J. PENNA (1918), K. OCHSENIUS (1917), A. SCHITTENHELM (1925), P. KYES y E. S. CAREY (1927) y otros]; el síndrome típico de la enfermedad del suero se ha observado también, aunque es cierto que solamente en casos aislados, a consecuencia de la inyección intravenosa, intraspinal o subcutánea de suero humano [A. NETTER (1915), P. L. MARIE (1916), P. DOOLEY (1932), R. DEBRÉ y H. BONNET (1925), HELLER (1937)]. Los sueros de conejo, bovino y hombre no contienen antígeno de FORSSMAN; por consiguiente, no puede ser éste el factor que participa de modo esencial en la patogénesis de la enfermedad del suero

La experiencia concerniente a la aparición de la enfermedad del suero subsiguiente a las inyecciones de sueros extraños se limita a los sueros animales designados, porque al hombre no se le inyectan sueros por el mero propósito de la investigación. Además habría que someter un número mayor de personas a tales experimentos para asegurarse de que un resultado es constantemente negativo, ya que, como es sabido, tampoco las inyecciones de suero de caballo provocan siempre la enfermedad del suero. Además sería necesario inyectar mayores cantidades de suero, porque la frecuencia con que se provoca la enfermedad del suero a consecuencia de una primera inyección de suero de caballo, varía con la cantidad de suero inyectada; incluso proponiéndose efectuar experiencias puramente teóricas en hombres, se tropezaría con dificultades para disponer de cantidades suficientes de suero de animales pequeños. *Por ello no es de ningún modo seguro e incluso parece improbable que exista algún suero de otra especie completamente incapaz de provocar una enfermedad del suero (1).*

2. En las observaciones de F. SCHIFF, como consecuencia de la inyección de suero de conejo, no sólo se apreciaba la elevación de la aglutinina para los hematíes de carnero, sino también la elevación de las aglutininas de los hematíes de conejo, vaca, caballo y mono, y no todas estas células contienen el antígeno de FORSSMAN; la aglutinina que aparecía en el suero de los pacientes no se comporta, pues, como un "anticuerpo de FORSSMAN". Lo mismo puede decirse de las aglutininas que aparecen en el suero humano a consecuencia de las inyecciones de suero de caballo o de carnero; H. DEICHER (1926) comprobó que, en tales casos, los hematíes de oveja, vaca, caballo, conejo, cobayo y cerdo se aglutinan mucho más intensamente que con suero normal humano.

3. El que resulte una enfermedad del suero a consecuencia de la inyección de suero de conejo no depende de la intensidad de la elevación del título de aglutininas, ni tampoco cuando sólo se considera la elevación de las aglutininas para los hematíes de carnero.

De las observaciones citadas, F. SCHIFF deduce que los sueros de caballo y conejo, por una parte, y, por otra, los hematíes de caballo, conejo, carnero, mono y vaca contienen sustancias análogas provistas de funciones de antígeno que él designa como "*antígenos específicos*".

(1) Por ahora resulta válida la afirmación: "no hay ninguna especie animal cuyo suero, si no se administra a dosis excesivas, provoque enfermedad del suero en el 100 por 100 de los casos, ni que, por el contrario, no lo haga también en el 100 por 100" (H. SCHMIDT, 1940, pág. 106).

de la enfermedad del suero". Según SCHIFF deben ser termoestables, parcialmente solubles en alcohol y parcialmente en agua; fundándose en pruebas de adsorción a distintos hematíes, SCHIFF se inclina a admitir que el antígeno de la enfermedad del suero debe estar compuesto de antígenos parciales que se distribuyen de modo distinto en los hematíes de diferentes animales, aproximadamente según el conocido esquema:

Hematíes de carnero	a
Hematíes de conejo	a b
Hematíes de bovino	a c

Esta hipótesis, sin embargo, tiene el inconveniente de no estar justificada por las observaciones antes expuestas. La enfermedad del suero puede provocarse también por suero de vaca, de carnero, de gallina y de hombre y quizá también por una serie de sueros de otras especies no ensayadas; y, además de los hematíes comprobados por SCHIFF, el suero de hombres que han recibido sueros de otra especie aglutina también otros hematíes (de cobayo y conejo, según DEICHER). El hipotético "antígeno de la enfermedad del suero", caso de que exista, ha de ser una sustancia que, a pesar de su función antigénica, debe encontrarse en el suero y en los hematíes de los más diversos animales y, por tanto, no ser específico de especie, tanto más cuanto que actúa sobre la especie en cuyo suero existe (enfermedad del suero a consecuencia de inyecciones de suero humano); no podría ser comparado con el antígeno de FORSSMAN, porque aunque éste se encuentre también muy extendido, no actúa sobre los animales en cuyo cuerpo existe.

El problema de la patogenia de la enfermedad del suero se tratará aquí considerando sólo los caracteres generales que sirvan para la comprensión de sus relaciones con la reacción de HANGANUTZIU-DEICHER. Como es sabido, CL. V. PIRQUET y B. SCHICK (1905) consideraron como causa de la enfermedad del suero una reacción entre el suero de caballo que funciona como antígeno y un anticuerpo producido en el organismo. E. A. VOSS (1937/38) da la siguiente prueba de la existencia de este anticuerpo. Si se inyecta a un hombre, por vía subcutánea, suero de caballo, y después de transcurridas entre ocho horas y unos días, por vía intravenosa, suero de convaleciente de la enfermedad del suero, aparecen fenómenos, primero localizados, y después de más de cuatro días, generales, que nunca se limitan al lugar de la inyección y que se asemejan a los síntomas de la enferme-

dad del suero. Voss [véase también Voss y E. HUNDT (1938)] hace observar que se trata de un fenómeno análogo a la *anafilaxia pasiva inversa*, y R. DOERR (1946) señala especialmente que existe una coincidencia (la necesidad de un periodo de incubación) con las observaciones de E. L. OPIE y J. FURTH (1926), que consisten en el siguiente fenómeno: si a conejos normales se les inyecta, por vía subcutánea, suero de caballo, y cuatro horas después, por vía intravenosa, suero anti-caballo, de este modo se produce anafilaxia local y choque mortal. El experimento animal fué considerado unánimemente como *anafilaxia pasiva inversa*, es decir, como un experimento de anafilaxia pasiva, en el que se cambia el orden de administración de los componentes de la reacción. La prueba efectuada por Voss en el hombre fué confirmada varios años después por S. KARELITZ y S. S. STEMPIEN (1942). Se diferencia, sin embargo, de los fenómenos anafilácticos porque el anticuerpo anafiláctico debe ser una "precipitina", y en cambio el anticuerpo responsable de la enfermedad del suero es un anticuerpo *sui generis* que no ha podido identificarse con una precipitina ni con las denominadas reaginas de los idiosincrásicos [S. KARELITZ y A. GLORIG (1943)]. Sin embargo, como R. DOERR (1946 a, b) expone, este punto de vista, residuo de las primeras épocas de la serología, ha sido superado por la convicción de que todos los anticuerpos son seroproteínas modificadas (globulinas inmunes) que sólo poseen como propiedad conocida su afinidad específica con un antígeno, mientras que las consecuencias visibles de las reacciones antígeno-anticuerpo (formación de precipitado, aglutinación de células) no son debidas a una propiedad particular del anticuerpo, sino a la índole y forma del antígeno o a un efecto de los sueros inmunes que contienen los anticuerpos. Si este modo de pensar se considera justo, *no tiene sentido debatir si el anticuerpo que participa en la enfermedad del suero es una precipitina, una reagina o una "fenomenina"* (1) *aun no bautizada; lo único que habría que considerar sería la naturaleza del antígeno*. Durante mucho tiempo no se ha dudado de que únicamente debían tenerse en cuenta las proteínas del suero (globulina y albúmina); en favor de ello hablan las observaciones acerca de la enfermedad del suero fraccionada y de las diferentes reacciones intracutáneas frente a euglobulina, pseudoglobulina y albúmina [consúltese R. DOERR (1929, pág. 925) y B. RATNER (1943, pág. 422)]. Pero E. A. Voss, al que debemos el descubrimiento

(1) La expresión procede de F. LE DANTEC (1912) y vale por una crítica extensa de la ideología de la serología clásica.

extraordinariamente importante de la enfermedad del suero pasiva inversa, duda de la justeza de esta opinión y opina "que podría intentarse la demostración de que en las distintas enfermedades del suero está implicado un *antígeno de la enfermedad del suero común*". Habría, por ejemplo, que modificar el experimento arriba detallado de modo que una persona recibiera en tres distintos lugares de la piel del abdomen suero de caballo, suero de vaca y suero de carnero; los lugares de las tres inyecciones reaccionan cuando, transcurrido el intervalo necesario, se inyecta suero de convaleciente de enfermedad del suero provocada por la administración de suero de caballo. Las proteínas del suero dan lugar a anticuerpos específicos, concretamente con especificidad de especie, y al anticuerpo contenido en el suero de un paciente de enfermedad del suero parece inespecífico, ya que no sólo reacciona con el suero de caballo, sino también con el de vaca y carnero; por ello parece justificada la opinión de Voss de que las proteínas del suero no deben participar como antígenos. Sin embargo, no puede dudarse que los experimentos de OPIE y FURTH darían también el mismo resultado si se efectuaran no con el suero homólogo (es decir, con el suero correspondiente al anticuerpo), sino con sueros heterólogos. La anafilaxia pasiva para el suero nunca resulta tan específica de especie como la activa, porque la inmunización forzada requerida para conseguir un antisuero de título elevado reduce la especificidad [R. DOERR y V. RUSS (1909), R. DOERR (1947 a, página 89)]. Por lo demás la enfermedad del suero pasiva inversa de ningún modo posee carácter inespecífico (como cabría esperar, con carácter necesario, si existiera un antígeno de la enfermedad del suero común para los sueros de toda especie); en efecto, de S. KARELITZ y A. GLORIG (1943) inmunizaron cinco niños, cada uno con 0,1 ml. de suero de cerdo, oveja, gato, perro, cobayo, hombre, mono y conejo, así como de caballo por vía subcutánea, y veinticuatro horas más tarde les administraron por vía intravenosa el suero de un convaleciente de la enfermedad del suero (suero anti-caballo); en todos los casos reaccionaron únicamente los lugares en que se había aplicado subcutáneamente el suero de caballo con excepción de una reacción ligera en el lugar de una inyección del suero de carnero; como reacción testigo se inyectó, en lugar de suero de convaleciente, suero diluido de caballo, suero humano normal y suero de convaleciente de escarlatina, todos por vía intravenosa, siempre con resultado negativo. Como objeción a la antigua opinión de que la enfermedad del suero se debe a la función antigénica de un suero de otra especie, es decir, de las proteínas contenidas en el mismo, podía aducirse también la

experiencia de que la enfermedad del suero también se provoca en algunos casos por la inyección de suero de la misma especie. Pero téngase en cuenta que, en tales casos, no se ha inyectado "suero normal humano", sino sueros de convalecientes, lo que no es lo mismo; además, R. W. CUMLEY y M. R. IRWIN (1943) habían establecido que entre los sueros de distintos hombres pueden existir diferencias apreciables serológicamente. Por último, puede aún deducirse que el suero de caballo, por ejemplo, el suero equino antitóxico para la difteria pierde, por efecto de fermentos proteolíticos, la capacidad de sensibilizar cobayos por vía activa o de desencadenar el choque anafiláctico en cobayos sensibilizados, y que la enfermedad del suero no se presenta nunca o casi nunca cuando se aplican sueros curativos purificados de este modo [patente de J. A. PARENTJEW, consúltese R. DOERR (1947 a, págs. 80 a 84)].

No existe, pues, ningún motivo para desechar la concepción original de la enfermedad del suero como un efecto patógeno de la reacción entre los antígenos proteicos de los sueros inyectados y los anticuerpos originados por ellos. Si no se trata solamente de una solución probable, sino de una aproximación óptima a la verdad objetiva, es forzoso buscar el hipotético "antígeno de la enfermedad del suero", como solución de un problema que exige respuesta tanto de la observación como de la experimentación. ¿Y qué decir a este respecto de la reacción de HANGANUTZIU-DEICHER? Si la enfermedad del suero o la inyección de un suero extraño sólo diera lugar a la aparición o exaltación de aglutininas para los hematíes de carnero, no pudiera pensarse en una dependencia directa. Pero, según el testimonio coincidente de todos los autores, no es esto lo que sucede, sino que se aglutinan hematíes de muy diversas especies, y entre ellos los que ya se aglutinan por el suero humano normal. El autor opina (especialmente considerando que parte de las aglutininas se encuentran ya en el suero normal) como más probable que exista una conexión indirecta tal vez *en el sentido de un estímulo inespecífico de las células productoras de globulinas o de una movilización del depósito existente de globulinas* (consúltese las consideraciones acerca de la fundamentación experimental de la reacción de anamnesis (página 67).

En apoyo de esta opinión puede aducirse la *enfermedad del suero padecida por el conejo*. Si a conejos blancos se inyecta una fuerte dosis de suero normal de caballo, en el 68,9 por 100 de los casos aparece, después de una incubación de tres a ocho días, un enrojeci-

miento e inflamación edematosa de las orejas. Esta reacción manifiesta siempre la misma localización, cualquiera que sea la especie del suero inyectado [M. S. FLEISHER y LLOYD JONES (1931)]. Si después de la primera inyección se administra una segunda, cuando el intervalo no es demasiado breve ni demasiado largo (de una extensión comprendida entre tres semanas y seis meses), aparecen reacciones aceleradas e inmediatas en un tanto por ciento mayor de casos; entre tres y cuatro meses y medio después de la primera inyección se observan aún solamente reacciones inmediatas [FLEISHER y JONES (1933 b)]. Se trata de las mismas circunstancias observadas por CL. VON PIRQUET y B. SCHICK en la enfermedad del suero humana. La enfermedad del suero del conejo, como la humana, puede provocarse también por otros sueros extraños, y, como en el hombre, la frecuencia de la aparición depende de la especie del suero, ocupando el primer lugar el suero de caballo y el segundo el de bovino, pero habiéndose obtenido también resultados positivos con los sueros de carnero y de cerdo [FLEISHER y JONES (1933 a)]. Resulta interesante que, aunque no tanto como en el hombre, en el conejo también se exalte el título de las aglutininas para los hematíes de carnero, que se eleva hasta 1 : 32 a 64; la elevación se inicia a los ocho días de inyectar el suero y alcanza un máximo a las tres semanas [H. A. KEMP y B. O. BAKER (1936 b)]. Resulta claro lo que esto significa si se considera que el hombre y el conejo no poseen antígeno de FORSSMAN y que en ambas especies el suero normal ya posee aglutininas para el carnero. Para completar, debe señalarse aún que el desengrasado del suero de caballo no alcanza a privarle de su capacidad de provocar la enfermedad del suero [JONES y FLEISHER (1936)], y que de las tres fracciones de suero de caballo obtenidas por precipitación con sulfato amónico (albúmina, euglobulina, seudoglobulina), la seudoglobulina es la que origina con mayor frecuencia y a menor dosis la enfermedad del suero del conejo, la euglobulina sólo la provoca a dosis mayores y la albúmina únicamente cuando preceda una primera inyección [JONES y FLEISHER (1934)]. Todas estas observaciones (en contra de la opinión de JONES y FLEISHER) señalan que los antígenos proteicos del suero son los causantes de la enfermedad; la escasa actividad antigénica de las seroalbúminas ha sido demostrada por los experimentos de concurrencia de R. DOERR y W. BERGER (1922).

M. W. SINCLAIR y J. W. THOMAS (1939), determinaron en un gran número de individuos alérgicos que en la época de la investigación estaban, en general, libres de síntomas, *el título de las aglutininas para los hematíes de carnero*, y compararon los resultados con los

obtenidos en personas no alérgicas. Se consideran de título bajo los sueros cuya reacción sólo se aprecie a una dilución máxima de 1:16, y de título elevado, a dilución máxima entre 1:32 y 1:128. La aglutinina (los autores la designan como "anticuerpo heterófilo", lo que, naturalmente, carece de justificación) se descubrió con mayor frecuencia en los individuos alérgicos. Sin embargo, en una segunda serie, en que se tomó la sangre de los alérgicos exclusivamente cuando manifestaban los fenómenos de su enfermedad, no sólo se observaron los títulos altos con menor frecuencia que en los alérgicos exentos de síntomas, sino con menos frecuencia que en los hombres no alérgicos. Estos datos, como se ve a simple vista, no permiten ninguna conclusión. El trabajo, sin embargo, no carece de importancia, porque el título de aglutininas encontrado, en promedio, es más alto que el observado por la mayoría de los otros autores, lo que SINCLAIR y THOMAS hacen notar y atribuyen a distintas circunstancias. Así, según SINCLAIR y THOMAS, la sangre de carnero se desfibrinó inmediatamente después de la sangría; los hematíes se lavaron también sin pérdida de tiempo y se aplicaron dentro de 24 horas y en ningún caso después de las 48, lo que recomiendan, además de utilizar siempre la sangre del mismo carnero, para conseguir resultados comparables. Además, se refieren también con detalle a las prescripciones de otros investigadores como A. C. RAVENSWAAY (1934), R. STRAUSS (1936), PAUL y BUNNELL (1932), debate en que se discute la importancia de la técnica para los resultados registrados en todo este campo de investigación. Aparte de las causas de error que pueden evitarse, juega también un importante papel la dificultad de establecer un límite entre los resultados positivos y negativos, y la apreciación subjetiva de las fases intermedias. También hay que decir que los sueros investigados se diluyeron según las potencias de dos, y que el título, en general, no se da en diluciones (doble, cuádruple, etcétera), sino que se significa por un número absoluto (2, 4, etc.); la diferencia entre 32 y 64 impresiona como grande, y no obstante no significa sino una dilución del suero al doble y, además, casi siempre en la zona de las diluciones bajas del suero (es decir, de las concentraciones altas de éste). A menudo resulta difícil formar juicio de lo expresado en la comunicación, y no sólo al leer la "discusión" o el "resumen", sino también al estudiar los protocolos de trabajo.

Se pisa un terreno algo más firme en las investigaciones acerca de las *aglutininas para hematíes de carnero que se encuentran en el suero de hombres que padecen una fiebre glandular (mononucleosis infecciosa)*, que fueron observadas por J. R. PAUL y W. W. BUNNELL.

(1932). Como no era posible una diagnosis etiológica de esta enfermedad infecciosa (lo que desde entonces, por lo demás, no ha cambiado), el interés de los clínicos se dirigió a la reacción serológica considerada como un auxiliar valioso para el diagnóstico, valor que con frecuencia se ha exagerado. Como en la reacción de WASSERMANN, en la de PAUL y BUNNELL se intentó en primer lugar conseguir la especificidad nosológica, es decir, la posibilidad de asegurarse de la veracidad de los resultados positivos y negativos [N. ROSENTHAL y G. WENCKEBACH (1933), H. FRIEDEMANN y BEER (1933), H. FRIEDEMANN (1933), R. BOVERI (1933), A. C. VAN RAVENSWAY (1934)]. La coronación de esta tarea se dificultó en las mononucleosis infecciosas porque la delimitación clínica entre la enfermedad y otras alteraciones linfocitarias provocadas por otros procesos patológicos dió lugar a grandes discusiones; diez años después de la publicación de PAUL y BUNNELL todavía apareció una comunicación de R. SOHIER (1942) en la que se propone una clasificación provisional de las linfadenitis asociadas a un aumento de los leucocitos mononucleares. Como en la reacción de WASSERMANN se llega a la conclusión de que la reacción de PAUL-BUNNELL es "característica, pero no específica de la mononucleosis infecciosa" [J. DAVIDSOHN (1937)]. Con este juicio, sin embargo, no está muy de acuerdo que existan casos de mononucleosis con reacciones negativas, y que la reacción pueda ser positiva sin que el cuadro de la enfermedad corresponda al tipo de la infección (1); DAVIDSOHN se inclina más bien a no admitir la especificidad, porque las aglutininas para los hematíes de carnero también exaltan su título en la enfermedad del suero o después de las inyecciones de suero de caballo. De hecho, en las primeras publicaciones se dice que la "prueba de HANGANUTZIU-DEICHER" da, en la mononucleosis infecciosa, resultados positivos, y en la quinta edición del manual de medicina interna editado por SPRINGER (1942, tomo II, página 323) sigue figurando esta formulación errónea como demostrada.

El suero de los enfermos que sufren de mononucleosis infecciosa contiene un anticuerpo "heterófilo" que aglutina los hematíes de caballo, cabra, carnero y vaca. Este anticuerpo no puede adsorberse a hematíes de conejo; *en cambio, las aglutininas para hematíes de carnero y de caballo de tales sueros se fijan por los hematíes de bovino.*

(1) De hecho se han observado reacciones negativas en mononucleosis de características clínicas muy acusadas y reacciones positivas que conducen a error [FR. WOLF (1937), E. GLANZMANN y F. OTTENSOOSER (1935), W. W. BUNNELL (1933), ROSENTHAL y WINCKELBACH (1933), A. M. JOHANN (1941)].

Las aglutininas para los hematíes de carnero y caballo existentes en el suero de individuos normales o de personas inyectadas con suero de caballo ofrecen el comportamiento contrario [P. BEER (1936)] En otro lugar se ha expuesto también la opinión, que en un principio se consideró probable, de que los anticuerpos que actúan sobre los hematíes de carnero existentes en el suero de los enfermos de mononucleosis pudieran ser el anticuerpo de FORSSMAN; como han descubierto C. A. STUART, BURGESS, LAWSON y WELLMAN (1935) y C. A. STUART (1935), los anticuerpos de los enfermos de mononucleosis no se fijan a los riñones de cobayo, mientras que los anticuerpos obtenidos por inmunización de conejos con riñones de cobayo pueden saturarse fácilmente y por completo. En la misma época se expusieron dudas acerca de la identidad de los anticuerpos de FORSSMAN y de la mononucleosis (G. H. BAYLEY y S. RAFFEL (1935) y J. DAVIDSOHN y PHOEBE H. WALKER (1935); pero señalaron que ambos anticuerpos se adsorbían a los riñones de caballo, y, como tales riñones contienen abundante antígeno de FORSSMAN, había que dirigirse hacia otros caracteres diferenciales. Esto se consiguió al demostrar que el anticuerpo de la mononucleosis difiere del de FORSSMAN en que no reacciona con los extractos alcohólicos de los hematíes de carnero y vaca, es decir, que el antígeno correspondiente no es soluble en alcohol [C. A. STUART, A. M. GRIFFIN, MACDONALD FULTON y E. G. E. ANDERSON (1936)]. Además, BAILEY y RAFFEL (1935), en el suero de tres enfermos de mononucleosis encontraron, además de las aglutininas, lisinas para los hematíes de vaca, y STUART, GRIFFIN, WHEELER y BATTEY (1936) confirmaron estos datos en otros 22 casos y completaron la observación con el dato de que el título de lisinas oscila entre 1:1280 y 1:20480, siendo más elevado que los títulos de las hemolisinas para el carnero. Como BAILEY y RAFFEL, también STUART y colaboradores observaron que los hematíes de vaca crudos y cocidos o tratados con alcohol adsorben el anticuerpo de la mononucleosis, pero que éste no reacciona con el extracto alcohólico de los hematíes de vaca. *En los hematíes de vaca, por consiguiente, existe un antígeno termoestable, resistente frente a la acción del alcohol, insoluble en alcohol y que reacciona con el anticuerpo de la mononucleosis que se designa con el símbolo BT (beef thermostabil).* Los criterios aducidos, sin embargo, no resultan específicos, en sentido etiológico, para el antígeno de la mononucleosis porque pueden encontrarse en el organismo de animales normales sustancias que los posean. STUART, GRIFFIN WHEELER y BATTEY (1936) resumen en la tabla 13 lo descubierto con base firme.

Como se deduce de la tabla 13, los anticuerpos de la mononucleosis pueden formarse en el hombre y conservarse en él, debido a que el hombre no posee nada de antígeno BT.

TABLA 13

Distribución del antígeno BT en algunas especies animales.

	Hemáticas.	Suero.	Tejidos.
Vaca.....	+	+	-
Oveja.....	+	+	-
Caballo ..	+(1)	+	+
Conejo ...	-	+	-
Cobayo...	-	-	-
Hombre ..	-	-	-

STUART, WELCH, CUNNINGHAM y WEBER (1936), y STUART, FULTON, ASH y GREGORY (1936), para poner de manifiesto las diferencias existentes entre los tres tipos de aglutininas para el carnero, han reunido en tablas las reacciones de absorción de las aglutininas para el carnero existentes, 1, en sueros de mononucleosos; 2, en sueros

de pacientes de la enfermedad del suero y de personas a las que se inyectó suero de caballo, y 3, en suero humano normal. En la tabla 14 se reproduce la tabla de STUART, FULTON y colaboradores (obra citada, pág. 67), en forma algo simplificada. Los primeros números (fuera de los paréntesis) dan el título de las aglutininas, y los encerrados entre paréntesis, los de las hemolisinas para el carnero.

De estos resultados, STUART y colaboradores deducen, en primer lugar, que la aglutinina para el carnero existente en el suero humano normal parece ser un anticuerpo de FORSSMAN porque se adsorbe por completo, o casi por completo, riñones de cobayo, y en segundo lugar, que las aglutininas existentes en el suero de los mononucleosos y en los enfermos de la enfermedad del suero difieren entre sí y de las aglutininas normales. Si fueran ciertas estas conclusiones, las aglutininas para el carnero que aparecen en la mononucleosis o en la enfermedad del suero no podrían considerarse como una simple exaltación de la producción normal de aglutininas para el carnero, sino que debería admitirse que se forman aglutininas de otra especie que nada tienen en común con la normal a pesar de su efecto idéntico sobre los hematíes de carnero. Considerando esta suposición, parece posible separar la aglutinina patológica por la adsorción selectiva de los sueros a hematíes de bovino y descubrir la aglutinina normal residual por su adsorción a riñones de cobayo. STUART, FULTON.

(1) Los hematíes de caballo adsorben sólo de modo incompleto la hemolisina para la sangre de bóvido del suero de los mononucleosos.

TABLA 14

Adsorción de las aglutininas de carnero y de las hemolisinas de carnero a hemáties de bovino, a hemáties de conejo y a riñones de cobayo.

Especie de suero.	Valor medio antes y después de la adsorción.	Adsorbido		
		Hemáties de bovino.	Hemáties de conejo.	Riñones de cobayo.
Humano normal....	antes	40 (220)	60 (220)	50 (200) 75 (320)
	después	80 (170)	45 (110)	0 (0) 10 (10)
Mononucleosis infecciosa.....	antes	3800 (5700)	3800 (5700)	3800 (7500)
	después	5 (70)	2200 (2600)	2200 (2000)
Enfermedad del suero.	antes	1600 (7400)	1600 (7400)	1600 (7400)
	después	5 (2200)	5 (200)	0 (0)

ASH y GREGORY (1936) afirman que han conseguido efectuar esta separación de las aglutininas normales y patológicas en el suero de los mononucleosos. No ha llegado a mi conocimiento que se haya efectuado este experimento con enfermos de enfermedad del suero, y *a priori* no parece probable que la adsorción selectiva consiga, también en este caso, un resultado positivo indudable.

Si se examinan los datos de la tabla 14 se observa que entre la aglutinina de los mononucleosos, por una parte, y la de los otros dos tipos de suero, por la otra, existe una diferencia fundamental, ya que la primera *no* se adsorbe a los riñones de cobayo que contienen el antígeno de FORSSMAN y, en cambio, las aglutininas existentes en el suero normal humano y en el suero de enfermos de enfermedad del suero poseen esta propiedad en *igual grado*. Es cierto que estos anticuerpos pueden distinguirse entre sí por su diferente comportamiento con los hemáties de bovino y de conejo, pero únicamente cuando se emprenden los ensayos con auxilio de la reacción de aglutinación; en la prueba hemolítica desaparecen por completo las diferencias, y no porque la aglutinina sea "otro anticuerpo" (en el sentido de la serología clásica) que el amboceptor hemolítico, sino porque tanto para la aglutinación de los hemáties como para su "lisis" mediante anticuerpo + complemento, se requiere la cooperación de distintos factores. En favor de ello habla también el hecho de que *la diferencia entre la aglutinina normal y la aglutinina de la enfermedad del suero aparezca tanto en la adsorción a hemáties de vaca como en la adsor-*

ción a hematíes de conejo, y que en la prueba hemolítica desaparezca la diferencia en ambos tipos de hematíes (1). Por ello, mientras no se aduzcan contrapruebas exentas de objeción, el autor sostiene su concepción de que las aglutininas para los hematíes de carnero existentes en el suero de los pacientes de enfermedad del suero son idénticas a las existentes en el suero normal humano; es decir, que en el primer caso no se produce sino una exaltación puramente cuantitativa de la producción del anticuerpo natural (consúltese la pág. 144).

La posición especial de las aglutininas para los hematíes de carnero existentes en los sueros de mononucleosos, no sólo se descubre serológicamente de modo claro (no identidad con el anticuerpo de FORSSMAN), sino que se afirma al intentar establecer las propiedades físico-químicas del antígeno que reacciona con el anticuerpo existente en el suero de los mononucleosos. Aunque STUART y colaboradores consiguieron ya resultados satisfactorios (véase pág. 148), los trabajos de J. TOMCSIK y H. SCHWARZWEISS (1947) han permitido un nuevo progreso.

Estos autores utilizaron los *estromas* de los hematíes de carnero, en los que pudieron demostrar la presencia tanto del antígeno de FORSSMAN como del antígeno de la mononucleosis. Se consiguió una separación parcial de ambos antígenos por la extracción de los estromas con NaOH, n/30 a 37° durante una hora; por este tratamiento el antígeno de la mononucleosis se separó de los estromas, mientras que el residuo de los estromas extraídos seguía conteniendo el antígeno de FORSSMAN. Como ya habían señalado STUART y colaboradores (véase pág. 148), puede lograrse una separación completa mediante alcohol (o piridina a 65°); el antígeno de FORSSMAN se disuelve, mientras que el de la mononucleosis queda en los estromas. Los estromas de los hematíes de bovino contienen el antígeno de la mononucleosis en concentración considerablemente más elevada que los estromas de los hematíes de carnero, y por ello (una vez libres del antígeno de FORSSMAN) resultan más apropiados que éstos para aislar dicha sustancia.

Con esta separación sustancial entre el antígeno de FORSSMAN y el antígeno de la mononucleosis, sin embargo, no se resuelve el pro-

(1) El anticuerpo del suero de los mononucleosos en la adsorción a hematíes de bovino, ofrece el mismo comportamiento con independencia de que se determine el título de aglutininas o el de amboceptores hemolíticos (véase tabla 14); lo que, naturalmente, resulta importante para enjuiciar los datos anteriores.

blema de la reacción de PAUL y BUNNELL, ni desde el punto de vista serológico ni desde el etiológico.

Desde el punto de vista serológico hay que considerar el hecho de que en el suero de los enfermos de mononucleosis no sólo se observa un aumento de las aglutininas para los hematíes de carnero, sino que (como sucede en el suero de los enfermos de enfermedad del suero) se aprecia una exaltación considerable del contenido de otras aglutininas, en especial de las aglutininas para los hematíes de caballo y cabra y además del de las lisinas para los hematíes de bovino. [P. BEER (1936)]. La reacción serológica en la mononucleosis infecciosa es por tanto poliespecífica y no monoespecífica, o, como expresan R. SOHIER, CH. JAULMÉS y M. TISSIER (1945), aparecen reacciones "paraespecíficas". Además, el antígeno de la mononucleosis, según las investigaciones antes expuestas, es una sustancia estable a ebullición que puede descubrirse en los hematíes de bovino; los hematíes de bovino, calentados a 100°, siguen absorbiendo la aglutinina para los hematíes de carnero existentes en los sueros de enfermos de mononucleosis, reacción decisiva para el diagnóstico de la mononucleosis. Pero si a unas personas se les inyecta, por vía subcutánea o intramuscular, hematíes de bovino hervidos no producen aglutininas para los hematíes de carnero, ni aunque previamente hubieran sufrido de mononucleosis y en el curso de tal enfermedad hubieran producido estos anticuerpos. Podía atribuirse el hecho a que la calefacción transforma el antígeno natural en hapteno. Sin embargo, esta suposición está en contradicción con que los conejos reaccionen ante la inyección peritoneal o intravenosa de hematíes de bovino hervidos con la producción de una hemaglutinina para los hematíes de carnero que presenta todas las propiedades del anticuerpo del mismo nombre existente en el suero de los enfermos de mononucleosis, del que sin embargo difiere en que no se adsorbe a cualquier muestra de hematíes de bovino hervidos, sino únicamente a unas determinadas "muestras privilegiadas". R. SOHIER y M. TISSIER (1946), que probaron a este respecto 87 muestras de hematíes de bovino, resumieron sus resultados en las siguientes afirmaciones: 1, el 2,3 por 100 de los hematíes de bovino poseen la capacidad de, una vez hervidos, comportarse con el anticuerpo de la mononucleosis de modo semejante a las aglutininas para los hematíes de carnero, de conejo; 2, el 4,6 por 100 adsorben estas aglutininas del suero de conejo, pero no son capaces de producirlas ("forma hapténica"), y 3, el 93,1 por 100 no poseen ni la capacidad de formar los anticuerpos ni la de combinarse con ellos de modo específico. La objeción de que no se trate de dife-

rencias entre los hematíes de bovino, sino de diferencias individuales de los conejos, no puede sostenerse considerando los puntos 2 y 3; además debe tenerse también en cuenta que el cobayo se comporta del mismo modo que el conejo [SOHIER y TISSIER (1946, pág. 225)].

Si en las consideraciones anteriores se habla repetidamente de un "antígeno de la mononucleosis", no se trata sino de una expresión abreviada, cómoda. Hasta ahora sólo puede decirse que se trata de un antígeno que participa en una reacción con el suero de los pacientes de mononucleosis, pero no (al menos hasta la fecha) de una reacción entre el "antígeno productor" con el anticuerpo con él producido. La causa de que en el suero de los mononucleosos aparezca un anticuerpo que encuentra en los hematíes de carnero y de bovino un antígeno capaz de reaccionar con él, resulta tan poco clara como el hecho de que el suero de un luético reaccione con extractos alcohólicos de corazón de vaca, dando floculados y fijando el complemento. En lo que respecta a la etiología, no se sabe más sino que la mononucleosis es una enfermedad infecciosa que puede transmitirse al *Macacus rhesus*, mediante la sangre o mediante triturados de los ganglios linfáticos de hombres enfermos [VAN DER BERGHE y P. LIESSENS (1939), P. J. WISING (1939), R. SOHIER, P. LÉPINE y V. SAUTTER (1940), STANNUS y FINDLAY (1939)]. La aglutinina para los hematíes de carnero existentes en el suero de los monos infectados no parece muy exaltada en comparación con la existente en el suero normal de estos monos, de modo que parece dudoso que pueda hablarse de que den una reacción positiva de PAUL-BUNNELL. Si se retransmite la sangre o los ganglios linfáticos de los monos inoculados al hombre, se provoca, sin embargo, una enfermedad típica [P. F. WISING (1939)], o una infección clínicamente latente que se descubre por una fuerte exaltación de la aglutinina para los hematíes de carnero característica (adsorbible a hematíes de bovino, pero no absorbible o sólo débilmente adsorbible a riñones de cobayo); en estos casos se observaron directamente elevaciones de título de 1:64 a 1:256 ó de 1:20 a 1:224 [WISING (1939), R. SOHIER, LÉPINE y SAUTTER (1940)]. Pero el agente causal de la mononucleosis infecciosa no ha podido descubrirse hasta la fecha, por lo que no pueden sacarse conclusiones firmes acerca del mecanismo de la reacción de PAUL-BUNNELL (1). El antígeno BT,

(1) Parece particularmente posible que el agente causal de la mononucleosis infecciosa sea un virus que, como casi todos los virus, den la reacción de HIRST; es decir, que aglutine una serie de hematíes heterogéneos.

que reacciona con las aglutininas para el carnero de los sueros de los enfermos de mononucleosis, no sólo se encuentra en los hematíes de carnero y de bovino, sino también en los hematíes, suero y tejido de caballo [BAILEY y RAFFEL (1935), DAVIDSOHN y WALKER (1935)], en el suero de conejo [STUART, GRIFFIN WHEELER y BATEY (1936)], en ciertos microbios, como el *Clostridium welchii* [BAILEY y RAFFEL (1935)] y especies de *Pasteurella* [R. SOHIER y M. TISSIER (1946)]; además, existe toda una casuística acerca de reacciones de WASSERMANN positivas "falsas" en la mononucleosis infecciosa [J. F. SARDUSK (1929)]. Simplificando en apariencia este embrollo serológico, SOHIER y TISSIER (1946, pág. 230) tomaron posición ante los anteriores resultados experimentales con las siguientes palabras: "Si consideramos nuestros resultados experimentales, todo sucede como si el agente patógeno de la mononucleosis, según el caso, hubiera movilizadado de modo directo o indirecto un cúmulo mayor o menor de anticuerpos dirigidos contra los antígenos termoestables de los hematíes de bovino hervidos y de los hematíes de carnero." Esta frase sólo posee carácter descriptivo y encierra en expresión comprimida las muchas dificultades que impiden una solución con unidad del problema ("según el caso", "directo o indirecto", "cúmulo de anticuerpos").

Si bien en general sucede que por el estudio de las circunstancias patológicas puede conseguirse una visión más profunda de los fenómenos que tienen lugar en el organismo sano, el rodeo por las reacciones de HANGANUTZIU-DEICHER y PAUL-BUNNELL no cumplen esta esperanza, sino que plantean nuevos problemas que esperan aún una aclaración satisfactoria. Particularmente, en lo que respecta a las aglutininas normales para los hematíes de carnero del suero normal humano, traídas por dichas reacciones al primer plano del interés científico, las cosas quedan en que consideremos este factor serológico como un anticuerpo de FORSSMAN, para lo que no tenemos sino una única prueba, a saber, que es absorbible por los riñones de cobayo. Ahora bien, no podemos decidir *a priori* si esta aglutinina para los hematíes de carnero, normal o natural, se ha producido de modo espontáneo por una causa fisiológica o a consecuencia de una inmunización criptogenética. Pero si admitimos la formación por inmunización, por una parte, no se explica por qué el título de esta aglutinina se mantiene siempre a un nivel bajo (comparable a las isoaglutininas del suero humano), y, por otra parte, habría que atribuir el mismo origen a todas las restantes heterohemaglutininas y heterohemolisinas del suero normal humano, lo que no permitiría fundamentar una posición excepcional para la aglutinina para el carnero.

Además, entre todos los anticuerpos del suero humano existe una determinada relación aún no aclarada. En la enfermedad del suero o después de inyectar sueros extraños, no sólo se exalta el título de la aglutinina para los hematíes de carnero, sino los restantes anticuerpos (incluso los que no se dirigen contra el antígeno de FORSSMAN, véase página 140). Se tiene la impresión de que el aparato productor de globulinas recibe un impulso en sentido inespecífico, serológicamente hablando (véase pág. 144). Las reacciones heterólogas apenas se han despegado de los sueros inmunes, y, en general, sólo se ha ensayado la reacción con el antígeno homólogo; de otro modo las experiencias serían más ricas. Pero hay otros argumentos que hablan en favor de la formación espontánea (endógena) de los anticuerpos naturales.

β) Los animales.

No aduciremos todos los datos descubiertos por la investigación serológica, especialmente en los dos primeros decenios de su desarrollo. El libro de D. BROCO-ROUSSEU y G. ROUSSEL *Le sérum normal* (1939) revisa las particularidades y facilita la consulta de los trabajos originales, por su exacta "bibliografía". Aquí se citará únicamente alguno que otro ejemplo notable.

K. LANDSTEINER y A. STURLI (1902) observan que el *suero normal de caballo* aglutina muy enérgicamente los hematíes de paloma, enérgicamente los de hombre, cobayo, conejo y ganso, y manifiestamente el de cerdo. P. RISSLING (1907) obtiene también resultados siempre positivos con los hematíes de hombre, cobayo, cerdo, paloma, ganso y pato; pero en cambio obtiene siempre resultados negativos con los de conejo; probablemente en este caso existen diferencias individuales porque H. LÜDKE (1906) pudo observar una aglutinación débil, pero que aparecía rápidamente, de los hematíes de conejo. *El suero normal de bovino* aglutina, según RISSLING, los hematíes de hombre, caballo, cerdo, conejo, cobayo, ganso, pato, gallina y paloma; el *suero normal de gallina*, los hematíes de hombre, caballo, cerdo, conejo, cobayo, ganso, pato, paloma. El suero normal de ciertas especies de tortuga puede aglutinar o disgregar los hematíes de diversos animales de sangre saliente [M. TAKENOUCI (1918 a)].

De estos y otros numerosos casos análogos se deduce que existe un gran número de diversas células contra las que pueden dirigirse los anticuerpos aglutinantes y hemolizantes de los sueros normales. Ya se trató por extenso en el capítulo dedicado a la "especificidad de los anticuerpos normales" (págs. 41-50), de si cada una de estas espe-

cies corresponde a un anticuerpo específico e independiente, o si en el suero normal sólo existen unas pocas aglutininas o lisinas que poseen una especificidad relativamente pequeña que las capacita para reaccionar con varias especies de células. En este lugar solamente consideraremos el siguiente hecho. Los anticuerpos obtenidos por inmunización también pueden ofrecer una especificidad sólo relativa, y por hiperinmunización efectuada con auxilio de un antígeno único, dotado de especificidad de especie, se consigue de modo parecido un campo de reactividad amplio, lo que parece justificar la opinión de que los antígenos proteicos, por ejemplo los de los sueros sanguíneos, poseen determinantes comunes a todos los mamíferos (la denominada especificidad de mamífero, consúltese R. DOERR, 1947 a, pág. 94); pero tales antisueros no se adaptan a las proteínas del suero de las aves o de los animales de sangre fría, como pudo confirmar F. A. SIMON (1941, 1942) con respecto a la sensibilidad de la piel de los individuos alérgicos frente a sueros de una especie extraña; las reacciones cutáneas de tales personas resultan positivas con los más diversos sueros de mamífero, y en cambio negativas con los de gallina o de rana. Con esta limitación de la especificidad a las clases del sistema natural de animales (mamíferos, aves, animales de sangre fría) no tienen, sin embargo, nada que ver las reacciones de los sueros normales con los hematíes de una especie extraña. Los ejemplos que antes se adujeron enseñan que un suero normal de mamífero puede aglutinar hematíes de otras especies de mamíferos, pero también de aves, y que, recíprocamente, el suero de aves puede también aglutinar los hematíes de mamífero, y el suero de tortuga, los hematíes de animales de sangre caliente. No se sabe qué es lo que distingue los hematíes aglutinables por un determinado suero normal de los no aglutinables. L. SCHWARMANN (1927) investigó el contenido de anticuerpos en el suero normal de rana y llegó a la conclusión de que para la aglutinación de los hematíes de diversas especies animales por el suero de rana *no existe ninguna regla*, y que no puede apreciarse ninguna diferencia sistemática frente al suero entre los hematíes de animales de sangre caliente y fría, de aves y de mamíferos, ni entre los hematíes de animales que contienen el antígeno de FORSSMAN y los de animales que carecen de él. Si consideramos ahora tales listas, viene, arbitrariamente, a nuestro recuerdo el efecto hemaglutinante de los virus, el denominado "ensayo de HIRST" [consúltese R. DOERR (1947 a, pág. 223)]; sin embargo, esta analogía quizá sea puramente externa. Con respecto a las heterohemaglutininas y a las heterohemolisinas del suero normal, parece inevitable la conclusión de que estos

anticuerpos no han podido producirse por inmunización. Si pudiéramos concebir, siguiendo a F. S. SIMON, que existen hombres especialmente dispuestos para reaccionar frente a la acción de un único "antígeno de mamífero" con la producción de un anticuerpo "específico de mamífero", no alcanzaría evidentemente esta suposición a explicar las reacciones de un suero normal con antígenos que proceden de mamíferos, aves y animales de sangre fría. Habría que admitir que son necesarios numerosos impulsos inmunizatorios diversos y que éstos se producen en animales que viven en las condiciones más diversas y que pueden elegirse de modo que hay que excluir todo posible contacto entre ellos. Por ello no resta sino admitir la *formación endógena (espontánea) de estos anticuerpos naturales*, que pudiera estar además condicionada filogenéticamente de uno u otro modo, que, sin embargo, no necesita ningún impulso exógeno específico producido durante el desarrollo ontogénico del individuo. Pero esta afirmación sólo expresa las conclusiones que parecen más probables en vista de los resultados de las investigaciones; apenas cabe esperar que sea posible encontrar una prueba concluyente de que no se ha producido —mejor dicho, de que no ha podido producirse— ningún contacto con los antígenos sobre los que actúan estos anticuerpos. Esta situación se modifica cuando exista una relación especial entre el antígeno y el anticuerpo natural, que permita afirmar que ha sido posible un contacto inmunizante: una relación de este tipo es la que existe entre el antígeno de los microbios infecciosos (bacterias) y la receptividad o no receptividad de la especie en que se haya demostrado la existencia de anticuerpos contra estos microbios. Con esto llegamos a uno de los más importantes capítulos de este campo tan ramificado: al de los anticuerpos naturales anti-bacterianos.

C. LOS ANTICUERPOS ANTIBACTERIANOS DE LOS SUEROS ANIMALES NORMALES.

Las investigaciones de E. BÜRGI (1907) merecen estudiarse en primer lugar no sólo por derecho de prioridad, sino también por los resultados obtenidos. BÜRGI investigó los efectos aglutinantes de los sueros normales de hombre, cobayo, conejo, carnero, cabra, caballo, vaca, perro, ganso y gallina sobre diversas especies bacterianas, vibriones del cólera, vibrión de METSCHNIKOFF, bacilos de la disentería, *Salmonella typhi* y *paratyphi B*, *Bact. coli*, *Proteus vulgaris*, bacilos del cólera aviar (*Past. aviseptica*), *Staphilococcus aureus*, y observó

que los sueros, según la intensidad de sus acciones aglutinantes, pueden ordenarse en una serie *que resulta válida para las más diversas especies bacterianas, siendo por consiguiente independiente de la especie de bacteria*. El suero que aglutina con más intensidad es el de bovino, y a continuación, en orden de capacidad aglutinante decreciente, los de caballo, cabra, carnero, gallina, ganso, perro, conejo, hombre y cobayo. Las bacterias "patógenas" inmunizan cuando infectan un huésped receptivo, siendo, en principio, de importancia secundaria que la infección transcurra latente o con manifestaciones patológicas. Según las investigaciones de BÜRGI resulta, sin embargo, completamente secundario que la bacteria aglutinante sea o no infecciosa para la especie animal por cuyo suero se aglutina, e incluso que pertenezca en sentido estricto, a las bacterias infecciosas; *es decir, lo decisivo para la aglutinación, no es la naturaleza parásita o saprofita del germen, sino la especie animal de que procede el suero*. El hombre en muchas comarcas está infectado en condiciones naturales por vibriones del cólera de modo manifiesto y con mayor frecuencia latente; en los países europeos (en los que BÜRGI llevó a cabo sus investigaciones) puede hacerse la misma afirmación con respecto a los bacilos tíficos, paratíficos B y de la disentería. Ahora bien, las acciones aglutinantes del suero humano normal para dichos gérmenes es mucho más débil que las de los sueros de vaca, caballo, cabra, carnero, ganso o gallina, animales no susceptibles a la infección por las bacterias citadas. Por ello no puede admitirse que la inmunización por contacto infeccioso sea la causa de la formación de las aglutininas para bacterias para las cuales es refractario el productor de las aglutininas. Ahora bien, sería ciertamente posible que el contacto inmunizante se produjera sin infección manifiesta o latente y proceda de bacterias que se encuentren en las mucosas de la parte superior del aparato respiratorio o en el tubo digestivo, donde pudieran demolerse y liberar productos antigénicos que se absorbieran.

En favor de esta posibilidad también pueden aducirse algunos argumentos experimentales. Por ejemplo, R. LOVELL (1934) encontró en los ganglios linfáticos mesentéricos de cerdos jóvenes bacterias del tipo coli, que inyectadas a conejos provocan la formación de aglutininas para diversas salmonelas; LOVELL pudo demostrar en el suero de cerdos normales la existencia de aglutininas para estos gérmenes, por lo que considera probable que estos anticuerpos procedan del estímulo antigénico de bacterias que se encuentren en el tejido normal o en el intestino. Análogamente una bacteria apatógena puede producir aglutininas contra las salmonelas de especies infecciosas con las que esté empa-

rentada inmunológicamente. Una observación análoga hizo M. S. INGALLS (1937). Este autor cultivó un enterococo ("E. I.") procedente del intestino de conejos normales que se aglutinaba con mayor frecuencia y con mayor intensidad por el suero de conejo que otras bacterias cultivadas procedentes también del intestino de conejo. Si el suero normal de conejo se adsorbía a este enterococo, descendía la acción aglutinante para los enterococos, pero también, simultáneamente, para los bacilos de la disentería de SHIGA. Además, la inmunización de conejos adultos con el enterococo exalta la formación de aglutininas para los bacilos SHIGA, cuyo título llega al nivel que alcanza en los conejos inmunizados directamente con los bacilos de SHIGA. y la adsorción a los enterococos de tales sueros inmunes obtenidos por inmunización con estos bacilos, no sólo elimina el anticuerpo homólogo, sino también la aglutinina de SHIGA. INGALLS atribuye estos resultados experimentales a que los enterococos y los bacilos de SHIGA contienen un grupo común (determinante) que probablemente provoca la aparición de aglutininas de SHIGA en el suero normal de conejos; en cuanto un juicio puede apoyarse en un ejemplo fortuito, la observación anterior explicaría la presencia de anticuerpos contra distintos microorganismos patógenos en el suero normal de conejo sin necesidad de postular en tales casos la existencia de infecciones subclínicas (latentes). Ya se han expuesto en otro lugar los experimentos de J. FORSSMAN (1946), que atribuye la formación de las hemolisinas para la sangre de oveja existentes en el suero normal de conejo a una sensibilización enteral por alimentos que contienen el antígeno que recibió su nombre (véase pág. 136).

Pero estos "ejemplos fortuitos", como INGALLS los designa, no justifican una generalización que resultaría arbitraria. No explican que la serie de BÜRGI, que ordena los sueros normales por el título de aglutininas, sea independiente de la especie de la bacteria aglutinable, ni que en esta escala correspondan los primeros lugares a la vaca y caballo y los últimos al hombre y al conejo, animal éste que es conocido por todo experimentador como particularmente apto para la producción de anticuerpos. La vaca y el caballo, cuyos sueros aglutinan los vibriones del cólera, en general no se pueden poner en contacto, fuera de la zona en que el cólera es endémico, a no ser en los establos de un instituto serológico.

Ahora bien, ¿son correctas las observaciones de BÜRGI? No puede dudarse de ello. H. J. GIBSON (1930) publicó veintitrés años después resultados de investigaciones propias que confirmaban en toda su extensión los de BÜRGI. Como su predecesor, GIBSON pudo ordenar

los sueros normales por la capacidad decreciente de aglutinación con independencia de la especie de la bacteria aglutinada en la siguiente serie: *bovino*, *caballo* (y cerdo), *oveja*, *hombre*, *gato*, *conejo*, *cobayo* y *rata*; en las posiciones que se marcan con letra cursiva, que también habían sido investigadas por BÜRGI, la serie coincide con la de este autor.

Si se comparan los títulos de aglutinación de los distintos sueros normales para distintos tipos de bacterias, se descubre una segunda ley ya conocida por BÜRGI y que GIBSON subraya. Ciertas bacterias, como los bacilos de la disentería, los *Proteus* y piociánicos, se aglutinan intensamente por todos los sueros normales, otros como las especies de *Salmonella*, el *Past. aviséptica*, muchas estirpes de *Coli*, se aglutinan más débilmente o no se aglutinan con sueros normales que posean escasas aglutininas (*hombre*, *cobayo*). Sin embargo, la serie de los sueros normales permanece la misma sin dejarse influir por la distinta aglutinabilidad de las bacterias testigo. Esta regularidad señala también que las aglutininas normales no deben producirse por un estímulo inmunizador, ya que las diferencias observadas no se aprecian si los animales se inmunizan con las citadas especies bacterianas.

En las bacterias flageladas se han descubierto dos antígenos distintos desde el punto de vista serológico y físico: el antígeno flagelar o H, termoestable, y el antígeno somático o antígeno O, termolábil, procedente del cuerpo bacteriano. W. A. TIMMERMAN (1930), H. J. GIBSON (1932) y R. LOVELL (1932, 1934) investigaron los sueros normales de diversos animales para observar si sus anticuerpos reflejaban la duplicidad de los antígenos de las bacterias flageladas. Esto es, efectivamente, lo que sucede. En los sueros normales se descubren tanto aglutininas H como aglutininas O, unas veces ambas en el mismo suero y otras aisladas (es decir, aglutinina O sin H o aglutinina H sin O). La existencia de un antígeno especial localizado en los órganos de movimiento parece reflejar la morfología y fisiología de las bacterias flageladas; por ello tales descubrimientos parece que hablan en favor del origen inmunizatorio de los anticuerpos bacterianos normales con más fuerza que otros argumentos experimentales; pero pierden su significación sugestiva cuando se entra en particularidades. TIMMERMAN encuentra aglutininas para el *Salm. typhi* en los sueros de *hombre*, *cobayo*, *conejo*, *caballo*, *oveja*, *cabra* y *búfalo*; el título relativo es el correspondiente a la escala de BÜRGI. La identificación de las aglutininas H y O señaló que en el *cobayo* no existe nunca la aglutinina H, y la aglutinina O sólo en 2 entre 20 animales. Los

sueros de conejo contienen en el 75 por 100 de los casos investigados aglutinina O, y sólo excepcionalmente aglutinina H; los 14 caballos estudiados poseían todos aglutinina O, y 5, además, aglutinina H. En las cabras, ovejas y búfalos casi siempre podían descubrirse ambas aglutininas, y en la serie del búfalo ambas poseían el mismo título. De 16 hombres que no habían sufrido la fiebre tifoidea ni estaban vacunados contra ella, 5 no poseían ninguna de las dos aglutininas, 4 sólo la O, 2 la H y 5 ambas. Como TIMMERMAN señala, los resultados concuerdan con la escala de BÜRGI sólo si se considera la aparición de las aglutininas contra el bacilo tífico en conjunto. Pero si se considera por separado la distribución de las aglutininas H y O, no queda duda de que la aglutinina H rara vez aparece o falta siempre en los últimos miembros de la serie (conejo, cobayo), y que la máxima frecuencia de su aparición se alcanza en los bóvidos (búfalos). A lo anterior debe añadirse que GIBSON (1932) y R. LOVELL (1934), en el suero normal de diferentes animales, pudieron descubrir aglutininas O y H que actúan sobre otras bacterias flageladas patógenas y apatógenas (*V. cholerae*, *Salm. paratyphi A* y *B*, *Salm. cholerae suis*, *Salm. newport*, *Salm. enteritidis* Gärtner, *Proteus X₁₀*, *Pyocyaneus*), de lo que se deduce claramente que la existencia de aglutininas H no permiten afirmar que estos anticuerpos se hayan producido mediante un estímulo antigénico específico.

Pueden añadirse los siguientes datos elegidos de otros resultados experimentales aún no mencionados:

R. LOVELL (1934) pudo demostrar que el contenido de aglutininas contra las especies de *Salmonella* en los sueros normales de cerdo y bovino aumenta con la edad de los animales, o, formulado con más precisión, ya que no se prosiguió la investigación utilizando siempre un mismo animal, que en los cerdos o reses viejos es más frecuente encontrar títulos altos. Lo anterior da, naturalmente, la impresión de que la producción de anticuerpos se exalta a consecuencia de estímulos antigénicos permanentes o repetidos. Sin embargo, en los bovinos es manifiesto que con la edad crece la frecuencia con que aparecen aglutininas H de título alto, lo que no resulta comprensible porque en estos casos parece que la formación de anticuerpos sólo podría deberse a estímulos antigénicos exógenos. El fenómeno observado por LOVELL en las aglutininas para las *Salmonella* de cerdo y de vaca ya se ha descrito al hablar de las isoaglutininas del hombre, en donde no parece posible admitir una estimulación provocada por un estímulo antigénico sostenido o intermitente.

En el suero de diversas especies de tortugas (especies de los gé-

neros *Chysemis*, *Chelydra*, *Melacoclemmys*) se descubren aglutininas para los *Salm. typhi*, *Salm. paratyphi A* y *B*, bacilos de la disentería, estafilococos, *Pyocyanus* y *B. coli*, cuyo título en general es bajo, pero que en algunos casos, especialmente en la *Chelydra serpentina*, alcanza valores que son raros en las aglutininas normales de los mamíferos [M. TAKENOUCI (1918 b)]. Todas las combinaciones que puedan imaginarse para eludir la formación de anticuerpos sin estímulo antigénico parecen fracasar en este caso.

TAKENOUCI (1918 c) observa además que los sueros normales de diferentes animales de sangre caliente y de sangre fría paralizan *in vitro* los infusorios (*Paramaecium*, *Colpoda*) a los que aglutinan y finalmente disgregan, siendo estas acciones idénticas a las modificaciones morfológicas y fisiológicas provocadas por los sueros inmunes de conejos tratados con infusorios. El título de los sueros normales es mucho más bajo que el de los inmunes, pero la actividad paralizante y citotóxica se ha confirmado por varios autores [W. SCHUCKMANN (1920), M. MASUGI (1927/28), M. E. ELMORE (1928), CH. TANZER (1941)]. Si los sueros normales se inactivan calentándolos a 56°, siguen produciendo perturbaciones de la movilidad, pero únicamente transitorias. No ha podido decidirse hasta la fecha si la actividad, más enérgica de los sueros normales frescos (particularmente su efecto citolítico) se debe a la acción conjunta de un anticuerpo termoestable (específico) y el complemento termolábil inespecífico; según TAKENOUCI, los sueros normales de animales de sangre caliente inactivados se reactivan mediante complemento de cobayo, mientras que los sueros de animales de sangre fría inactivados no pueden completarse con suero fresco de cobayo ni con suero fresco de rana (consúltese pág. 47).

En la conocida obra *Principles of Bacteriology and Immunity* [TOPLEY y WILSON, 3. E. rev. by G. S. WILSON y A. A. MILES (1946)], se discute todo el complejo problema de los anticuerpos naturales en una forma que destaca por la claridad de exposición y la consideración científica de hechos y opiniones. En el capítulo que trata del origen de los anticuerpos antibacterianos naturales se llega a la conclusión (véase pág. 1095) que traducimos: "Debemos, por consiguiente, llegar a la conclusión de que los anticuerpos antibacterianos que existen en condiciones naturales y quizás también las antitoxinas naturales, pueden deber su formación a uno de los cuatro mecanismos siguientes: una infección efectiva ("actual infection") con la bacteria correspondiente; una infección con otro organismo que posea un componente antigénico común; la penetración de un pro-

ducto antigénico no vivo a través del tubo digestivo, y posiblemente también por otras vías, que desencadene la producción de un anticuerpo en posesión del grupo activo observado; o la formación de tales anticuerpos como productos secundarios del funcionamiento normal del aparato productor de anticuerpos con completa independencia de todo estímulo específico exógeno ("external")."

El hecho de que de los cuatro mecanismos posibles de la formación de los anticuerpos que se descubran en los sueros "normales", se enumere en último lugar la producción independiente de todo estímulo exógeno, indica la tendencia de no recurrir a esta posibilidad, sino cuando ha sido necesario apartar todas las combinaciones que implican la participación de un estímulo antigénico específico. Se diga explícitamente o no, esta tendencia debe referirse a la época de la investigación en la inmunidad en que el anticuerpo se consideraba como una misteriosa sustancia del suero, de cuya naturaleza química no era posible formar ninguna opinión y que no se consideraba sino genéticamente, es decir, como un producto de reacción formado por el organismo a consecuencia de la reacción de un antígeno; para esta concepción la existencia de anticuerpos aparecidos en el suero sin previo impulso antigénico y que, a la vez, reaccionen específicamente con antígenos disueltos o celulares repugna como una contradicción; por decirlo así, se tropieza con que *ex nihilo nil fit*. Pero si se sigue la teoría dominante que considera los anticuerpos como seroglobulinas que se comportan como las globulinas y normales por su velocidad de transporte electroforético, y sólo difieren de ellas por configuraciones condicionadas por la afinidad con respecto a determinadas sustancias, la noción de un anticuerpo formado sin estímulo antigénico pierde su carácter de absurdo. Pero evidentemente, desde el punto de vista de un análisis racional de los fenómenos naturales, nada puede objetarse contra la comprobación sistemática de las posibilidades de que se hayan formado por inmunización los anticuerpos existentes en un suero normal. Prescindiendo de prevenciones y teniendo en cuenta estas suposiciones críticas, se llega, con el apoyo de los trabajos de BÜRGI, GIBSON y otros, a la conclusión de que la producción "*exenta de antígeno*" es, con gran diferencia, el caso más frecuente.

Esta convicción no sólo se refuerza por el gran número y diferencia de las bacterias sobre la que un suero normal puede actuar de modo bactericida, sino también por la falta de finalidad que esta capacidad bactericida ofrece para la especie de que procede el suero. No sólo no es posible que las vacas de nuestras comarcas se pongan en

contacto con vibriones del cólera, sino también resulta incomprensible (en especial para los inmovibles defensores de la teoría de que la infección es una lucha entre el germen infectante y su huésped) las ventajas de que disfruta la vaca por el efecto letal de su suero sobre los vibriones del cólera. La acción bactericida del suero humano normal sobre los gonococos es débil o nula en comparación con la de los sueros de cobayo y conejo [J. GORDON y K. I. JOHNSTONE (1940), Y. B. ARDOOSH (1936)], justamente lo contrario que lo que cabría esperar tanto desde el punto de vista genético, como desde el de la "defensa". Los ejemplos de este tipo pueden aducirse en el número que se quiera, ya que verdaderamente constituyen la regla.

Muy otro es el comportamiento de los anticuerpos microbicidas que aparecen a consecuencia de una infección inmunizante. Como el paradigma más instructivo y mejor estudiado puede aducirse el caso de los anticuerpos contra el sarampión; el agente causal contra el que se dirigen no es una bacteria, sino el virus; pero ello no tiene importancia para la cuestión que aquí se discute. Cuando un hombre sufre el sarampión, queda inmune durante toda su vida frente a una nueva infección. Esta inmunidad es humoral, ya que es sabido que un individuo que aún no ha padecido la enfermedad puede protegerse de la misma por la administración de suero de convaleciente, resultando indiferente administrar el suero antes de producido el contagio o en el primer período de la incubación de la enfermedad. El hombre que padeció el sarampión permanece refractario durante toda su vida frente a la reinfección, por lo que, en su suero, deben existir de modo permanente anticuerpos en concentración suficiente; esto es lo que efectivamente sucede, ya que la protección contra la enfermedad se logra no sólo con suero de convaleciente, sino con suero de adultos que hayan sufrido la enfermedad anteriormente, sin que influya el tiempo transcurrido, siempre que la dosis se eleve aproximadamente al doble. Por fraccionamiento de mezclas de sueros de adultos sanos y concentración de una determinada fracción de las globulinas γ se han conseguido preparados que, administrados a dosis de 0,1 ml. por kg. de peso (en inyección intramuscular), protegen la mayoría de los niños vacunados (el 71 por 100) contra el sarampión hasta cinco días después de producido el contagio; y si se administra en dosis menores, se suaviza considerablemente el curso de la enfermedad [J. STOKES, E. P. MARIS, S. S. GELLIS (1944), C. W. ORDMAN, C. G. JENNINGS y C. A. JANEWAY (1944)]. Se ha atribuido la persistencia de los anticuerpos virulicidas contra el sarampión a que el hombre, en las comarcas en que la enfermedad es endémica, experimenta repetidas infec-

ciones que, por haber sufrido la enfermedad en la infancia, transcurren latentes, pero que desencadenan nuevamente la producción de anticuerpos. Sin embargo, esa explicación es poco probable, porque obliga a suponer que las reinfecciones habrían de sucederse tan próximas que no hubiera ningún período libre de anticuerpos, y el hombre que ha sufrido del sarampión en la infancia en ningún momento posterior de su vida resulta receptivo para la manifestación patógena de la infección ni total ni parcialmente. La "persistencia" durante toda la vida de los anticuerpos en el suero de los individuos que padecieron el sarampión debe atribuirse más bien a que en el metabolismo proteico las globulinas inmunes consumidas se renuevan permanentemente por otras de nueva formación, es decir, que una vez desencadenado el proceso de la producción de anticuerpos no cesa más, sino que prosigue durante toda la vida, aunque en grado algo disminuido [R. DOERR (1947 a, págs. 43 y siguientes)]. Pueden aducirse pruebas epidemiológicas. Si en un grupo de población aislado desaparece durante largo tiempo el sarampión, faltan las posibilidades para las hipotéticas reinfecciones latentes a las que atribuir la renovación de los impulsos para la producción de anticuerpos; pero si vuelve a introducirse la enfermedad en la comarca, se libran de ella los individuos que previamente hubieran sufrido la enfermedad, por lo que parece justificado sostener que persisten los anticuerpos virulicidas contra el sarampión cuando se desencadena su producción en virtud de un único impulso antigénico, renovándose permanentemente los anticuerpos agotados. Esto es, por ejemplo, lo que, efectivamente, sucedió al reaparecer el sarampión en las islas Färøer, cuya población desconocía la enfermedad desde 1781 a 1846 (PANUM); los anticuerpos se conservaban en el suero de los individuos vacunados contra el sarampión en 1781, es decir, sesenta y cinco años antes. Sin embargo, no se ha demostrado que, efectivamente, sea el contenido de anticuerpos lo que protege, durante tanto tiempo, a los hombres infectados frente a una nueva aparición de la enfermedad; pero esta laguna puede llenarse por lo observado en otra enfermedad por virus, a saber, en la fiebre amarilla: se ha demostrado que en el suero de personas que habían padecido la enfermedad entre treinta y setenta y ocho años antes y que habían vivido durante todo este tiempo fuera de comarcas en que la infección sea endémica, continúan conservando anticuerpos neutralizantes del virus [J. BAUER y N. HUDSON (1930), E. A. SAWYER (1931), F. L. SOPER y DE ANDRADE (1933)]. No existen anticuerpos naturales contra el sarampión, es decir, anticuerpos producidos de modo espontáneo sin estímulo antigénico, ya que

él hombre que no ha sufrido la enfermedad resulta receptivo para ella, cualquiera que sea su edad. Los hechos de que los lactantes alimentados a pecho gocen de una resistencia temporal contra el sarampión [K. FRIEDJUNG (1919)] y que el sarampión sea relativamente raro, según distintas estadísticas, durante los cinco primeros meses de la vida, se explican porque los anticuerpos de la madre producidos por inmunización pasan al niño bien por vía placentaria durante la vida intrauterina o después del nacimiento por el calostro rico en globulinas [J. L. LEWIS y H. G. WELLS (1922)]: como los anticuerpos administrados por vía pasiva, una vez demolidos, no se sustituyen, es natural que el estado refractario (por lo demás, tampoco general, sino limitado a algunos niños) vaya sustituyéndose por la receptividad común a todos los hombres, característica de su especie. No existen datos acerca de la existencia de anticuerpos contra el sarampión en sueros normales de animales, ni han podido confirmarse algunas comunicaciones antiguas, según las cuales el suero de cabras o de caballos inmunizados con sustancias bacterianas protegen contra el sarampión. Con la seguridad que puede alcanzarse en estos problemas puede afirmarse que el anticuerpo contra el sarampión es una globulina inmune que se produce exclusivamente por la reacción frente al antígeno correspondiente.

Sin embargo, en la mayoría de los casos es difícil decidir si un anticuerpo que se observa en un individuo sano mucho después o mediando un período indeterminado de un acontecimiento inmunizante (infección, vacunación), es adquirido o se debe a causas endógenas. J. F. ENDERS (1944) y colaboradores pudieron demostrar en concentrados de globulina y obtenidos de mezclas del plasma sanguíneo de adultos, unos 20 anticuerpos distintos, entre ellos contra los virus del sarampión, paperas, vacuna, gripe (A), poliomiélitis, coriomeningitis linfocitaria, hepatitis epidémica, herpes simple, contra el Pertussis, contra las toxinas diftérica y estreptocócica, contra el antígeno H del bacilo tífico y otros. Como las muestras de plasma no se investigaron por separado, sino en la mezcla, no puede afirmarse, naturalmente, si todo el cúmulo de anticuerpos existía en el suero de cada donante o si algunas personas habían suministrado el contenido de anticuerpos de la mezcla de plasma. Hay que observar que en la lista anterior están representadas una serie de infecciones por virus relativamente raras, como son la poliomiélitis, la coriomeningitis linfocitaria y la hepatitis epidémica; no parece probable que entre los donantes de la mezcla de plasmas se encuentren siempre individuos que hayan padecido las infecciones designadas, aun prescindien-

do de que un único plasma que contenga anticuerpos debe diluirse considerablemente con las restantes muestras carentes de él, de modo que la concentración de anticuerpos en la mezcla debiera quedar por debajo del umbral perceptible.

El "Blood Substitutes Sub-Committee of the National Research Council" americano se ha propuesto la tarea de investigar las fracciones obtenidas de una mezcla de plasmas de adultos, con el fin de estudiar su aplicación terapéutica en medicina humana. Para ello, investigaron los concentrados de globulina y obtenidos de esta mezcla de plasmas, en lo que respecta a su contenido de anticuerpos frente a infecciones humanas; sorprende el número de descubrimientos positivos. El hecho de que la mezcla de sueros de hombres sanos ofrezca un número tan alto de anticuerpos contra microbios patógenos para el hombre y frente a venenos bacterianos, no permite, sin embargo, sacar la conclusión de que estos anticuerpos se hayan producido de modo exclusivo o predominante por un estímulo inmunizante, es decir, que deban su formación a una enfermedad previa, o, lo que es más improbable, a infecciones latentes. La conclusión no parece justa; en primer lugar, porque estas investigaciones, como ya se ha dicho, se orientaron exclusivamente en un sentido, hacia la investigación de anticuerpos contra sustancias infecciosas patógenas para el hombre, sin tener en cuenta la posibilidad de que en el suero humano pudieran existir anticuerpos contra agentes patógenos de animales; en segundo lugar, porque no se conocía la historia de los donantes de los sueros; en tercer lugar, porque no todos los anticuerpos producidos por inmunización se mantienen durante largo tiempo en la sangre, de modo que, pasado un periodo de no importa qué duración, parece que no podrían descubrirse al investigar la sangre de adultos sanos, incluso teniendo en cuenta que el producto analizado era la mezcla de las muestras de plasma proporcionadas por distintos donantes; y en cuarto lugar, porque, en algunos casos, en mezclas de plasmas se ha podido demostrar la existencia de anticuerpos en el suero de especies animales no receptivas [ENDERS (1944), E. J. COHN, ONCLEY, STRONG, HUGUES y ARMSTRONG (1944), J. STOKES y NEEFE (1945)].

Por ejemplo, los anticuerpos que neutralizan el virus de la poliomielitis se han observado en el suero de yeguas preñadas [C. W. JUNGBLUT (1935-36), JUNGBLUT, K. MEYER y ENGLE (1934)], y además en los sueros normales de monos *Cebus* y *Rhesus* (1)

(1) Como es sabido, los monos *Rhesus* pueden infectarse experimentalmente

[JUNGBLUT y ENGLE (1931-32), F. D. STIMPER y J. F. KESSEL (1939)]: Por ello, si en los sueros de hombres que nunca habían experimentado síntomas de poliomielitis presentan anticuerpos con frecuencia igual e incluso superior a la frecuencia con que aparecen en los sueros de convalecientes de la enfermedad típica y abortada [S. D. KRAMER y M. L. AYCOCK (1931/32), P. H. HARMON y H. N. HARKINS (1936)], y si tales anticuerpos se encuentran en la mezcla de sueros de no importa qué adultos sanos, no debe pensarse que tales observaciones signifiquen algo distinto de la existencia de anticuerpos bactericidas contra los vibriones del cólera en los sueros normales de vaca y caballo o la de anticuerpos bactericidas contra los gonococos en el suero de cobayo. F. M. BURNET (1940) y F. W. JACKSON (1937), fundándose en investigaciones efectuadas con métodos perfeccionados [véase también BURNET, JACKSON y ROBERTSON (1939)], han llegado a la conclusión indudable de que el anticuerpo neutralizante del virus de la poliomielitis que existe en el suero normal humano no ha podido producirse a consecuencia de una infección ni por simple contacto, y que por ello no puede ser la expresión serológica de una epidemia latente.

E. J. COHN (1945) pretende que deben obtenerse concentrados de globulina y a partir de mezcla de sueros de adultos normales sanos y estudiar su posible acción terapéutica en todas las enfermedades que proporcionen una firme inmunidad post-infecciosa y reservar

e incluso existen observaciones [H. A. HOWE y J. CRAIGIE (1943)] de las que parece deducirse que los monos de esta especie pudieran enfermar en el laboratorio de poliomielitis sin una infección provocada o sufrir una infección latente. Sin embargo, H. A. HOWE y D. BODIAN (1945), que investigaron estos casos profundamente, manifiestan explícitamente que no podía excluirse la posibilidad de que tales animales se hubieran empleado en experiencias en otros laboratorios: como, además, tampoco se descubrió el virus en las heces de los monos ni, por los métodos usuales, en el sistema nervioso central, HOWE y BODIAN consideran poco probable que la infección en el laboratorio pueda transmitirse fácilmente de un animal infectado a otro. El problema que aquí se discute de si los anticuerpos contra el virus de la poliomielitis pueden formarse en los monos *Rhesus* por una epidemia latente, aunque se limite al laboratorio, se decide en un nuevo trabajo de I. M. MORGAN, H. A. HOWE y D. BODIAN (1947), en sentido negativo. Estos autores observan que los monos *Rhesus*, a los que se inyecta por vía intravenosa o subcutánea entre 0,2 a 2,0 g. de virus de la poliomielitis activo (medula espinal de monos infectados), no producen anticuerpos o lo hacen en pequeña cantidad y no quedan en estado refractario frente a la inoculación intracerebral. Una formación regular de anticuerpos sólo se consigue por inyecciones intramusculares de grandes dosis; naturalmente que la transmisión del virus por esta vía no es posible que se produzca en circunstancias naturales.

la aplicación de suero de convalecientes, ya que el título de algunos anticuerpos en tales concentrados resulta tan elevado e incluso más alto que en el suero de convalecientes. Pero si se usa como material de partida suero de adultos sanos y no de convalecientes, sólo puede esperarse buenos resultados cuando se trate de infecciones que haya experimentado todo adulto y cuyos anticuerpos persistan en el suero durante toda la vida. En todos los respectos el sarampión constituye un caso ideal, excepcional, porque todo donante adulto suministra anticuerpos: de aquí los señalados resultados que se consiguen en la profilaxis del sarampión con los concentrados de globulina y [F. J. ENDERS (1944), J. STOKES, E. B. MARIS y S. S. GELLIS (1944), C. W. ORDMAN, C. G. JENNINGS y C. A. JANEWAY (1944)]. Según E. J. COHN (1945) y J. STOKES y NEEFE (1945) y otros autores, los concentrados, administrados incluso a dosis de 0,15 ml., considerando la relativa rareza de esta infección, lo que, considerando la relativa rareza de esta infección, no se comprende fácilmente y requiere una aclaración ulterior.

En relación teórica con lo anterior sería conveniente examinar del modo lo más completo posible la composición en anticuerpos del suero de individuos determinados cuya historia clínica fuera conocida y que hubieran vivido (al menos durante los tres años que anteceden a la toma de sangre) en un medio de estado epidémico constante. Podrían obtenerse grandes cantidades de suero de donantes voluntarios, y los métodos de análisis de anticuerpos han mejorado tanto que puede prescindirse de pruebas previas. El número y el tipo de los anticuerpos que existan simultáneamente en el suero normal de un hombre pueden ofrecer ya conclusiones útiles. Cuanto más compleja sea la cantidad de anticuerpos que coexistan en el suero de un individuo, tanto menos probable será la producción inducida de modo específico de los componentes de todo el conjunto, especialmente cuando entre ellos se encuentran anticuerpos contra microbios que no son patógenos para el hombre y con los que no haya podido ponerse en contacto, punto éste que ya se ha tenido en cuenta al enjuiciar los anticuerpos existentes en los sueros normales de animales.

D. LAS ANTITOXINAS DE LOS SUEROS NORMALES.

El hombre y los animales reaccionan frente a la administración parenteral de mínimas cantidades de ciertos venenos bacterianos que se conocen con el nombre de "exotoxinas" con fenómenos patológicos

característicos para cada veneno, y también específicos en sentido dinámico. Como E. VON BEHRING y sus colaboradores KITASATO y WERNICKE observaron, los animales pueden hacerse resistentes frente a dosis crecientes de toxina tetánica y diftérica de modo que alcanzan a soportar altos múltiplos de dosis que serían fatalmente mortales sin el tratamiento previo; y como el suero de tales animales posee la propiedad de eliminar por completo la acción tóxica cuando se mezcla con grandes cantidades del veneno, se llegó al convencimiento de que se trataba de un fenómeno de tipo especial que difería de los otros tipos de reacción antígeno-anticuerpo. La designación *antitoxina* refleja esta convicción con la cual parece que no puede compaginarse que una sustancia del suero capaz de neutralizar de modo intenso y específico, desde el punto de vista farmacodinámico, pueda producirse también de modo espontáneo, es decir, *sin habituación previa al veneno* o, expresado más científicamente, *sin inmunización activa con el antígeno tóxico*. G. RAMON (1922) pudo apreciar, sin embargo, que al mezclar la toxina diftérica con el suero antitóxico se producen floculaciones cuyo óptimo coincide con la neutralización completa de la toxina; también se sabe que, por la inmunización con toxoides (es decir, con toxinas bacterianas privadas de su efecto venenoso), se producen también antitoxinas de título elevado, de modo que *el proceso de habituamiento al veneno es innecesario e incluso perturbador (hipersensibilidad para la toxina)*. A pesar de estos fuertes argumentos, en el mundo conceptual de la mayor parte de los investigadores en inmunidad se sostiene la creencia de que una antitoxina formada sin estímulo antigénico es una contradicción en sí. Se ha llegado a una pugna de opiniones cuyo aporte documental por una y otra parte alcanza un volumen imponente, sin que se haya llegado hasta la fecha a una respuesta decisiva. Dadas estas circunstancias, nuestra revisión renuncia a dar noticia exhaustiva de la literatura existente, y se limita a exponer algunos trabajos más importantes.

a) *Antitoxina diftérica en el suero normal.*

a) *Sueros animales.*

Caballo.—En 1894 comunicaron E. ROUX y L. MARTIN que ciertos caballos no reaccionan frente a la inyección de toxina diftérica; opinaron que el suero de estos caballos contenía antitoxina antes de la inmunización, y en efecto pudieron observar que brindaba cierta protección al cobayo. Poco después M. H. BOLTON (1896) comunicó

que el suero de tres caballos sin tratar neutralizaba la toxina diftérica, en tanto que otros nueve sueros carecían de efecto. A continuación se hicieron observaciones análogas por FERRÉ (1896), L. COBBETT (1899), W. KASTENMEYER (1911), R. KRAUS y A. SORDELLI (1920), H. W. SCHÖNING (1922), D. M. COWIE y R. M. GREENTHAL (1920/21); y A. T. GLENNY y ALLEN (1921) determinaron la concentración de la antitoxina existente en el suero de caballo normal, obteniendo resultados comprendidos entre 0,001 y 5 unidades. En 1925, A. T. GLENNY resume las conclusiones de su rica experiencia propia en los siguientes puntos: 1. Mientras que muchos caballos sufren gravemente por la adición de 0,01 ml. de una toxina diftérica fuerte e incluso mueren, otros soportan 10 ml. sin peligro aparente. 2. De 1.350 caballos utilizados para inmunizar en el curso de diecisiete años, la mitad, aproximadamente, poseían antitoxinas en su suero en una concentración igual o mayor de 0.1 unidad de antitoxina por ml. 3. Los caballos en cuyo suero existe antitoxina natural reaccionan a la inyección de toxina con una rápida elevación del título de antitoxina, mientras que la producción de antitoxina en animales que no poseían el anticuerpo natural no se produce en tan breve tiempo [A. T. GLENNY y H. J. SÜDMERSEN (1921)]. 4. La causa de la inmunidad natural del caballo no se ha explicado satisfactoriamente (véase luego). 5. La proporción de caballos naturalmente inmunes se ha reducido considerablemente en los últimos años (antes de 1925). 6. El título de antitoxina de los sueros de caballos dotados de inmunidad natural sufre fuertes oscilaciones, incluso cuando el animal no ha recibido ninguna inyección de toxina durante el tiempo de observación; no ha podido conocerse la causa de estas oscilaciones.

Debe destacarse que *el contenido en el suero normal de caballo de la antitoxina diftérica depende de la edad del animal*. En el suero de los caballos de dos a cuatro años falta siempre, prácticamente, la antitoxina natural, mientras que su existencia se descubre en los animales de ocho a diez años, con una frecuencia que alcanza a más de la mitad de ellos. Este comportamiento se ha observado por A. SORDELLI (1921), A. T. GLENNY (1925), G. RAMON y F. LEMÉTAYER (1931), W. STUCKI (1933), G. RAMON (1936), y debe considerarse como un fenómeno regular, ya que también se ha comprobado en otros anticuerpos naturales, como en las isoaglutininas, en las hemolisinas para el carnero, en las aglutininas para los hematíes de conejo existentes en el suero humano y en las hemaglutininas de la gallina (véase página 175).

Contra la formación espontánea de la antitoxina diftérica en el

suero de los caballos viejos se ha objetado, sin embargo, que el caballo no es receptivo frente a la infección natural con los bacilos diftéricos. F. C. MINNETT (1920) pudo descubrir el *C. diphtheriae* en heridas de caballos, observación que confirman H. KLIEWE y M. WESTHUES (1925) y H. J. PARISH y C. C. OKELL (1926); por otra parte. ZURUKZOGLU y MÜNDEL (1935) y E. RICHTERS (1935) encuentran bacilos diftéricos en la mucosa nasal de caballos, y RICHTERS en el pus procedente de ganglios linfáticos submaxilares y retrofaríngeos. G. RAMON (1936) deduce la conclusión de que el germen toxígeno provoca la inmunidad antitóxica natural; el agente infeccioso es el agente inmunizante (obra citada, pág. 331). Sin embargo, no alcanzan a justificar esta afirmación apodíctica las observaciones aducidas. Al menos se debería coordinar de modo estadístico las observaciones de bacilos diftéricos en caballos, la inmunidad natural de ciertos caballos frente a la inyección de toxina, y el contenido de antitoxinas en la sangre para aducir la prueba de que la infección es la condición necesaria para la inmunidad y la producción de antitoxina. Si esto no se hace, sólo se consiguen resultados que con la misma razón pueden ser también considerados como pruebas opuestas a la tesis de la formación infecciosa de la antitoxina antidiftérica natural en la sangre del caballo. Incluso la circunstancia de que los caballos de unos cinco años siempre den contenido en antitoxina negativos y que en animales de diez a quince años sean en cambio positivos entre el 50 y el 75 por 100 de los casos, parece hablar en contra de una relación causal entre infección y contenido antitóxico del suero; además, en el mismo sentido habla el corto número de casos en que pueden descubrirse bacilos diftéricos. ZURUKZOGLU y MÜNDEL investigaron la secreción nasal de 250 caballos, y sólo en 2 encontraron muestras de bacilos diftéricos de débil capacidad toxigénica (*Typus mitis*); RICHTERS, entre 152 caballos encontró 15 resultados positivos, y de los cuales sólo 8 pudieron comprobarse por cultivo, y aun de ellos sólo 6 estirpes ofrecían una patogenidad considerable para el cobayo. A. T. GLENNY (1925, pág. 249), que conocía los datos de MINNETT acerca de la existencia de bacilos diftéricos en las heridas de caballo, encargó a los veterinarios de los importantes Wellcome Physiological Research Laboratories de Beckenham (Kent) vigilar las infecciones de heridas en numerosos caballos, e investigó bacteriológicamente las secreciones de las heridas, así como frotis de mucosa de caballos no heridos. También examinó a todas las personas que estaban en contacto con los caballos, analizando bacteriológicamente sus mucosidades faríngeas. Nunca pudo encontrar en los caballos el

C. diphtheriae ni tampoco ningún portador humano del germen. Pero aproximadamente la mitad de los 1.350 caballos utilizados en el transcurso de diecisiete años poseían antitoxina en el suero (0,1 unidad por ml. o más). Esta observación basta para convencer de que la antitoxina diftérica natural del suero de caballo no puede deberse a una epidemia manifiesta o larvada de los animales.

Nos referiremos aún brevemente a una comunicación de E. LEMÉTAYER y DIETRICH (1936). Estos autores investigaron el suero de caballo de una cuadra relativamente aislada en Tiaret (Algeria) y no pudieron encontrar en ningún caso ni indicios de antitoxina, aunque los 40 animales investigados pertenecían a la clase vieja (cinco a veinte años), en el que era de esperar cierta proporción de resultados positivos. De 33 caballos testigo que vivían en la misma comarca, pero no estabulados, sólo cinco contenían cantidades apreciables de antitoxina (0,03 a 0,1 unidades antitóxicas), es decir, un porcentaje muy inferior al descubierto por RAMON y LEMÉTAYER en los caballos militares franceses y por A. T. GLENNY en Inglaterra. El número de investigaciones, sin embargo, fué pequeño, y las determinaciones de antitoxina sólo se efectuaron una vez, de modo que puede haber influido el azar en los resultados. GLENNY había ya comprobado que el título de la antitoxina natural en el suero de caballo es muy variable (véase también pág. 171). También se ha señalado que la antitoxina diftérica natural existente en el suero humano puede eliminarse por el sudor y la orina [J. M. NEILL, E. L. GASPARI y R. A. MOSLEY (1931), NEILL, GASPARI, MOSLEY y J. Y. SUGG (1931)], de modo que tal vez tengan razón LEMÉTAYER y DIETRICH al opinar que puede tener una relación el modo de vivir de los caballos en Algeria con lo raro de su posesión de antitoxina.

Monos.—En el suero de determinados monos (cinocéfalos, Hamadryas) G. RAMON y B. ERBER (1935) pudieron descubrir con frecuencia un contenido de antitoxina igual o mayor que 1/30 unidades antitóxicas; entre 139 cinocéfalos investigados hasta el 64 por 100 dieron resultado positivo en la proporción señalada. También aquí se comprobó que el contenido de antitoxina aumenta con la edad del animal, y se señala explícitamente que los *resultados positivos se observan tanto en monos recién capturados como en animales viviendo largo tiempo en cautividad y en contacto con el hombre*. Como ya se ha señalado, se comportan de modo diferente las distintas especies de monos. De 17 sueros de Hamadryas, nueve contenían más de 1/10 unidades antitóxicas; 13 *Macacus cynomolgus* y 2 *Macacus rhesus* rindieron sueros en los que con la técnica empleada no pudo descu-

brirse nada de antitoxina; y de 12 sueros de chimpancé ninguno pasó el límite de 1/30 unidades antitóxicas, que suele considerarse límite entre los resultados positivos y los negativos; uno de los sueros que, en repetidas investigaciones del animal, se manifestó completamente exento de antitoxina procedía de un chimpancé conservado más de dos años en el Instituto Pasteur; de ello se deduce claramente que el contenido de antitoxina en la sangre está determinado por la especie del mono, y dentro de las especies formadoras de antitoxina, por la edad y no por su contacto con el hombre; todo habla en favor de que estos anticuerpos antitóxicos se forman fisiológicamente de modo independiente del estímulo específico de una infección. Es cierto que, sin embargo, RAMON y ERBER defendían la opinión contraria; en especial consideraron 30 cinocéfalos que no ofrecían signo de ninguna enfermedad y tomaron frotis faríngeos que investigaron bacteriológicamente. En dos muestras encontraron bacilos que por su patogenicidad para el cobayo normal y por su apatogenicidad para los cobayos protegidos específicamente, así como por su capacidad de formar en caldo una toxina débilmente activa (dosis letal aproximada, 0,1 ml.), poseían el carácter de los *C. diphtheriae* (más concretamente de sus variantes de patogenicidad reducida); en todas las restantes muestras no pudieron observarse sino numerosos gérmenes "semejantes al diftérico". En el suero de los dos cinocéfalos en que se descubrió el germen existía antitoxina en un título de 0,01 unidades antitóxicas. Como los macacos, según las investigaciones de RAMON y ERBER, no poseen nada de antitoxina en su sangre, se analizó la presencia de bacilos diftéricos en un pequeño número de frotis faríngeos de *Macacus cynomolgus*; en 3 de las 15 muestras encontraron un bacilo patógeno para el cobayo semejante al diftérico, pero su toxicidad no se neutralizaba por la antitoxina diftérica, de modo que este descubrimiento se consideró negativo (1)—para la pregunta planteada—.

(1) H. DOLD y F. WEIGMANN (1935 b) pudieron cultivar bacilos difteroides en parte típicos y en parte atípicos, pero patógenos para el cobayo, obtenidos de la faringe y de la nariz de trece monos sanos (*Macacus* y *Cercopithecus*). Los gérmenes encontrados, después de cultivados en agar, inyectados subcutáneamente a un cobayo, lo mataban entre uno y cuatro días, produciéndole trastornos idénticos a los provocados por los bacilos diftéricos genuinos; no se comprobó la neutralización de la patogenicidad por la antitoxina diftérica. La antitoxina pudo descubrirse en el suero de los monos, pero en concentraciones muy pequeñas, en general inferiores a 0,01 U.A., y en pocos casos alcanzó 0,02. DOLD y WEIGMANN (véase también 1935, a, c) admiten que en todos los monos debe tratarse de infecciones por bacilos diftéricos genuinos, que en parte adquieren propiedades atípicas por efecto de la saliva. RAMON y ERBER opinan,

G. RAMON (1936) sostiene que estos resultados analíticos (que no sin propósito se han expuesto con detalle) le autorizan para precisar su concepción en la forma siguiente: "*De este modo hay también que conceder que, en los monos, la existencia o la falta de la antitoxina diftérica coincide con la existencia o no existencia de una infección diftérica.*" Esta afirmación, sin embargo, está en crasa contradicción con los hechos experimentales; incluso admitiendo que de los dos frotis de mucosa de los cinocéfalos sanos se aislaron estirpes de bacilos diftéricos, típicas y toxigénicas, estos descubrimientos no pueden extenderse hasta afirmar que todos los cinocéfalos y Hamadryas que tenían grandes cantidades de antitoxina en su sangre ocultaban bacilos diftéricos en su mucosa, y no sólo cuando eran admisibles las infecciones de contacto, sino también cuando se trataba de animales libres. Incluso en los dos casos en que coinciden el contenido de antitoxina en la sangre y la presencia de gérmenes, tampoco está clara la conexión causal de los dos hechos. Se desconocía la ocasión de la infección latente, por lo que parece arbitrario admitir que el título establecido de antitoxinas fuera consecuencia de la infección. RAMON y ERBER señalan que los monos cinocéfalos reaccionan frente a la inyección subcutánea de bacilos diftéricos vivos, sólo con síntomas locales carentes de trascendencia general, pero que tales estímulos deben ocasionar la producción de antitoxinas, o la exaltación del título antitóxico ya existente; en ello encuentran una nueva prueba en favor de que la antitoxina natural en el mono se forma a consecuencia de una infección latente. Conclusión que no está justificada. Todos los monos en estado normal poseen en el suero hemolisinas para el carnero; si se les inyectan hematíes de carnero, se exalta hasta un valor elevado el título de estas lisinas. Las isoaglutininas del hombre, prototipos de anticuerpos fisiológicos, pueden formarse por la acción inmunizante de transfusiones con sangre incompatible, alcanzando un nivel no observado en condiciones naturales. Con otras palabras, debe considerarse, como regla general, que la formación de todo anticuerpo natural se exalta considerablemente por la inmunización con el antígeno que le corresponde; pero de ello no puede deducirse, como pone en claro el ejemplo de las aglutininas, que el anticuerpo natural se forme del mismo modo que el análogo inmune; a saber, como reacción frente a un estímulo antigénico específico. Sólo puede

sin embargo, que los bacilos cultivados por DOLD y WEIGMANN no eran bacilos diftéricos, sino una bacteria emparentada con el Bact. FREISZ-NOCARD, y que lo mismo puede decirse de las estirpes encontradas por él en los macacos.

decidirse si un anticuerpo, que se encuentra con cierta regularidad en el suero de una especie animal, debe considerarse como natural o provocado por inmunización, cuando la acción del correspondiente antígeno puede excluirse con seguridad o con la suficiente probabilidad o, por el contrario, cuando puede establecerse del mismo modo. Los argumentos aducidos por RAMON y ERBER no permiten afirmar que para la antitoxina diftérica contenida en el suero de ciertos monos esté excluida la primera posibilidad, y que en cambio parezca segura la segunda.

Otras especies animales.—Manifiestamente, el problema de la antitoxina diftérica natural sería menos unilateral si pudiera encontrarse especies animales que poseyeran antitoxina en el suero y no fueran receptivas para la infección por el bacilo diftérico. No nos ha llegado información de que se haya profundizado en este problema, a pesar de que en los primeros períodos de la obtención de los sueros curativos diftéricos se hubieron de inmunizar diversos animales (conejo, carnero, perro, cabra) con toxina diftérica. En E. WERNICKE y H. SCHMIDT (1928, pág. 566) se encuentra la siguiente información: "En caballos, vacas y ovejas, particularmente en caballos, se ha observado hace tiempo que los animales con un contenido de antitoxina natural elevado resultan especialmente aptos para la inmunización", y más tarde se afirma: "Nada se sabe acerca de la difteria espontánea en vacas, ovejas y cabras." Los datos son, naturalmente, demasiado imprecisos para sacar conclusiones. De la presencia simultánea de antitoxina diftérica y de otros anticuerpos antitóxicos en los sueros de caballos normales [RAMON, RICHOU, NICOL y LUPU (1936)] nos ocuparemos en otro lugar relacionándolo con otras observaciones análogas.

β) *Sueros humanos.*

En los mismos años en que ROUX y MARTIN publicaron sus observaciones acerca de la existencia de antitoxina diftérica en el suero de caballos no inmunizados apareció la primera comunicación de R. ABEL (1894) acerca de la misma observación en el suero de hombres sanos. Los datos de ABEL se confirmaron inmediatamente por A. WASSERMANN (1895), W. ORLOWSKI (1895), J. LOOS (1896), R. FISCHL y V. WUNSCHHEIM (1895), P. RÖMER y T. SAMOS (1909) y otros autores, e inmediatamente se manifestaron diferencias en la interpretación del origen de estas antitoxinas naturales. WASSERMANN (1895) opina que debe atribuirse a una inmunización por afecciones diftéricas anteriores, mientras que ORLOWSKI considera esta tesis no

demostrada porque encontró la antitoxina tanto en un convaleciente de difteria como en el suero de cinco niños que, con toda probabilidad, no habían tenido nunca difteria. La suposición de que WASSERMANN partía era que la enfermedad de la difteria debe provocar en el hombre la producción de antitoxina. Lo que, sin embargo, no es cierto. W. H. PARK y A. ZINGER comunicaron, ya en 1916, que los niños con una reacción de SCHICK positiva cuando sufren una difteria aguda, benigna, pierden su reacción positiva durante toda la enfermedad y en la convalecencia, y no de modo excepcional, sino en un tanto por ciento de casos relativamente alto. La desaparición de la formación de antitoxinas después de la enfermedad fué investigada posteriormente con métodos más exactos en niños que no habían sido tratados con sueros curativos, confirmándose los resultados por FR. HAMBURGER y HAIDVOGEL (1927), J. SIEGL (1929), FR. HAMBURGER y SIEGL (1929) y E. MATSEN (1939). En 26 casos de difteria en que MATSEN determinó el título de antitoxinas durante la enfermedad y después de ella, no se trataron los enfermos con suero, y la enfermedad siguió un curso benigno. La formación de antitoxina varió entre amplios límites, como muestra la revisión recogida en la tabla 15, en que sólo se reúnen los casos en que se conoció el título de antitoxinas desde los primeros días de la enfermedad.

TABLA 15

Elevación de antitoxinas en el curso de difterias benignas (según E. MATSEN).

Caso núm.	Primera deter- minación de antitoxinas (día de la en- fermedad).	Título de antitoxina por ml.	
		Al comienzo.	En ulteriores fases.
14	3	0,00009 U. A.	0,11 U. A.
1	1	0,0002	0,013
2	3	0,006	15,0
28	1	0,10	0,10
3	1	0,44	22,0

En los casos números 28 y 12 (este último no recogido en la tabla) no pudo demostrarse una nueva producción de antitoxinas, producción que era insignificante en el caso número 1 y considerable en los 2 y 3. La gravedad de la enfermedad no juega ningún papel. Por el contrario, MATSEN comprobó que la elevación de los anticuerpos en tres pacientes que ya contenían relativa cantidad de antitoxina en la

sangre al comienzo de la enfermedad, era mucho más fuerte que la elevación observada en otros tres enfermos con nivel inicial bajo; sin embargo, el número de observaciones es demasiado pequeño para poder formar juicio de la regularidad de este comportamiento (consultense las tablas 15 y la pág. 171). Además, F. HAMBURGER y HAIKVOGEL (1927) han podido observar que los niños que dan resultado positivo en la prueba de SCHICK pueden ocultar durante mucho tiempo en la cavidad nasofaríngea bacilos diftéricos tóxicos sin enfermar de difteria y sin que la prueba de SCHICK se vuelva negativa.

Estas observaciones, al parecer, están en contradicción con la afirmación de que la producción de antitoxina puede desencadenarse en distintos animales por la inmunización con la toxina diftérica y, en el hombre, con el toxoide diftérico. Pero téngase en cuenta que al inmunizar con toxina o toxoide se conocen tanto la dosificación como el ritmo de administración del antígeno, y resulta indudable la penetración de éste en el torrente circulatorio. Por el contrario, se desconoce cuánto antígeno tóxico ceden los bacilos diftéricos que habitan en la mucosa faríngea del hombre y cuándo y en qué cantidad se produce la absorción. *Indudablemente, no son grandes las cantidades de toxina formadas en los lugares de colonización de las bacterias y absorbidas en los casos de difteria de curso normal.* La dosis letal de toxina para un niño, según los datos conocidos, es, probablemente, algo menor que 10 dosis letales mínimas para el cobayo. Por otra parte, se sabe de antiguo que la muerte del cobayo al que se hayan inyectado únicamente pocas dosis letales de toxina, sólo puede impedirse por la administración ulterior de antitoxina cuando ésta se administre poco después de la inyección de la toxina, ya que dos o tres horas después de inyectada ésta la vida del animal no puede defenderse, aunque se administren grandes cantidades de antitoxina. Ahora bien, si clínicamente pueden curarse casos benignos de difteria mediante sueros curativos administrados a tiempo, hay que admitir, de acuerdo con J. HOWARD MUELLER (1941), que la cantidad de toxina absorbida debe ser extraordinariamente pequeña, bien porque los bacilos diftéricos en las condiciones en que se multiplican en la mucosa faríngea y sus exudados sólo puedan liberar poca cantidad del veneno o porque se absorba poca toxina inalterada.

Los anticuerpos producidos por vía inmunizatoria no se mantienen en el nivel que alcanzan después de la administración única o repetida del antígeno, sino que decrecen paulatinamente y finalmente desaparecen por completo de la sangre si no se renueva el impulso antigé-

nico. Como se ha expuesto en otro lugar, existen excepciones a esta regla (anticuerpos contra al sarampión o la fiebre amarilla); pero la antitoxina diftérica, como es sabido, no cuenta entre ellas. A. F. GLENNY y H. J. SÜDMERSEN (1921) observaron que un caballo que nunca ha sido tratado previamente, reacciona muy perezosamente a la primera inyección de la toxina diftérica, ya que sólo al cabo de tres semanas puede apreciarse aumento de antitoxina en el suero, y el máximo sólo se alcanza dos meses después de inyectar la de toxina; si se inyecta la misma dosis a un caballo previamente tratado, el período de incubación necesario para alcanzar el nivel más alto de antitoxinas se reduce a tres días, y el título máximo puede ser cien veces mayor que el que se observó a consecuencia de la primera inyección;

ahora bien, tan rápida como la subida es la desaparición, como claramente se observa en la figura 10. De acuerdo con ello, se ha observado que la antitoxina, cuando aparece en el suero de convalescientes, después de la difteria, desaparece al cabo de un tiempo relativamente breve; según la experiencia de SCHICK (1911), al cabo de doce a catorce meses. También la entitoxina que se forma después de va-

vacunar por vía activa con formoltoxoides sólo se conserva en el suero durante breve tiempo. Sabido es que cuando la prueba de SCHICK es positiva antes de la vacunación, resulta negativa después de ella; pero no siempre es negativa permanentemente, sino que, en un determinado tanto por ciento de vacunados, que de año en año crece, vuelve a ser positiva; este fenómeno se ha designado con el cómico nombre de "recaida de SCHICK" (en inglés, "SCHICK-relapses"). En niños vacunados en el Canadá con tres dosis de formoltoxoides, y que posteriormente nunca sufrieron infecciones diftéricas, D. T. FRASER y K. F. BRANDON (1936) observaron en el curso de cinco años un 34 por 100 de resultados positivos con la prueba de SCHICK. J. SIGURJÓNSSON (1940) obtuvo resultados aún más desfavorables en Reykjavik (Islandia). De 867 niños vacunados dos veces con toxoide precipitado

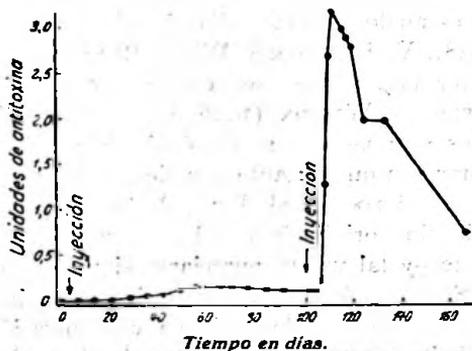


Fig. 10. Producción de antitoxina en el caballo: diferencia del efecto de la primera y de la segunda inyección de toxina; caída más rápida del título de antitoxina, después de haber alcanzado el máximo (según GLENNY y SUDERMERSEN).

con alumbre, ocho meses después de la vacunación un 95,4 por 100 dan de SCHICK negativas, pero cuatro años después sólo el 66,3 por 100; después de una doble vacunación con formoltóxido líquido (anatoxina de RAMON) el número de resultados SCHICK negativos era del 80,7 por 100, pero cuatro años después descendió al 26,12 por 100. Es cierto que H. J. PARISH y C. C. OKELL (1928) informan que de 533 escolares que daban resultado negativo en la prueba de SCHICK, y que en el curso de uno a siete años se volvieron a someter a esta prueba, sólo en el 1,1 por 100 resultó negativa; pero en 440 niños que inicialmente daban reacción positiva, por lo que sólo a consecuencia de la vacunación se produjo respuesta negativa, este tanto por ciento de "recaídas" alcanza al 5 por 100. Existen aún toda una serie de comunicaciones análogas, entre ellas las de A. B. SCHWARTZ y F. R. JANNEY (1938), V. K. VOLK y W. E. BUNNEY (1942), H. L. DUKE y W. B. SCOTT (1943), que se resumen en la conocida obra de W. W. C. TOPLEY y WILSON (1946, pág. 1395) bajo el juicio de que en los niños vacunados con dos dosis de una vacuna comprobada, hay que contar con que el tanto por ciento de "recaídas de SCHICK" no pasan del 5 por 100 anual. Pero, de hecho, la desaparición paulatina de la antitoxina originada por la vacunación, no puede apreciarse exactamente—y tal vez ni apreciarse siquiera—por este método. La prueba de SCHICK sólo permite apreciar si en la sangre de los examinados existe o no una determinada concentración de antitoxina; es decir, se limita a establecer un determinado umbral. Se ha demostrado además que tampoco se llena este fin de modo muy perfecto. La opinión inicial de J. MICHIELS y B. SCHICK (1913) [véase también B. SCHICK (1913)] de que una reacción negativa señala un contenido de antitoxina de más de 0,03 unidades antitóxicas en el suero (= 0,062 unidades antitóxicas en la sangre), y de que una reacción positiva demuestra un nivel de antitoxina por debajo de ese valor, parece insostenible después de numerosos experimentos de contraste [F. FARAGÓ (1930), CL. HENSEN (1931, 1932), CH. N. LEACH y G. PÖCH (1935, a, b), TH. REH (1935), A. HOTTINGER (1935, 1936), K. F. BRANDON y D. F. FRASER (1936), A. W. DOWNIE y colaboradores (1941), R. REGAMEY (1943), REGAMEY y E. NOVEL (1943) y otros]. Existen reacciones negativas con un contenido en antitoxina muy bajo (<0,001 unidades antitóxicas), y por otra parte, aunque más raramente, reacciones positivas con un suero de título de 0,01 a 0,03 U. A., y aun más alto.

Pero no es simplemente esta circunstancia la que ha demostrado que es inapropiada la prueba de SCHICK para seguir la demolición

de las antitoxinas producidas por vía activa. Una reacción de SCHICK negativa puede transformarse en positiva por diversos estímulos *inespecíficos*, y unos días después de efectuado el estímulo se observa una nueva modificación en sentido contrario de la capacidad de reacción. Esfuerzos (marchas prolongadas, ejercicios militares), modificaciones repentinas del modo de vivir o de la alimentación (carencias de vitaminas), sudores fuertes y prolongados, inyecciones de suero de caballo normal (que no contenga antitoxinas, etc.) son capaces de transformar la prueba de SCHICK negativa en positiva indudable [NEILL y colaboradores (véase pág. 173), S. I. ZLATOGOROFF y S. A. KOSTEREFF (1931), P. FEUILLE, THIRY y BLANCARDI (1934), F. H. LORENTZ (1933), A. HOTTINGER y E. LORENZ (1932), A. HOTTINGER (1936)].

Un grave inconveniente, aún no vencido, de la prueba de SCHICK consiste en que no puede repetirse dos o más veces en el mismo individuo [como se hace en las investigaciones de J. H. PARISH y C. C. OKELL (1928)] si no quiere correrse el peligro de equivocarse al enjuiciar la persistencia de la antitoxina producida por vía activa. Si en esta prueba se inyecta toxina, es decir, antígeno, por vía intracutánea, ésta puede volver a desencadenar la producción de anticuerpos, tanto más cuanto que se trata de un organismo previamente tratado de modo específico. H. OPITZ (1927) señala esta causa de error y se refiere a experiencias propias, de las que se deduce que por efecto de una sola prueba de SCHICK puede transformarse la reactividad positiva en negativa. Se evita esta causa de error si la concentración de antitoxinas en la sangre se determina de modo *directo*, lo que ofrece también la ventaja de que se evitan las inexactitudes de la determinación indirecta de la antitoxina por el método de SCHICK; pueden tomarse repetidas muestras de sangre, sin afectar por ello el nivel de antitoxina. Estas investigaciones han sido emprendidas, entre otros, por CL. JENSEN (1931, págs. 528 y 532); en una serie de pruebas de este tipo, 23 niños, de edad entre tres y ocho años, recibieron una inyección de 1 ml. de formoltóxido purificado y concentrado, en la región subescapular. Inmediatamente antes, y quince días y doce meses después de esta inyección, se determinó cuantitativamente el contenido de antitoxina en el suero. Aquí sólo se reproducen algunos datos y se prescinde de los que no atañen al problema considerado.

TABLA 16

Concentraciones de antitoxina en el suero de niños antes y después de una única inyección de formoltoxoides [según Cl. JENSEN (1931)].

Edad de vacuno.	Unidades de antitoxina en el suero.		
	Antes de la inyección.	Quince días después de la inyección.	Doce meses después de la inyección.
7 años.	0,022	75	2,5
8 »	0,024	45	0,45
6 »	ca. 0,00035	20	1,9
8 »	0,45	9	0,13
6 »	ca. 0,00007	3,2	0,082
5 »	0,00005	0,91	0,04
8 »	0,00005	0,0063	0,0008
6 »	0,00005	0,004	0,0016
8 »	0,00005	0,0007	0,0013
6 »	0,00005	0,0063	0,0025

En otros casos se determinó con frecuencia y a intervalos cortos el título de la antitoxina existente en el suero de niños inoculados con formoltoxoides, acerca de lo cual JENSEN ha publicado dos trabajos (véase obra citada, pág. 534) cuyos resultados experimentales que nos interesan se reproducen a continuación:

TABLA 17

Determinaciones repetidas de las unidades antitoxicas en el suero de niños a los intervalos que se consignan después de una única inyección de formoltoxoides [según Cl. JENSEN (1931)].

Días después de la inyección.	Primer caso (niños de cuatro años).	Segundo caso (niños de seis años).
5	20 U. A.	0,60 U. A.
42	9,6	0,24
78	6,3	0,13
190	2,9	0,07
355	1,9	0,04

De esta tabla resulta: en primer lugar, que poco después de la inyección de formoltoxoides se alcanza el título máximo en antitoxinas, que se mantiene poco tiempo y que desciende paulatinamente a continuación hasta reducirse a valores bajos; en segundo lugar, que, habitualmente, los individuos que antes de la inyección poseen apreciable cantidad de antitoxina en sangre, alcanzan máximos de antitoxina más elevados que los individuos en los que no se da tal circunstancia (véase pág. 178);

esto concuerda con lo observado en los animales cuyo suero, en condiciones normales, posee un determinado anticuerpo, responden al esti-

mulo del antígeno correspondiente de un modo especialmente rápido y ávido con producción de la globulina inmune, experiencia efectuada, por ejemplo, en la inmunización de caballos con toxina diftérica (véase página 171); en tercer lugar, que el título de antitoxina en alguno de los niños vacunados, al cabo de los doce meses de haber recibido la inyección del toxoide había descendido a valores que pueden observarse en individuos que nunca habían recibido una inyección de toxoide diftérico. CL. JENSEN deduce de curvas extrapoladas en que representa gráficamente la reducción del título de antitoxina, que tales valores bajos son la consecuencia de las inyecciones del antígeno, que en determinadas circunstancias pueden durar entre treinta y sesenta y cinco años, sin que el título de la antitoxina se reduzca a 0,05 U.A. Cuando desciende a valores más bajos sólo se debe, según JENSEN, al valor máximo de antitoxina alcanzado a consecuencia de la inyección de antitoxina; así, cuando el valor inicial máximo es alto (20 a 100 U.A.) se observa una persistencia de un año, mientras que cuando el valor inicial máximo es bajo (0,02 a 3,2 U.A.) sólo puede contarse con una persistencia de meses. Pero es probable que las cosas sucedan como en las isoaglutininas (véase pág. 110). Si se inyecta a un hombre del grupo sanguíneo B α la sustancia A, se eleva rápidamente el título de la aglutinina α hasta un alto nivel, y después va reduciéndose de modo paulatino; pero, sin embargo, nunca alcanza el valor cero; es decir, es imposible transformar de este modo un individuo B α en B θ , porque, por razones de herencia, la producción de α se mantiene permanentemente, y, después de agotado el efecto del estímulo artificial, el contenido de la aglutinina desciende al nivel fisiológico.

Como en el cobayo y en ciertas especies de monos, existen razones para admitir también en el hombre la existencia de antitoxina diftérica natural, es decir, producida sin estímulo antigénico específico; tal es la consecuencia de la interpretación objetiva de las observaciones. Sin embargo, el juicio objetivo de muchos autores que han entendido en este problema se ha dejado influir porque los hallazgos de antitoxina en la sangre de personas sanas y que anteriormente nunca habían enfermado conscientemente de difteria, se relacionan y subordinan a la teoría del carácter puramente antitóxico de la inmunidad diftérica y a los criterios de enjuiciamiento que de ella se deducen. Esto, naturalmente, sólo podría admitirse de modo consecuente si la predisposición decreciente para la difteria que se observa con la edad pudiera ponerse en relación causal con la elevación del contenido de antitoxina en la sangre y considerarse ambos consecuencia de una

epidemia masiva de la población por infecciones productoras de anti-toxina; como las infecciones manifiestas, es decir, los casos diagnosticados de difteria, no se toman en cuenta, quedan exclusivamente las infecciones latentes, es decir, sólo restan los *portadores sanos* de

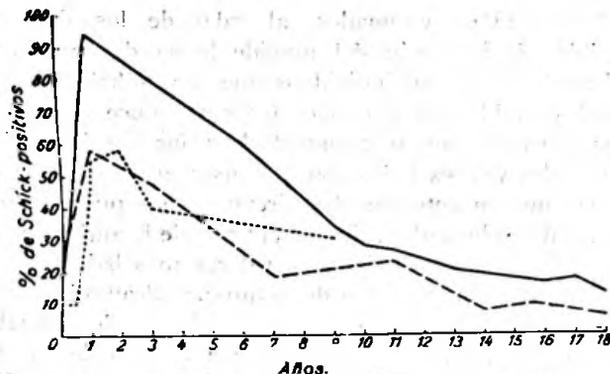


Fig. 11. Distribución según la edad de los individuos Schick positivos. Las líneas densas son habitantes de Nueva York, según investigaciones de PARK y ZINGHER y B. SCHICK en 154.078 niños; las líneas a trazos comprende 1.032 individuos estudiados en la población vienesa (v. GROER y KASSOWITZ); la línea en puntos da los resultados de 314 niños italianos (BACCICCHETTI). Reproducidas, algo simplificadas, de A. HOTTINGER y E. LORENZ (1932 b).

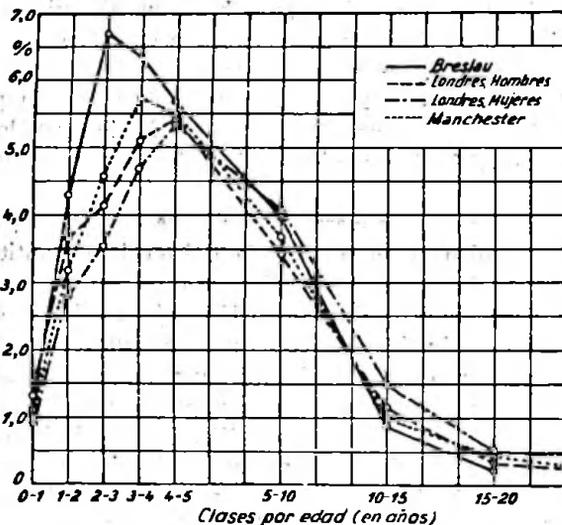


Fig. 12. Las ordenadas dan la frecuencia de la difteria en función de la edad (en porcentaje de la morbilidad total por difteria). En el diagrama se reúnen tres estadísticas: 1, de Breslau (36.394 casos entre los años 1888-1890); 2, de Manchester (646 casos en los años 1911-1912), y 5, de Londres (9.589 casos masculinos y 10.581 femeninos en los años 1910 y 1912). Las figuras están sacadas de la obra *Diphtheria* (1923) editada por el Medical Research Council.

bacilos (los *healthy carriers* de la terminología inglesa). Deben también excluirse los convalecientes que continúan con gérmenes (*convalescent carriers*), ya que la causa de los gérmenes que portan es una enfermedad previa y se deben incluir en los casos de la enfermedad. Si se compara la figura 12, que expresa la frecuencia de los casos de difteria en función de la edad, con la figura 11, que expresa la distribución por edades de los individuos SCHICK positivos—ambas figuras en tres distintos grupos de personas examinadas—, se observa (como, por otra parte, era de esperar) que, según tales datos estadísticos, el curso de las curvas coincide casi por completo; pero lo observado probablemente no se debe a que el nivel de antitoxinas crezca continuamente con la edad del individuo. Lo que crece es, simplemente, el número de individuos que reaccionan de modo negativo en la prueba de SCHICK, y este fenómeno (prescindiendo de factores inespecíficos) sólo depende de que la antitoxina alcance un determinado nivel; y el hecho, además, sólo es cierto como promedio, ya que se encuentran con bastante frecuencia hombres SCHICK negativos con valor de antitoxina bajo [CL. JENSEN (1933), H. P. PARISH y J. WRIGTH (1938); consúltese también pág. 180]. De hecho, el nivel de antitoxina en el suero debido únicamente a la edad no es alto. C. P. BUNCH, R. C. MORROU, J. R. TIMMONS y D. F. SMITH (1940) determinaron el título de antitoxina en el suero de 20 adultos (estudiantes de Medicina), que reaccionaron de modo negativo en el ensayo de SCHICK y ninguno de ellos alcanzó 0,03 U.A., y C. C. YOUNG, W. E. BUNNEY, M. CROOKS, G. D. CUMMINGS y F. C. FORSECK (1934) observan que el tanto por ciento de casos SCHICK negativos crece con la edad más rápidamente que el número de casos en que se observa una concentración de 0,03 U.A., o más alta. Valores de 4 a 8 U.A., tales como los que J. M. NEILL, GASPARI, MOSLEY y SUGG (1931) encontraron en tres adultos que nunca habían sufrido vacunación, frente a la difteria, pertenecen a casos extraordinarios, por lo que hay que pensar que además de las inmunizaciones voluntarias también existen otros procesos inmunizantes específicos que pasan inadvertidos, pero que no siempre pueden excluirse. Ahora bien, la ley fundamental conocida desde los trabajos fundamentales de R. J. COLE (1904), E. v. DUNGERN (1903) y P. EHRLICH, de que la producción de anticuerpos se eleva por la administración repetida del antígeno, y que la antitoxina diftérica no constituya excepción, se aprovecha por todos los institutos que se preocupan de producir sueros diftéricos curativos de título elevado [véase, entre otros, R. KRETZ (1909), Th. MATSEN (1909), E. WERNICKE y H. SCHMIDT (1928), A. T. GLENNY y H. J.

SÜDMERSEN (1921); consúltese también la figura 10]. Si también fuera justa la opinión de que la proporción de individuos SCHICK negativos aumentan con la edad porque las infecciones latentes repetidas impiden la reducción a cero del nivel de antitoxina, habría que esperar que el promedio del nivel de antitoxinas en sangre alcanzara con la edad un valor alto. No obstante, como se ha dicho, no es esto lo que sucede, y el bajo promedio de antitoxina que se aprecia en el suero de los hombres adultos y viejos no puede justificarse porque, con la edad, el hombre pierda la capacidad de sintetizar esta globulina inmune ya que por la inmunización de adultos humanos con toxoide diftérico pueden observarse con frecuencia valores de antitoxina de 1 a 6 U.A., e incluso más altos [BUNCH, MORROW, TIMMONS y SMITH (1940)]. Por ello se adquiere la impresión de que *tanto el aumento de los individuos SCHICK negativos con la edad como un aumento progresivo, pero no concordante, relativamente bajo, de la antitoxina en el suero sanguíneo, son procesos de índole peculiar independientes de estímulo exógeno*. G. C. GUTHRIE, B. C. MARSHALL y W. L. MOSS (1920) efectuaron con ocho voluntarios que se prestaron a tal prueba, y de los cuales cuatro eran SCHICK positivos y cuatro SCHICK negativos (o que respondían a la prueba con seudorreacciones), el siguiente experimento; les inocularon un cultivo virulento (toxígeno) de bacilos de difteria en la faringe, y observaron que sólo los SCHICK positivos enfermaron de difteria, mientras que las cuatro personas que daban reacción negativa, de las cuales tres eran portadores de gérmenes, se mantuvieron sanos. Pero esta prueba, muy citada después, no demuestra que las cuatro personas SCHICK negativas, y entre ellas las tres portadores de gérmenes, no enfermaran de difteria porque poseyeran suficiente cantidad de antitoxina en sangre, y que, en cambio, las cuatro SCHICK positivas contrajeron la enfermedad por poseer poca antitoxina, puesto que no se determinó la concentración de antitoxina en sangre, y la prueba de SCHICK no da a este respecto una indicación suficiente. Además, si se determina la cantidad de antitoxina en el suero de una serie de enfermos inmediatamente después que aparezcan los primeros síntomas, se llega a la conclusión de que concentraciones de antitoxina de 0,01 a 0,02, e incluso de 0,03, 0,05, 0,1, y hasta de 0,5, 1,0 y 2,0 U.A. por ml. de suero no ofrecen una protección segura frente a la aparición y el curso ulterior del proceso patológico.

A. ZIRONI (1941) ha reunido los datos pertinentes a este problema aparecidos hasta el final de 1940, y lo ha sometido a una consideración crítica. De su publicación se deduce que las observaciones se han efectuado durante veinticinco años por diferentes autores y en dis-

tintos países de modo que no cabe dudar de su certeza [L. BIDOLI (1936), F. CIANTINI y A. MAGGIO (1940), S. F. DUDLEY, P. M. MAY y J. O'FLYNN (1934), HAIDVOGL (1926), R. H. HERDER (1934), F. KIRSTEIN (1922), E. MATSEN (1939), H. OPITZ (1915), G. PASCHLAU (1938), J. SCHÜRER (1919), G. RAMON, R. DEBRÉ y P. THIROLLOIX (1930), H. STEINMAURER y E. SCHMID (1938), E. A. UNDERWOOD (1935), K. YOKOI (1932), H. J. PARISH y J. WRIGHT (1938), P. ZOELCH (1934)]. Se pudiera objetar que la titulación de la antitoxina no se efectuó antes de empezar la enfermedad, de modo que siempre cabe la posibilidad de que en los primeros días de ésta se haya desarrollado su producción, quizás como consecuencia de un estado de inmunidad dinámico (consúltase pág. 175). Sin embargo, en un número suficiente de casos (OPITZ, HAIDVOGL, KIRSTEIN, MATSEN, SCHÜRER) se efectuó la determinación de antitoxinas antes de aparecer los síntomas de la enfermedad o entre el primero y tercer día de ésta, de modo que pudo comprobarse, sin lugar a dudas, la aparición de una infección, a pesar de la preexistencia de antitoxina; y en los casos en que se determinó el nivel de antitoxina en una época posterior, no cabe duda que hay que contar con el hecho de que la enfermedad, a pesar de ello, prosigue, y en algunos casos con gravedad hasta conducir a la muerte. El número de observaciones es demasiado pequeño *para poder calcular la frecuencia de casos de la enfermedad producidos a pesar de existir antitoxina en sangre*. Sin embargo, ZIRONI hace notar, en mi opinión con completo derecho, que en lógica científica un único caso debe bastar para conmover la creencia de que únicamente puedan enfermar de difteria los individuos que no poseen antitoxina en sangre.

También debe investigarse con más precisión si las infecciones latentes, y precisamente en portadores sanos de bacilos son la causa de la apreciable cantidad de antitoxinas existente en el suero de hombres normales: según los datos antiguos de M. KOBER (1899), F. H. SLACK, B. L. ARMS, E. M. WADE y W. S. BLANCHARD (1910) y los más modernos de SH. F. DUDLEY, un portador sano pierde los gérmenes rápidamente (por término medio en diez días). Ahora bien, la duración del período de portar gérmenes se ha calculado desde el punto de vista de su determinación bacteriológica, de modo que queda sin determinar el comienzo del período, por lo que no puede decirse desde cuánto tiempo antes de haberse efectuado la primera investigación existía ya el período infeccioso; para apreciarlo habría que hacer repetidas investigaciones a intervalos breves y regulares dentro de una población aislada. Las investigaciones efectuadas por SH. F. DUDLEY

(1922, 1926, 1932) en los internos de la Escuela de Marina de Greenwich, por ejemplo, no llenan de modo perfecto estas estrictas exigencias, ya que sólo se efectuaron determinaciones cada ocho días; de este modo dentro de un transcurso de diez días, en que habitualmente se tasa el período de portación de gérmenes, sólo podían caer una o a lo más dos determinaciones, nunca tres. Recientemente, sin embargo, F. K. FISHER (1944) entre 25 portadores sanos de bacilos sólo encontró cuatro que al cabo de tres semanas estuvieran completamente exentos de bacilos, y la gran mayoría tardaron de cinco a ocho semanas en dar resultado negativo en el análisis bacteriológico de los bacilos. Hay que decir, no obstante, que el material de FISHER era pequeño (25 portadores sanos y 103 convalecientes), de modo que se requieren nuevas observaciones, tanto más cuanto que los datos de FISHER indican que también los portadores convalecientes en más del 60 por 100 de los casos seguían infectados largo tiempo, lo que era de esperar de los promedios (catorce a veinte días) obtenidos por P. HARTLEY y MARTIN (1919/20), F. SCHULZ (1942), F. H. THOMSON, E. MANN y H. MARINER (1928/29) de un material mucho más rico. Sin embargo, según mi experiencia y la de otros observadores, un período de portar gérmenes que se extienda a varios meses o incluso años se observa casi exclusivamente en los convalecientes de difteria; cuando en un portador sano se tropiece con un período que sobrepase tanto el promedio, hay que pensar siempre si no existirá o ha existido una rinitis diftérica o una angina benigna, procesos que, en ocasiones, pasan inadvertidos.

C. G. GUTHRIE, J. GELIEN y W. L. MOSS (1920) inocularon en la faringe a cinco personas sanas, que en el transcurso de catorce días de análisis diario habían demostrado carecer de bacilos diftéricos, un cultivo no tóxico que no podía distinguirse de las estirpes formadoras de toxina, ni morfológicamente ni mediante colorantes, y pudieron observar que parte de personas investigadas se convertían en portadores sin enfermar de difteria. Como por otra parte GUTHRIE, MARSHALL y MOSS (1921) habían conseguido portadores de bacilos diftéricos virulentos (toxigénicos), resulta claro que la colonización de los gérmenes en el istmo de las fauces es independiente de la capacidad de formar veneno del *C. diphtheriae*. Las observaciones efectuadas en portadores naturales confirman estos resultados experimentales. En los frotis de faringe de portadores sanos y convalecientes se encuentran bacilos diftéricos "virulentos" (es decir, patógenos para el cobayo) y "avirulentos", y además se ha comprobado que la vacunación con toxoide diftérico no parece influir sobre la

aparición de infecciones latentes ni sobre su duración y que pueden ser portadores de bacilos diftéricos patógenos, tanto los individuos SCHICK negativos, como los positivos. A continuación damos algunos casos.

C. CHIAROTTI (1939) examinó frotis de mucosa faríngea de 1.830 niños de las escuelas elementales y de asilos infantiles; 856 se vacunaron con toxoide diftérico, y 974 quedaron sin vacunar. En ambos grupos se encontraron bacilos diftéricos en un porcentaje aproximadamente igual (24,40:23,11), y de las estirpes aisladas, la misma proporción de patógenas para el cobayo ("virulentas"), debiéndose hacer notar que se consideraron virulentas no sólo las que mataban al cobayo en pocos días, sino las que producían el mismo efecto al cabo de más tiempo. GARRIDO-MORALES y O. C. MANDRI (1931) estudiaron tanto bacteriológicamente como por la prueba de SCHICK, en San Juan, la principal ciudad de Puerto Rico, tres cursos de una escuela pública, y en los 642 escolares encontraron estos notables resultados:

TABLA 18

	Bacilos diftéricos virulentos.	Bacilos diftéricos avirulentos.	Exentos de bacilos.	Total.
Schick-negativos.	5	17	426	488
Schick-positivos.	3	20	169	194

De ellos se deduce que entre los niños SCHICK positivos se encuentran casi tantos portadores de bacilos diftéricos virulentos (en proporción incluso más) como entre los SCHICK negativos, y que en ambos grupos la proporción entre los portadores de bacilos virulentos y los de avirulentos era casi idéntica. SHELDON F. DUDLEY expuso, en 1932, un informe general sobre una larga investigación acerca de los portadores de bacilos que fué emprendida sobre 1.000 muchachos de la Royal Naval School de Greenwich y continuada desde 1922 a 1930. Sólo la mitad de los cultivos obtenidos resultaron virulentos; pero observó que los muchachos que anteriormente poseían bacilos virulentos, en investigaciones posteriores resultaban portadores de gérmenes avirulentos, de lo que DUDLEY deduce que los bacilos virulentos se transforman en avirulentos en la mucosa del portador, proceso que, según las investigaciones de M. J. CROWELL (1926), debe concebirse como una selección de lugar. Los portadores de bacilos diftéricos avirulentos se encuentran con doble frecuencia en los mu-

chachos SCHICK positivos que en los SCHICK negativos; los portadores de bacilos virulentos (prescindiendo de pocas excepciones) eran SCHICK negativos. Pero lo notable, aunque en mi opinión no incomprendible, parecen ser los datos de DUDLEY, según los cuales en el verano los casos en que pueden descubrirse bacilos diftéricos patógenos para el cobayo son proporcionalmente más frecuentes que en el invierno. De las mismas observaciones, SH. F. DUDLEY, P. M. MAY y J. O. FLYNN (1934) llegaron al convencimiento de que los individuos vacunados podían ser portadores de bacilos diftéricos virulentos. Teniendo en cuenta que numerosos autores, fundándose en los trabajos de J. S. ANDERSON, HAPPOLD, MCLEOD y THOMSON (1931), han intentado establecer un nexo causal entre la gravedad de la difteria y los tipos de bacilos diftéricos (*gravis*, *mitis*, *intermedius*), se ha investigado también el tipo a que pertenecen los bacilos diftéricos de los portadores de gérmenes. H. OTTO y G. MITTAG (1937) observan en portadores sanos los tipos *intermedius* y *gravis*, y F. K. FISCHER (1944) publicó recientemente una estadística no muy rica, pero instructiva, en que no sólo recoge el tipo de los bacilos, sino su patogenicidad para el cobayo.

TABLA 19

Bacilos diftéricos de portadores sanos (según F. K. FISCHER).

Tipos.	Número de casos.	Prueba en animal.		Duración.		Vacunado.
		+	-	Tres semanas.	Más de tres semanas.	
Gravis.....	7	7	0	0	7	2
Mitis.....	17	4	13	3	14	4
Intermedius ...	1	1	0	1	0	0
TOTAL....	25	12	13	4	21	6

Bacilos diftéricos patógenos para el cobayo se encontraron, por consiguiente, en los portadores de los tres tipos, y la vacunación protectora no ofreció ninguna defensa para el cobayo frente a la infección latente por estirpes muy virulentas del tipo *gravis*.

Ya se ha señalado el hecho (véase pág. 177) de que, con frecuencia, el pasar la enfermedad de la difteria no trae como consecuencia el cambiar la reacción de SCHICK de positiva en negativa, y que si se determina directamente la antitoxina al comienzo y en los primeros estadios de la enfermedad, y después de terminada la convalecencia.

no se observa muchas veces ninguna formación de antitoxina. Considerando estos hechos, debe plantearse la cuestión de por qué las infecciones latentes actúan en las multitudes de modo mucho más seguro y ávido. ¿No existe la posibilidad de que en la interpretación de los fenómenos epidemiológicos se considere causa lo que es efecto, es decir, que, como FR. V. GROER y K. KASSOWITZ (1919, pág. 361) expresan, "los portadores de bacilos no explican la inmunidad natural, sino al contrario"?

H. HIRSZFELD, L. HIRSZFELD y H. BROCKMAN (1924) y H. HIRSZFELD y L. HIRSZFELD (1927) pretenden demostrar que la antitoxina diftérica se produce espontáneamente sin la acción inmunizante de toxina, ya que, según ellos, este anticuerpo, sin lugar a duda, se hereda del mismo modo que las isoaglutininas del suero humano. Según las observaciones de estos autores, los niños que proceden de padres SCHICK negativos son SCHICK negativos, prescindiendo de los primeros tiempos después del nacimiento; por el contrario, si ambos padres son SCHICK positivos, los hijos también lo son y así permanecen durante toda la vida; por último, si un padre es SCHICK positivo y el otro SCHICK negativo, nacen hijos de las dos clases, que pertenecen, tanto los positivos como los negativos, al mismo grupo sanguíneo que aquél de sus progenitores que tiene su misma reactividad en la prueba de SCHICK. Con ello se tiene la impresión de que efectivamente la antitoxina diftérica natural se desarrolla según una base hereditaria y de que los genes para este anticuerpo y para los grupos sanguíneos y para las isoaglutininas, se heredan apareados. E. ROSLING (1928), en 50 niños apropiados para esta comparación, no pudo, sin embargo, observar ninguna relación genética entre el grupo sanguíneo a que pertenecían y la reacción de SCHICK; entre los 50 niños 23 poseían la misma reacción de SCHICK que el antepasado con el mismo grupo sanguíneo, mientras que los otros 27 se comportaban del modo contrario. ROSLING, por ello, opina que esta particularidad del material de HIRSZFELD era enteramente casual. Esta objeción, sin embargo, no excluye que participen influencias hereditarias en la formación de la antitoxina diftérica natural; esta herencia tal vez no esté copulada con los genes de los grupos sanguíneos ni tiene tampoco necesariamente que poseer un gene mendeliano.

A. JUDE (1939) emprendió ensayos en una dirección contraria. Determinó el contenido de la antitoxina en el suero sanguíneo de 12 portadores sanos no vacunados contra la difteria, tanto en el día de la determinación bacteriológica como al darles salida del hospital. El intervalo osciló entre seis y veinticuatro días. Ninguno de los porta-

dores ofrecía en el momento de su primera sangría un título más bajo de 1/30 U. A.; en siete, el nivel de antitoxinas se mantuvo invariable; cinco ofrecieron elevación del contenido de antitoxina en la sangre. Parecían sin influencia la duración del intervalo entre el primero y el segundo análisis y la concentración de antitoxina en la valoración primera. No se examinó si los bacilos diftéricos encontrados en la faringe de los portadores eran toxigenos, y en caso de serlo, en qué grado, de modo que no puede afirmarse si el aumento de antitoxinas observadas en cinco portadores era debido a una infección latente.

Si citamos los trabajos de HIRSZFELD y los de JUDE, a pesar de no aportar ningún resultado, se debe a que su posición contrapuesta expresa el doble planteamiento posible del problema. Incluso en la ponderada exposición hecha en la obra de W. W. C. TOPLEY y WILSON [1946, págs. 1076 a 1084], el problema del origen de la antitoxina diftérica en el suero de los hombres sanos se formula como una disyuntiva; es decir, como si este anticuerpo hubiera de producirse de modo específico por inmunización o de modo endógeno inespecífico. Sin embargo, el origen específico y el inespecífico no se excluyen entre sí. Las isoaglutininas del hombre se producen de modo hereditario sin la cooperación del correspondiente isoaglutinógeno; pero en cuanto lo permite la compatibilidad con el grupo sanguíneo, se intensifican mucho por inmunización (véase pág. 110). Tal vez se den relaciones análogas en la antitoxina diftérica natural. SH. F. DUDLEY (1923 a 1926) ha comunicado la observación según la cual en comunidades relativamente aisladas (escuelas) sobre las que pasan varias olas de difteria, con cada una de ellas aumenta el tanto por ciento de individuos SCHICK negativos; TOPLEY y WILSON (obra citada, pág. 1083) opinan que este hecho ofrece "quizás la prueba más decisiva (*most conclusive evidence*) en favor de la influencia del medio y de la infección", y también en favor de la actividad de factores exógenos. Esta opinión puede considerarse válida, pero con la limitación de que el contenido de antitoxina en la sangre de personas que ofrecen el cambio de la reacción de SCHICK positiva en SCHICK negativa ha sufrido una exaltación indeterminada. La afirmación de que infecciones latentes ligadas a toda ola de difteria sean la causa de esta exaltación, ya es, en sentido estricto, una afirmación hipotética. Pero ante todo hay que tener en cuenta que, en el suero de los individuos SCHICK negativos, también existe antitoxina en concentración variable, de modo que *la exaltación observada pudiera consistir en una adición de antitoxina producida por inmunización a*

la que ya existiera previamente, de origen fisiológico. De este modo se precisa la médula del problema: se debe aducir la prueba de que existen, efectivamente, dos formas de antitoxina diftérica que sólo difieren por su génesis.

Para proceder de modo riguroso se deben elegir individuos sin bacilos diftéricos y con una concentración de antitoxina en el suero lo más reducida posible (es decir, no con personas simplemente SCHICK negativas), y abandonarlos largo tiempo en un medio en que esté excluido todo contacto con portadores de bacilos. Durante esta primera fase experimental libre de contactos debe determinarse con frecuencia el contenido de antitoxina en la sangre para llegar a conclusiones acerca de la posibilidad de una formación de antitoxina sin infección, y con el fin de evitar todo error, en este período debe vigilarse también permanentemente la ausencia de bacilos. Después de transcurrida esta primera fase, en esta colectividad seleccionada y distribuida en partes aisladas se introducen portadores de bacilos (unos de gérmenes tóxicos y otros no tóxicos); a continuación se observa cómo influye la presencia de los portadores sobre el hallazgo de bacilos y sobre el contenido de antitoxina en sangre de los individuos hasta entonces aislados. Además, en este experimento epidemiológico hay que asegurarse previamente de que no participa ningún hombre con historia específica (al menos en forma de haber padecido la difteria). El simple esbozo de este experimento indica que no es compatible con la ética médica y además que es impracticable. Por consiguiente, hay que contentarse con los datos que nos ofrezca la marcha de las epidemias naturales. A continuación referiremos los resultados más importantes; hemos recogido todos los que pudieran demostrar la formación de antitoxina diftérica sin infección.

Por ejemplo, P. HEINBECKER e IRVINE-JONES (1928) comunican que de 49 esquimales sólo 12 reaccionaban de modo positivo en la prueba de SCHICK; 37 daban reacciones negativas, a pesar de que la difteria no existe entre los esquimales. En tres de los sueros de los esquimales con reacción negativa se demostró contenido de antitoxina. Los autores llegan a la conclusión de que la inmunidad de los esquimales para la enfermedad y la reacción de SCHICK negativa se debe a la posesión de antitoxina, y que ésta se debe a una *inmunidad hereditaria natural* que depende de un cierto *mecanismo inespecífico antitóxico*. Sin embargo, en 1931, P. HEINBECKER, en colaboración con J. R. WELLS [véase WELLS y HEINBECKER (1931)], llegaron a la opinión opuesta de que la inmunidad contra la difteria en los esquimales debe producirse por el mismo mecanismo que en los habi-

tantes de otras comarcas, a saber, por una producción de antitoxinas desencadenada de modo específico. Este cambio de opinión fué debido a que de la faringe de 115 esquimales pertenecientes a todas edades, en 48 casos pudieron aislar bacterias morfológicamente semejantes a los bacilos diftéricos. Pero sólo una única estirpe manifestó las reacciones fermentativas del *Cl. Diphtheride*; sólo a grandes dosis poseía una pequeña toxicidad, ya que 1 ml. de caldo de cultivo de cuarenta y ocho horas tardaba diez días en matar al cobayo. En una segunda serie [J. R. WELLS y P. HEINBECKER (1932)] cultivaron 214 estirpes procedentes de la faringe de esquimales, las cuales 34 eran semejantes al diftérico; pero ninguno de estos casos hubo posibilidad de conseguir de los medios de cultivo la toxina diftérica específica, de modo que se pusiera de manifiesto en pruebas con animales. Por ello, indudablemente, no parece justificado admitir, con WELLS y HEINBECKER, que la causa más probable de la formación de antitoxina en el esquimal sea una infección latente. De los esquimales en edad entre tres y dieciocho años, no menos del 62 por 100 eran SCHICK negativos, lo que, incluso si se quiere tomar como índice numérico de la infección latente, está en contradicción con el único hallazgo bacteriológico, además dudoso (consúltese pág. 172). Tampoco se ha reflexionado sobre el hecho de que otro grupo del mismo número de esquimales de dieciocho años ofreciera el mismo tanto por ciento de individuos SCHICK negativos (61 por 100), lo que no armoniza con la idea de una epidemia *en marcha*. Se determinó directamente el contenido de antitoxina en el suero de 39 esquimales. Los valores obtenidos, como suele suceder en los anticuerpos naturales, eran en general bajos (0,01 hasta un valor máximo de 0,25 U. A.); en 18 casos la sangre parecía exenta de antitoxina, lo que probablemente hay que atribuir a que el método de valoración aplicado no era apropiado para descubrir concentraciones más bajas de 0,01 U. A.

F. K. KLEINE y H. KROÓ (1930) examinaron 101 aborígenes africanos de la comarca del lago Tanganica, mediante la prueba de SCHICK; entre las personas investigadas se encontraban 95 niños entre seis y quince años. "En ningún caso se observó ninguna reacción." Como KLEINE se "admiró extraordinariamente" de este resultado totalmente negativo, envió la muestra de toxina utilizada por correo aéreo a Berlín para comprobar si su actividad no había sido perjudicada por el trópico; pero se comprobó que conservaba su capacidad letal. A continuación tomó las muestras de sangre de 11 aborígenes y envió el suero a Berlín para que se determinara su contenido de antitoxina; dos sueros contenían más de 1 U. A.,

uno contenía 1 U. A.; tres sueros, 0,05; dos, 0,1, y tres, 0,05 U. A.; es decir, cantidades que se consideran como completamente suficientes para dar resultado negativo al efectuar la prueba de SCHICK. El porcentaje extraordinariamente alto de individuos SCHICK negativos entre las razas de negros africanos se ha confirmado también por otros autores, entre ellos O. FISCHER (1932), G. NEUJEAN (1937), G. RAMON y P. NÉLIS (1935), E. JENSEN (1938), E. GRASSET, PERRET-GENTIL, J. FRIEDMAN y GROSS (1933), J. F. MURRAY (1942, 1943). También coinciden los autores en que los negros de Africa padecen rara vez una difteria clínicamente típica [H. F. KLEINE y KROÓ (1930), E. JENSEN (1938), SALEUN, BORDES, CECCALDI y PALINACCI (1938), G. KINNEARD (1935), GRASSET y colaboradores (1933), F. K. KLEINE (1940), J. F. MURRAY (1942, 1943)]. Parece que las circunstancias epidemiológicas entre los negros africanos resultan más complicadas que entre los esquimales. Según las informaciones de E. BAYSMITH (1929), los esquimales en su comercio no salen de un círculo completamente libre de difteria; pero con ocasión de dos focos infecciosos en puertos de Groenlandia se observó que los niños de los esquimales pueden enfermar de difteria como los de cualquier otra raza. Los niños de los negros africanos, por el contrario, enferman rara vez de difteria también cuando, en las ciudades, están en contacto permanente con la población blanca, como lo demuestran los niños de los negros bantús en Johannesburgo y comarca (J. F. MURRAY) o los negros de Brazzaville (SALEUM y colaboradores). GRASSET y sus colaboradores efectuaron pruebas continuadas en los niños de los negros bantús y pudieron comprobar que el 47 por 100 de las pruebas resultaban positivas hasta edad de tres años; pero como las enfermedades clínicas tampoco se observan en este primer período de la vida [F. K. KLEINE (1940)], deduce que la raza negra "posee una resistencia natural para la enfermedad, que es independiente del contenido de antitoxina en la sangre". En consideración a la importancia teórica y práctica de esta frase, que pone en entredicho nuestra opinión acerca de la esencia de la inmunidad antiinfecciosa de la difteria, deben comprobarse las observaciones expuestas, de modo cuidadoso y en un número de casos suficientemente grande.

Casi todos los autores que han analizado las investigaciones concernientes a este asunto consideran el hecho de que entre los niños de los negros africanos se encuentre un tanto por ciento tan alto de SCHICK negativos como debido a una infección latente (subclínica). La base objetiva de esta hipótesis la constituyen informes según los cuales entre la población negra se ha podido comprobar la presencia

de portadores de bacilos diftéricos virulentos que en ocasiones constituye un tanto por ciento que no baja de los promedios observados entre las poblaciones nórdicas. Las investigaciones bacteriológicas en niños negros de Baltimore dieron un 1,75 por 100 de resultados positivos [J. A. DOULL y W. T. TALES (1923)]; en Puerto Rico 1,4 por 100 [E. GARRIDO-MORALES y O. C. MANDRY (1931)]; en Nassau, en las Bahamas, el 1,3 por 100 [G. KINNEARD (1935)]; en los niños de Johannesburgo en tiempos de epidemia, el 1,8 al 3,2 por 100 [J. F. MURRAY (1943)]; por último, P. S. HUNTER (1930) encontró en la secreción nasofaríngea de 1.100 cadáveres de niños negros muertos en Singapur, hasta en .43 casos, bacilos diftéricos (3,8 por 100). En estos casos, sin embargo, se trata de poblaciones constituídas por mezclas de razas entre las cuales la negra sólo constituye una parte más o menos numerosa, e incluso en estas circunstancias, el número de portadores no siempre es tan alto como en los ejemplos citados; así, en los negros de Brazzaville el descubrimiento de bacilo diftérico en la faringe de hombres de color es muy rara, según el testimonio de SALEUN y colaboradores. La investigación de la flora faríngea específica de negros en contacto nulo o escaso con población blanca sólo se ha investigado en un número insuficiente de casos; y no se trata de si los negros que están en contacto con hombres infectados de otras razas puedan captar el germen específico, sino de la frecuencia de portadores entre los negros en todos aquellos casos en que la enfermedad sea desconocida o rara y el contenido de antitoxina esté muy extendido, incluso cuando no exista contacto con otras razas. Si en estos casos también pudiera darse respuesta afirmativa, habría que explicarla admitiendo que la epidemia latente marcha por sí sola. F. K. KLEINE y también E. JENSEN admiten que este punto importante no está resuelto. Esta inseguridad se pone de manifiesto claramente en las publicaciones. Cuando se prescinde gustosamente del aporte de pruebas, aparecen constantemente nuevas hipótesis, de las que ERIKA JENSEN (1938) reúne un muestrario aleccionador. Encuentra, por ejemplo, la afirmación de que las formas "virulentas" de los bacilos diftéricos pueden transformarse en los trópicos en tipos "avirulentos", y que esta transformación debe ser reversible, y que los tipos "avirulentos" también inmunizan de modo que la inmunidad contra la difteria en los trópicos se debe a brotes epidémicos violentos y frecuentes que transcurren sin apreciarse [*Rapport epidem. mens., League of Nations* (1929), etc.]. Recientemente, MURRAY (1942) opina que el elevado porcentaje de negros bantús SCHICK negativos que se observan en Africa del Sur tal vez se deba, al menos en parte,

a influencias de ambiente, es decir, a factores inespecíficos, y que lo raro de la enfermedad, a pesar del número de portadores relativamente alto, pudiera deberse a una capacidad tal vez condicionada por la raza de responder a todo estímulo específico con la producción de antitoxina.

Otro ejemplo. La isla Kolgujew se encuentra a 69° de latitud Norte y está habitada por un grupo de Njenzedos (samoyedos), que está poco en contacto con la población del continente. W. N. ASBELEW y A. A. MARGO (1932) descubren en sus investigaciones que no hay casos de difteria ni de escarlatina. De 103 personas en edad entre ocho meses y ochenta años, 102 dieron una reacción de SCHICK negativa, y sólo una muchacha de ocho años dió resultado positivo: la reacción de DICK, con excepción de un único resultado dudoso, fué siempre negativa. Este resultado no debe considerarse debido a una capacidad reaccional condicionada por la raza, como se deduce de que entre los samoyedos de Nowaja Semlja ha podido observarse cierto número de reacciones de SCHICK y de DICK positivas. Se analizaron frotis faríngeos de 168 personas de la isla de Kolgujew y 93 muestras de secreción nasal; en ningún caso pudo descubrirse bacilos diftéricos, y sólo en cuatro (tres en frotis de faringe y uno en moco nasal) se encontraron estreptococos hemolíticos. Mientras que TOPLEY y WILSON (1946, pág. 1081) hacen constar que parece difícil poner de acuerdo estos resultados con la concepción de que la antitoxina se produce sólo, o de modo predominante, a consecuencia de una infección, ASBELEW y MARGO deducen de sus observaciones la sorprendente conclusión de que, aunque ellos no quieren tomar una posición definitiva frente a sus resultados, "en lo que menos creen es en una formación espontánea de los anticuerpos". Esto significa que no consideran de modo objetivo lo descubierto, sino que quieren sostener el principio de "sin infección no hay inmunidad", aunque los hechos hablen en contra [compárese la crítica de E. FRIEDBERGER (1931)]. De hecho, RAMON (1936) considera superfluo el aporte de pruebas epidemiológico-estadísticas, fundándose en que los anticuerpos se forman más o menos directamente a partir del antígeno, y que la antitoxina siempre contiene un resto antigénico (un "radical" del antígeno), de modo que queda excluida toda formación que no sea específica. Sin embargo, la teoría de que los anticuerpos se originan del antígeno se desechó antes de 1936 por R. DOERR y H. FRIEDLI (1925), E. BERGER y H. ERLNMEYER (1932, a, b), S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1932), E. WOLLMANN y M. BARDACH (1935), de manera indiscutible; de modo que también, desde este punto de

vista, es equivocada la conclusión de RAMON. También G. KINNEARD (1935) ha tomado, aunque en otro sentido, su posición facilitada por una formulación apodíctica, partiendo simplemente de suposiciones indemostradas o incorrectas, a saber, que una reacción de SCHICK negativa no provocada por una vacunación protectora, señala que han debido producirse una o más infecciones que, cuando no se recuerda haber sufrido la difteria, han debido poseer carácter subclínico. Afirmación que se contenta con apoyar en la posibilidad de tales infecciones subclínicas, es decir, en el curso de tales infecciones mediante portadores.

Es cierto que la confianza en los datos que hablan de la rareza de los casos de difteria en contraste con el gran portentaje de individuos SCHICK negativos, en grupos de población relativamente aislados, ha sido debilitada por muchas comprobaciones ulteriores. E. SMITS (1926) se refiere al ejemplo de los javaneses de las Indias Holandesas. que rara vez enferman de difteria, y, en cambio, entre 600 javaneses sólo el 2 por 100 de hombres y el 8 por 100 de mujeres dan resultado positivo en la prueba de SCHICK; ahora bien, de los niños examinados, en cambio, el 41 por 100 eran positivos, de modo que se adquiere la impresión de que el número de individuos SCHICK negativos crece con la edad, en el sentido de una "maduración serológica", sin que aumente el estímulo específico. L. KIRSCHNER (1929), que ha seguido el curso de la difteria en el distrito de Preanger, en Java, desde 1921 a 1929, afirma, sin embargo, que la difteria misma no es tan rara, ya que contribuye de modo considerable a la mortalidad infantil, y que además aparece con gran frecuencia en formas benignas. Estas afirmaciones, sin embargo, no se han establecido de modo objetivo y con respecto al proceso epidemiológico investigado, sino de modo general, es decir, como si se aceptaran todas las observaciones (incluso las que no están establecidas con exactitud), siempre que contribuyeran a impugnar la teoría de la formación inespecífica de la antitoxina. En muchas ocasiones tampoco se ha establecido seriamente si el número de casos de difteria manifiesta y de infecciones latentes era suficientemente para considerar verosímil una inmunidad por contagio, ni si los bacilos difteroides aislados de la tráquea de los portadores poseían propiedades coincidentes en todos los respectos con las del *C. diphtheriae* y ante todo si eran toxígenas. Así se presentan los hechos para todos los que no quieren adscribirse a un partido: *Adhuc sub iudice lis est.*

Este capítulo pudiera terminar recogiendo una observación que, en sentido estricto, no pertenece al tema de los anticuerpos natu-

rales, pero que parece estar en estrecha relación con las discusiones acerca de la existencia de una antitoxina antidiftérica natural. La prueba de SCHICK se utiliza como criterio del estado de inmunidad del individuo, y según el tanto por ciento de los individuos SCHICK negativos, se juzga del estado de inmunidad de las diferentes clases de edad, razas humanas y grupos de población relativamente aislados o en comercio continuo. Ahora bien, la prueba de SCHICK no ofrece sino una determinación indirecta de la concentración de antitoxina en la sangre, apropiada para una investigación en masas humanas, lo que no siempre se ha comprendido al aplicarla, a pesar que difieren considerablemente las opiniones acerca de la exactitud con que refleja un determinado nivel de antitoxina. Pero, además, tanto la prueba de SCHICK como la titulación directa de la antitoxina en el suero, no hacen sino determinar la antitoxina, y es hipotético afirmar que los títulos encontrados ofrezcan una medida adecuada de la inmunidad. Se fundan en la concepción de que la difteria sea, esencialmente, efecto de la toxina específica del *C. diphtheriae*, más o menos neutralizada por la antitoxina, concepción en la que se fundan la terapéutica y la profilaxis (vacunaciones antitóxicas pasiva y activa). La difteria, sin embargo, no es un envenenamiento en el sentido estrecho de la palabra (se designa también como "toxicosis bacteriana"), sino una enfermedad infecciosa transmisible. El fundamento de la inmunidad para la difteria se aclara inmediatamente si se compara con otra enfermedad: el sarampión. Cualquier hombre que no haya sufrido el sarampión puede padecerlo cualquiera que sea su edad; al contrario, la transmisión del sarampión proporciona una firme protección contra una segunda enfermedad, que dura toda la vida. El contagio es extraordinariamente fácil, y cuando en una casa enferma un niño, infaliblemente enferman todos los niños que no han pasado todavía la enfermedad. Si a un niño ya infectado se administra la vacuna protectora contra el sarampión entre los tres y seis días de haberse producido el contagio, o desaparece la enfermedad por completo o se manifiesta, pero de modo abortivo (equivalente de sarampión); la protección que ofrece el sarampión así vencido en estado naciente no protege contra las nuevas infecciones de modo tan seguro y duradero como los casos clínicos típicos de curso libre. Por el contrario, la difteria es una enfermedad cuya frecuencia, incluso en los países en que es endémica, depende de la edad de la vida. Como se deduce de la figura 12, el máximo de morbilidad se encuentra entre los tres y los cinco años (según los datos de A. HOTTINGER, la cima está algo más desplazada hacia la derecha); de cinco a diez años disminuye la fre-

cuencia lentamente; de los diez a los quince, rápidamente, y pasados los quince años, la probabilidad de enfermar de difteria es sólo mínima. De pasada señalemos que, según los numerosos datos de A. ZINGHER (1923), los individuos de diez a once años dan aún prueba positiva en el 29,3 por 100 de los casos, y entre los quince y dieciséis años, en el 17,8 por 100, edades que no participan en la proporción correspondiente en la morbilidad por la difteria. Tampoco enferman en el período de máxima morbilidad todos los niños expuestos al contagio. J. MOLDOVAN, en su magnífico estudio acerca de la "transmisión familiar en la difteria" (1926), fué el primero en señalar que, en familias con muchos niños, es poco frecuente que enfermen dos o más de difteria, aunque por la edad ofrezcan la predisposición máxima, a pesar de que la probabilidad de infectarse con difteria nunca puede ser tan grande como en una misma casa donde crecen varios niños. Como esta observación se oponía a las opiniones dominantes en su tiempo, se hicieron comprobaciones estadísticas que comprendían más de 50.000 casos; según ellos, sólo el 2,9 por 100 de los casos de difteria deben considerarse como producidas por contactos familiares. El papel que juega la receptibilidad individual se manifiesta también en un hecho que, aunque bien conocido, no se tiene en cuenta o se menciona sólo de pasada incluso en las exposiciones más extensas del problema epidemiológico de la difteria: el hombre puede enfermar dos o más veces de difteria, y estos casos no son raros. K. ZUCKER (1905) ha observado que de 2.303 niños, estudiados en los años de 1901 a 1905, 21 (lo que corresponde al 0,9 por 100) habían vuelto al hospital con una segunda difteria bacteriológicamente comprobada. El intervalo entre una y otra enfermedad oscila entre uno y cinco meses y medio, y el curso de la segunda afección no fué más benigno que el de la primera. El 0,13 por 100 enfermó una tercera vez, y M. KARASAWA y B. SCHICK han podido observar incluso una cuarta enfermedad. Las cifras dadas por ZUCKER, como ha señalado R. DOERR (1932), no son de ningún modo bajas, sino extraordinariamente altas. La probabilidad de pasar por segunda vez una enfermedad es, sin excepción, en todas las infecciones, mucho menor que por la primera, y en difteria de modo más acusado, porque la predisposición para la enfermedad se limita a un período relativamente breve de la vida del individuo, y en esta clase se reduce aun a un determinado tanto por ciento de los individuos. H. ZISCHINSKY (1934), que estaba también convencido de que un niño que haya padecido una vez la difteria no se comporta de modo distinto al sufrir por

segunda vez la enfermedad, deduce como consecuencia lógica que la difteria no confiere inmunidad.

Refiriéndonos al apartado que sigue debemos tal vez mencionar que en el tétanos traumático se dan circunstancias análogas, en muchos respectos, a las observadas en la difteria. Las determinaciones de antitoxina en la sangre de los enfermos y convalecientes dan valores muy bajos, especialmente cuando se trata de individuos que no han sido tratados con sueros curativos antitóxicos [C. NOEGGERATH y E. SCHOTTELIUS (1915), O. LÖWY (1915), M. EISLER (1928)]. El hecho de que la cantidad de antitoxina formada en el curso de la enfermedad y al terminar ésta sea habitualmente muy pequeña, se manifiesta también en que no son raros los casos de recaída, que, aunque algunas veces transcurran con menos gravedad, en ocasiones tienen un curso mortal [L. BÉRARD y A. LUMIÉRE (1925), M. GROSSMANN (1917), HAPPEL (1915) y otros]; A. HART (1942) señala que tales recaídas pueden deberse a una nueva infección. En el tétanos, como en la difteria, no parece que sufran la infección todos los individuos que se exponen a ella, lo que en este caso significa que los bacilos o esporas tetánicas pueden encontrarse en las heridas sin que aparezcan los síndromes patognómicos de la acción de la toxina. La observación de que los jardineros, que han de ensuciarse frecuentemente heridas con tierra del jardín abonada y que, por lo tanto, están sumamente expuestos al contagio, sólo enferman rara vez de tétano traumático [A. HART (1942)], ofrece un apoyo epidemiológico para esta opinión; y, además, las infecciones de tétanos latentes demuestran que estas bacterias pueden introducirse en los tejidos, y mantenerse en ellos sin crecer, hasta que una operación aséptica efectuada meses o años después estimula de modo inespecífico el desarrollo de los gérmenes depositados, dando lugar al desencadenamiento de un tétanos grave, que la mayor parte de las veces termina con la muerte [consúltese R. DOERR (1942, pág. 111)].

b) *Antitoxina tetánica en el suero normal.*

a) *Sueros animales.*

La antitoxina tetánica fué descubierta por P. H. RÖMER (1908/1909) en el suero de bovinos. Este descubrimiento fué confirmado por G. RAMON y E. LEMETAYER (1933/1934), E. VALCARENCHI y R. RICHOU (1933) y J. POCHN (1936) y, además, RAMON y LEMÉTAYER (1934, 1935) lo observaron también en otros bóvidos (cebu y búfalo)

y además en diferentes rumiantes, camellos, dromedarios, ovejas y cabras. La concentración de la antitoxina tetánica resulta siempre máxima en el suero bovino, mientras que los sueros de oveja y de cabra sólo ofrecen indicios. En la sangre de otros numerosos animales investigados nunca ha podido descubrirse antitoxina tetánica. RAMON y LEMÉTAYER (1935) comunican resultados negativos en monos, conejo, cobayo, rata y gallina; R. RICHOU y G. TORRISI (1933), en perros y cerdos, y fracasaron, en especial, todos los esfuerzos para descubrirla en el suero de caballos no inmunizados [R. KRAUS (1923), J. B. BUXTON y A. F. GLENNY (1921), G. RAMON y R. DESCOMBEY (1927), WIGODTSCHIKOW, GEKKER y SCHUFER (1936), P. CONDREA, H. POENARU y G. DIMA (1937)], a pesar de haberse empleado en ocasiones métodos que permiten apreciar hasta 1/20,000 de U.A. [G. RAMON, R. DESCOMBEY y E. LEMÉTAYER (1931)].

Los bacilos del tétanos se han descubierto en las heces de caballos, bovinos, ovejas, perros, ratas y gallinas [S. TOLEDO y VEILLON (1891), W. NOBLE (1915), P. FILDES (1925), J. C. KERRIN (1929)]; las estirpes aisladas en la mitad de las investigaciones de KERRIN no eran tóxicas, pero en la mayor parte podía apreciarse la formación del veneno típico. Ahora bien, como la antitoxina natural sólo existe en el suero de bóvidos y de algunos rumiantes, resulta claro que su formación no puede atribuirse a la presencia de bacilos tetánicos en el intestino.

G. RAMON (1936) defiende, sin embargo, aquí como en todo lo que se refiere a los anticuerpos naturales, el punto de vista intransigente de que los anticuerpos no pueden producirse sin impulso antigénico específico (véase pág. 197); sugiere las investigaciones que sobre este asunto emprendió J. POCHON (1936 a, b), para intentar poner de acuerdo con esta afirmación fundamental la posesión por los bovinos de antitoxina tetánica. Ahora bien, POCHON pudo observar en la panza de la vaca bacilos tetánicos capaces de vivir, pero en su contenido líquido no pudo descubrir toxina; opina, por consiguiente, que aunque se forma toxina, ésta, debido a las propiedades fermentativas del *Plectridium cellulotycum*, que siempre se encuentra y que fermenta la celulosa, pierde la toxicidad. Esta destrucción de la toxina tetánica debe, según POCHON, proseguir hasta la formación de toxoide, cuya absorción origina la formación de antitoxina. Se demuestra fácilmente que la toxina tetánica líquida se desintoxica si se mezcla con el contenido líquido de la panza, o que un cultivo de tétanos en caldo pierde su acción venenosa si se siembra en él el germen capaz de fermentar; ahora bien, la toxina desintoxicada no posee las propiedades de un toxoide, ya que han dado siempre resultados negativos los intentos de vacunar conejos, ratones y cobayos con mezclas de toxina tetánica y secreción de páncreas. Así toda la prueba aducida fracasa en el punto decisivo, incluso prescindiendo de que la

absorción de un toxoide por la panza, además de ser en sí misma arbitraria, no puede demostrarse, siendo, pues, puramente hipotética.

β) *Suero humano.*

C. TENBROECK y J. H. BAUER afirmaron que la existencia de antitoxina tetánica natural en la sangre del hombre pudiera estar relacionada con la vegetación de bacilos tetánicos en vida saprofita en el intestino. Estos autores (1922) comunicaron después que en el 34,7 por 100 de muestras de heces de chinos de Pekín pudieron aislar una bacteria idéntica morfológicamente al bacilo del tétanos, y que en caldo con azúcar daba lugar a un veneno que mataba a los ratones, incluso a dosis de 0,001 ml., con la aparición de contracciones tetánicas, y que podía neutralizarse por la antitoxina del tétanos. Se dedujo que el bacilo en cuestión se multiplicaba en el intestino, ya que se seguía observando en las heces de los chinos después de un mes de alimentarlos con una dieta prácticamente estéril, a pesar de que la cantidad de esporas eliminadas en una sola deposición podía calcularse en varios millones. En una segunda comunicación (1923), TENBROECK y BAUER comunicaron que en el suero de 26 chinos con análisis bacteriológico de heces positivo podía descubrirse siempre antitoxina cuya concentración no podía titularse exactamente, pero siempre era lo suficientemente grande para neutralizar con 0,1 ml. de suero 10 dosis letales mínimas para el ratón. De 30 chinos con análisis bacteriológico de heces negativo, 2, sin embargo, poseían también antitoxina y el suero de varios aglutinaba los bacilos del tétanos; se admitió como probable que los individuos con suero capaz de aglutinar habían sido anteriormente portadores de bacilos tetánicos, y que las aglutininas persistían en la sangre más tiempo que las antitoxinas. TENBROECK y BAUER estaban convencidos que la formación de la antitoxina debía atribuirse a la multiplicación de los bacilos tetánicos en el intestino, y que los portadores de bacilos tetánicos adquirían una inmunidad activa contra la infección con el bacilo del tétanos, que encuentra su expresión epidemiológica en lo raro que es el tétanos entre los chinos.

Sin embargo, parecía notable que no se haya confirmado la presencia de cantidades dignas de mención de antitoxina tetánica en la sangre humana por ninguno de los autores posteriores. G. RAMON y G. ZÖELLER (1926, 1927 a, b), que no sólo han trabajado con hombres blancos, sino también con negros, annamitas, árabes, etc., no han obtenido sino resultados negativos, del mismo modo que E. COLEMAN y K. MEYER (1926), y E. T. H. TSEN y H. T. CHANG (1928), que han

estudiado el suero de 83 chinos; tampoco E. M. LINCOLN y CH. K. GREENWALD (1923), ni D. H. BERGEY y S. ELIS (1936), han podido encontrar nunca un contenido de antitoxina superior a 0,0001 unidades americanas por ml. de suero. Tampoco ha podido volverse a encontrar una infección tan permanente y masiva del contenido intestinal humano con bacilos tetánicos, como parece desprenderse de los casos de TENBROECK y BAUER, a pesar de que los trabajos citados de estos autores, publicados en el *Journal of Experimental Medicine*, despertaron la curiosidad general y forzaron las comprobaciones ulteriores. En las heces del hombre se han encontrado ocasionalmente bacilos tetánicos, lo que no es extraño, ya que, indudablemente, este germen puede tomarse con frecuencia con los alimentos crudos. Pero los descubrimientos positivos siempre han sido excepcionales, como se desprende de los datos de W. J. TULLOCH (1919-20) y de P. FILDES (1925), y muchos autores no encontraron, entre numerosas muestras, ni un solo resultado positivo; esto le sucede, por ejemplo, a K. SCHEUNEMANN (1931), con 50 deposiciones, y a J. C. KERRIN (1928, 1929), que investigó bacteriológicamente hasta 304 deposiciones de hombres adultos. También J. B. MAYER (1937) subraya que no ha podido descubrir nunca el bacilo tetánico en el intestino humano, mientras que por el mismo método se observa en un gran porcentaje de muestras de contenido intestinal de caballos o cobayos. La probabilidad de que el hombre tome por vía oral bacilos tetánicos o sus esporas, aumenta cuando se alimenta con alimentos crudos o está en íntimo contacto con animales (caballos) que eliminan este germen con sus heces, y contrasta con lo raro del descubrimiento del germen en las deposiciones o en el contenido intestinal del hombre, y esta oposición lleva a la conclusión de que el bacilo tetánico no puede multiplicarse en el intestino humano, sino que pasa en estado "latente" a través del tubo digestivo.

En favor de ello habla también un experimento efectuado sobre los autores mismos, que comunican TENBROECK y BAUER (1923). Uno de los dos, después de un período de acusado estreñimiento, tomó gran cantidad de esporas tetánicas maduras. Antes de tomar las esporas no pudo descubrir bacilos tetánicos en las heces, y, después de ingerirlas, aparecían abundantemente en las deposiciones. A los diez días, como se mantenía el estreñimiento tuvo que administrarse un purgante drástico, y, después de haber actuado, desaparecieron por completo los bacilos tetánicos de las deposiciones.

En muchos animales de experimentación parece, por el contrario, que los bacilos tetánicos ingeridos con la alimentación se multiplican

con relativa facilidad, como demuestran los experimentos de C. TENBROECK y J. H. BAUER (1923-24, 1926) en cobayos. En tales cobayos, transformados experimentalmente en portadores (y excretores) de bacilos, poco después de administrarles con la alimentación bacilos tetánicos aparecen aglutininas en la sangre que están conformadas específicamente para el tipo del bacilo tetánico ingerido; después se descubre también antitoxina, que al final del sexto mes alcanza un título de 0,05 unidades americanas por ml. de suero. Por último, los portadores se comportan como inmunes frente a la infección por el tipo administrado con el alimento, pero nada o muy poco resistentes frente a las inyecciones de toxina tetánica. Hay que notar que en los animales testigo, normales, se obtenían infecciones que regularmente conducen a un tétanos letal, por la inyección en la musculatura de una de las extremidades posteriores de un pequeño número de esporas lavadas (unas 1000) mezcladas con aleuronato. Lo que en los resultados de la prueba se expresa no es, pues, la inmunidad antitóxica, sino la inmunidad antiinfecciosa de los cobayos portadores de gérmenes. Además, los animales quedaban protegidos frente a la infección por el tipo de bacilo tetánico administrado, pero en cambio eran tan receptivos para los tipos no administrados como los cobayos normales; para conseguir una inmunidad de especificidad muy elevada, los animales de experimentación deben alimentarse con varios tipos de bacilos tetánicos. Sin embargo, a la luz de investigaciones posteriores, los experimentos no pueden considerarse completamente perfectos; hablando en sentido estricto, el título de antitoxinas se midió con ayuda de la toxina producida por el tipo de bacilo administrado con el alimento, y para establecer la resistencia frente al veneno de los cobayos portadores de germen se utilizó también ésta, y no una toxina cualquiera. Fundándose en recientes investigaciones acerca de la toxicidad de la toxina tetánica obtenida con diferentes estirpes y de su neutralización por antitoxinas, se han presentado dudas acerca de la homogeneidad y la identidad cualitativa de las preparaciones de toxina [G. F. PETRIE (1942-43), U. FRIEDEMANN y A. HOLLÄNDER (1943) (1)]. En las investigaciones de TENBROECK y BAUER no ha debido jugar esta circunstancia un papel especial. En todo caso se ha podido observar que el suero de los cobayos portadores de gérmenes alcanza a neutralizar la toxina utilizada en la prueba de resisten-

(1) El futuro nos dirá si los datos de estos autores se repiten en pruebas efectuadas con las toxinas muy purificadas obtenidas por M. J. PICKETT, HOEPRICH y GERMAN (1945), y L. PILLEMER, WITTLER y GROSSBERG (1946).

cia al veneno, y que no existe ninguna conexión causal entre la cantidad de antitoxina así determinada y la inmunidad "contra el tétanos", de modo que TENBROECK y BAUER tenían razones para hacer responsables de la inmunidad a otros anticuerpos, precisamente específicos de tipo. De este modo estas pruebas con cobayos tienen una doble importancia, primero, porque de ellas parece deducirse que la vegetación de bacterias tóxicas en el intestino puede conducir a la formación de antitoxina, y en segundo lugar, porque enseñan que también en el tétanos (que, aún más que la difteria, se tiende a considerar como una "toxicosis bacteriana") el proceso infeccioso y la inmunidad antiinfecciosa tienen cierta independencia, y que no todo el proceso puede reducirse a la acción de una exotoxina y al concepto de la inmunidad antitóxica. Sin embargo, los resultados de los experimentos en cobayos no coinciden con el comportamiento de otros animales, en especial del caballo. En el intestino de los caballos pueden multiplicarse colonias de bacilos del tétanos, y en el suero de 121 caballos investigados por P. CONDREA, H. POENARU y G. DIMA (1937) ha podido encontrarse regularmente aglutininas H para los tipos I a V de bacilos del tétanos, aglutininas cuyo título variaba entre 1:5 y 1:200. Por el contrario, no se encuentran nunca aglutininas que actúen sobre bacilos de tétanos no flagelados (aglutininas O, o somáticas), ni tampoco indicios de antitoxina. La falta de antitoxina se atribuye, por P. CONDREA y sus colaboradores, a que los bacilos tetánicos no pueden formar toxina en el contenido intestinal del caballo, o a que la toxina, aunque se produzca, pierde rápidamente su poder antigénico por las secreciones digestivas y los fermentos; no se aduce la prueba de que ambas opiniones correspondan a los hechos. Por lo demás, para explicar la inmunidad antiinfecciosa de los cobayos portadores de gérmenes no parece suficiente el débil contenido de antitoxina en su sangre, por lo que deben poseer anticuerpos antibacterianos, y éstos los posee tanto el caballo portador de gérmenes (según se deduce del ensayo de las aglutininas) como el cobayo portador; el caballo, sin embargo, es más sensible para la infección natural por bacilos tetánicos que cualquier otro animal.

Como se deduce de las consideraciones anteriores, el problema de la antitoxina tetánica natural aún no está decidido, aunque inicialmente muchos hechos parecían hablar en favor de una formación espontánea sin necesidad de estímulo antigénico de la toxina o de un toxoide. En otro lugar se ha señalado que la formación espontánea no excluiría la producción inmunizante; es decir, la inmunización criptogénica por bacilos que vegeten en el contenido intestinal.

c) *Pluralidad de las antitoxinas existentes en el suero normal de una especie animal.*

En el suero equino normal, además de la antitoxina diftérica, de la que ya se habló en otro lugar por extenso (véase pág. 170). P. EHRlich (1898) pudo descubrir sustancias que neutralizaban la lisina tetánica, y después G. RAMON, R. RICHOU y J. DESCAZEUX (1935), antitoxinas contra la toxina estafilocócica; RAMON, RICHOU, NICOL y LUPU (1936), contra la toxina del bacilo de Prisz-nocard, y M. GUILLAUME (1944), una antitoxina contra la toxina producida por el componente η del tipo A del *Cl. welchii*; el suero normal de caballo ofrece más rara vez una débil actividad antitóxica contra las toxinas de los tipos B, C y D del *Cl. welchii* y contra los venenos del *Cl. histolyticum*, *Cl. oedematiens* y *Cl. septicum* [M. GUILLAUME (1944)]. Análogos datos aportan las investigaciones del suero de otros animales; por ejemplo, RAMON, ERBER y RICHOU (1936) encuentran en el de los monos la antitoxina diftérica y estafilocócica (y precisamente en el suero de un mismo animal), y la misma consistencia de ambas antitoxinas fué establecida en el hombre por RAMON, RICHOU y DESCAZEUX (1935); la antitoxina del estafilococo abunda especialmente en la sangre de cobayos, conejos, ratas y ratón blanco, y, aunque excepcionalmente, también se ha descubierto en las palomas y gallinas [E. CARLINFANTI (1935), G. RAMON y R. RICHOU (1936), R. RICHOU (1936), H. BONNET, S. TIEFFRY y MONTEFIORE (1936), etcétera].

Estos datos, a pesar de que no representan sino un esbozo de la literatura concerniente al tema, resultan apropiados para impugnar la tesis de la formación de las antitoxinas exclusivamente por inmunización; tesis que G. RAMON y colaboradores han intentado defender con una suma de trabajo tan considerable. No es probable que una misma especie animal produzca a consecuencia de impulsos antigénicos ocultos tantas antitoxinas diversas, y aun menos probable que las más distintas especies, en parte regularmente y en parte de modo excepcional, estén expuestos a un estímulo antigénico idéntico. Esta impresión se refuerza si no se limitan las observaciones e investigaciones experimentales a las antitoxinas, como han hecho G. RAMON y colaboradores (a pesar de ser precisamente RAMON (1922) el que ha colocado las antitoxinas, en virtud de sus trabajos sobre la floculación toxina-antitoxina, en la misma fila, de modos de acción específicos desde el punto de vista serológico, que todos los anticuerpos

de otra denominación). Si uno se libera de esta unilateralidad inmotivada, se aprecia que la serie de anticuerpos existente en el suero normal de una especie animal es tan grande que no cabe pensar en la formación por inmunización de cada uno de los miembros de la serie, tanto más cuanto que muchos de estos anticuerpos están dirigidos contra antígenos que no pueden ponerse en contacto con la especie animal. Por ejemplo, el suero del caballo es rico en anticuerpos bacterianos, entre los cuales figuran aglutininas para los vibriones del cólera, contiene aglutininas H para distintas especies de *Salmonella* y *Clostridium*, y actúa aglutinando de modo específico los hematíes de algunos mamíferos y aves (paloma, ganso).

Por limitar el problema al modo de formarse las antitoxinas, dejando aparte los restantes anticuerpos, que pueden descubrirse en los sueros normales, RAMON y colaboradores han incurrido en una serie de aporte de pruebas "negativo". No han considerado si en el suero normal aparecen anticuerpos contra un antígeno con el cual el dador del suero no pueda ponerse en contacto en circunstancias normales, sino, recíprocamente, si las antitoxinas faltan en el suero de un animal cuando no existe en su medio ambiente la correspondiente toxina. Así, RAMON, RICHOU, NICOL y LUPU (1936) descubren en el suero de caballos no tratados previamente antitoxinas contra las toxinas diftérica y estafilocócica, y contra el veneno del bacilo de PREISZ-NOCARD; pero no encuentran antiabrina o antitoxina contra los venenos de víbora o de cobra. R. RICHOU y E. EICHORN (1936) estudian los sueros de hombre, mono, caballo, carnero, conejo, cobayo e incluso el de un cerdo y un erizo, sin poder encontrar nunca antiabrina, y consideran estos resultados negativos como un argumento indestructible en favor de la tesis de RAMON, según la cual una antitoxina sólo puede producirse a consecuencia de la acción del antígeno específico. Sin embargo, resulta por sí mismo evidente que estas afirmaciones negativas no pueden considerarse como una demostración de que antitoxinas no pueda producirse de modo espontáneo (sin estímulo antigénico)—por el hecho de que no se produzcan de este modo la antiabrina y las antitoxinas contra los venenos de serpiente—. G. RAMON y R. RICHOU (1936 a) han inmunizado carneros contra la ricina por la alimentación con cantidades normales de tortas con ricina, ocasionando de este modo la producción de antirricina; pero de este hecho no puede deducirse, naturalmente, que en el suero normal de carnero falte la antirricina porque el carnero no tome oralmente nada de ricina, sino únicamente *que esta especie animal no forma antirricina espontáneamente*. El punto de vista según el cual pueden producirse

globulinas dotadas de afinidades específicas sin necesidad de que la sustancia con la que reaccionen haya actuado previamente como antígeno, no quiere decir que cualquier animal pueda formar no importa qué anticuerpo o que deba formarlo. Contra esta segunda afirmación, pero no contra la primera, tienen valor las pruebas citadas de RAMON y colaboradores. Por lo demás, se podría comprobar el descubrimiento de R. KOBERT (1900) de la existencia en el suero normal de perro de anticrotina y antirricina.

Aún hemos de mencionar en este lugar los experimentos de E. v. DUNGERN (1902), que descubre en los huevos de las estrellas de mar (*Asterias glacialis* y *Astropecten aurantiacus*) una sustancia que, incluso en cantidades muy pequeñas, mata los espermatozoides de diferentes especies de erizos de mar (*Echinus microtuberculatus*, *Sphaerechinus granularis*, *Strongylocentrotus lividus*, *Arbacia postulosa*). El suero normal de conejo puede inhibir la acción tóxica para el esperma de los extractos de huevos de estrellas de mar, para lo que bastan en general pequeñas cantidades de suero; sin embargo, debe existir una determinada proporción entre la sustancia del huevo venenosa y la cantidad del suero de conejo añadida. La acción anti-espermatóxica del suero de conejo resiste la calefacción a 56-60° durante treinta minutos; es, sin embargo, poco probable que se trate de una "antitoxina natural", porque la actividad del suero normal de conejo no puede estimularse por la inmunización de los conejos con sustancia de huevos de estrellas de mar.

E. AUTOHEMOLISINAS. LA HEMOGLOBINURIA POR FRÍO.

Se trata de una forma de ataques, generalmente breves, acompañados de separación (paroximal) de grandes cantidades de oxihemoglobina por la orina que toma color rojo o pardo rojizo. Los ataques van acompañados de escalofríos, rápida elevación de la temperatura, dolores lumbares, y desaparecen tan rápidamente como se producen; al día siguiente la orina puede estar libre de hemoglobina, la temperatura desciende rápidamente al nivel normal, durando poco tiempo el período de elevación. Esta aparición y desaparición fugaces de un síndrome que parece peligroso, y el hecho de que tales fenómenos cortos suelen repetirse, indujo a POPPER (1868) a designar esta manifestación patológica como "hemoglobinuria paroxismal". De este amplio concepto nosológico diferenció ulteriormente L. LICHTHEIM (1878, 1883) la "hemoglobinuria por frío", en la que se precisa

el factor que desencadena los casos. La hemoglobinuria en esta forma especial se provoca por efecto del frío, o sea después de enfriar toda la superficie del cuerpo o porciones aisladas de él (baños de pies fríos, sumersión de las manos en agua fría), pudiéndose observar que la intensidad del ataque depende de la temperatura del agua que provoca el frío y del tamaño de la superficie refrigerada. La relación causal entre la acción del frío y la hemoglobinuria fué aclarada por primera vez por B. KÜSSNER (1879), que, durante un ataque, tomó sangre de un paciente con una ventosa y observó que el suero sanguíneo se separaba de color rojo rubí. L. LICHTHIEM repitió esta prueba en un caso típico de hemoglobinuria por frío provocado por un baño frío de pies; de la muestra de sangre obtenida por aspiración de una vena mediana separó por expresión el suero que también contenía hemoglobina. Resultó indudable que la hemoglobinuria se debe a una *hemolisis intravasal*, y el problema se centró entonces en el motivo por el cual el frío provoca la lisis de los hematíes en la sangre circulante. Nos acerca a la respuesta justa de este problema el siguiente experimento sencillo, pero importante, en esta fase del problema, que comunicaron P. EHRLICH (1881) y poco después BOAS (1883). A individuos que padecían hemoglobinurias por frío, cuando no sufrían un ataque se les ligaba un dedo por su base por un lazo elástico, dedo que se sumergía durante quince minutos en agua fría, y después durante otros quince en agua templada; la sangre tomada del dedo descubría hematíes destruidos, y el suero contenía hemoglobina. El experimento demostró, por una parte, que la hemolisis aparece cuando la refrigeración se limita a pequeñas cantidades de sangre mantenidas fuera de la circulación; de modo que puede decirse que sólo faltaba un paso para demostrar el proceso en el tubo de ensayo; por otra parte, como confirmaron trabajos ulteriores, la sucesión de frío y calor es decisiva para desencadenar la reacción *in vitro*.

Poco después del descubrimiento de la hemolisis inmune [J. BORDET (1898)], P. EHRLICH (1889) expresó la idea de que la disolución de los hematíes propios pudiera deberse a un agente que actuara como anticuerpo lítico existente en el suero de los hemaglobinúricos, opinión que fué compartida por otros autores [LUZATTI y SORGENTE (1901), CHIARUTINI (1900), R. KRETZ (1903) y otros]. Esta opinión fué demostrada por J. DONATH y K. LANDSTEINER (1904).

DONATH y LANDSTEINER tomaron sangre de hemaglobinúricos en un período libre de ataque, separaron el suero y los hematíes y mezclaron cinco partes de suero con una parte del sedimento de hematíes. Si se mantienen estas mezclas a 0-5° ó a 37°, permanecen intactos los

hematíes; pero si primeramente se enfría a 0-5° y después se temple a 37°, se produce regularmente una hemolisis intensa. Del análisis de esta reacción resulta que también se produce con hematíes de un sujeto no hemoglobinúrico. Lo único necesario es el suero de hemoglobinúrico. La sustancia activa en él existente posee la propiedad de un amboceptor hemolítico, ya que el suero se inactiva por calefacción de media hora a 50-55°, pudiendo reactivarse por la adición de suero normal fresco (de hombre o de cobayo). DONATH y LANDSTEINER pudieron demostrar que el amboceptor autolítico de los hematíes sólo se combina en frío; para ello tomaron dos muestras de una mezcla de suero y hematíes, una de las cuales se abandonó treinta minutos a 0°, y la otra el mismo tiempo a 37°; después se separaron los sueros por centrifugación, y ambas muestras se calentaron a 37°; la hemolisis sólo se produjo en la muestra que contenía los hematíes enfriados con el suero de hemoglobinúrico. También puede centrifugarse en frío dicha mezcla, y el suero separado mezclarse de nuevo con hematíes y volver a enfriar y calentar; la lisis no se produce en absoluto o es muy escasa, según que la lisina se haya absorbido por completo o de modo imperfecto; en todo caso, repitiendo la absorción puede eliminarse casi por completo la lisina.

Los experimentos fundamentales de DONATH y LANDSTEINER fueron repetidos por numerosos autores [véase la publicación de DONATH y LANDSTEINER (1925)], que los variaron de modos diversos, confirmando los hechos y las conclusiones, y dando lugar a alguna observación nueva. Se descubrió, ante todo, que no todos los sueros de hemoglobinúricos se comportan de modo idéntico. Varían entre ciertos límites tanto la intensidad como la duración de la refrigeración requerida para que se produzca la lisis en la ulterior calefacción a 37°, siendo también digno de mencionarse que se observan diferencias cuando se aplica suero del mismo paciente, pero tomado en distintas épocas [E. MEYER y EMMERICH (1909)]. Por ejemplo, en muchos casos basta media hora de refrigeración a 10-15° para conseguir la hemolisis [DONATH y LANDSTEINER (1925, pág. 121)], mientras que E. GRAFE y L. MÜLLER (1908), que ensayaron temperaturas de 0°, 5°, 10° y 15°, sólo obtuvieron resultados positivos a 0° y 5°; en casos aislados la sensibilidad para la temperatura es tan grande que la refrigeración a la temperatura ambiente (17° R ó 20° C) permite una lisis más o menos acusada [DONATH y LANDSTEINER, E. GRAFE (1911), E. MORO y S. NODA (1909)], y como esto puede producirse sin propósito preconcebido, es posible que los datos de algunos autores que han observado una lisis sin previa refrigeración puedan atribuirse

a esta causa de error. Por ello FR. WEINBERG (1921) y L. S. HANNEMA y J. R. RYTMA (1922) exigen efectuar la prueba fundamental de DONATH-LANDSTEINER con vidrios y líquidos previamente templados para impedir una refrigeración involuntaria. La duración de la refrigeración también influye en el resultado de la prueba. W. YORKE y J. W. S. MACFIE (1921) investigaron la influencia de ese factor en pruebas graduadas, y observaron que la lisis, al cabo de cinco minutos de refrigeración a 0°, era diez veces más intensa que la conseguida después de refrigerar a la misma temperatura durante treinta minutos. Si se mantiene durante horas la mezcla de suero y sangre a temperatura baja, se puede inhibir la aparición de la lisis en la calefacción ulterior a 37°, o al menos hacerla sumamente perezosa [DONATH y LANDSTEINER (1925), WIDAL y ROSTAINE (1905), J. EASON (1906)], lo que puede atribuirse con probabilidad a que, en frío, no sólo se fija al hematíe el amboceptor lítico, sino la porción intermedia del complemento (según la nomenclatura moderna C' 1), y en proporción tanto mayor cuanto más dure el contacto; al templar la mezcla no se dispone de suficiente cantidad de la pieza terminal (C' 2), necesaria para la lisis; es decir, la cantidad de pieza terminal que corresponde a cada hematíe sensibilizado no es la suficiente para el efecto lítico [YORK y MACFIE (1921)].

Si los métodos dados inicialmente no dan resultado, DONATH y LANDSTEINER (1925, pág. 222) recomiendan el siguiente método: la sangre del paciente se toma en un tubo de ensayo precalentado a 37° y se la deja coagular a esta temperatura; una vez conseguida la coagulación, se separa el suero de los hematíes, evitando que se produzca ninguna refrigeración. Pueden lavarse los hematíes, según recomendación de MORO y NODA y de MEYER y EMMERICH, con disolución templada de NaCl, pero no es indispensable hacerlo. Inmediatamente después se mezclan cinco partes de suero con una parte del sedimento de hematíes, siendo aconsejable utilizar el suero de hemoglobínúricos inmediatamente después de obtenido, y no conservarlo durante mucho tiempo antes de efectuar el ensayo, porque puede perder actividad. La mezcla se abandona durante treinta minutos (según YORK y MACFIE y G. MACKENZIE, bastan cinco a diez minutos) a 0°-5° y después se mantiene breve tiempo, agitando, a 37° o durante dos horas en un termostato (a 37°). Como testigo se utilizan mezclas no refrigeradas, pero, por lo demás, tratadas exactamente como los tubos de la prueba. Como la lisis puede depender de la proporción de la cantidad de hematíes con respecto a la concentración de la lisina en el suero del

paciente, en caso de resultado negativo deben comprobarse otras proporciones.

Si el resultado es negativo, puede deberse a que el suero del paciente sea pobre en complemento. Puede procederse del modo siguiente: Se mantiene la mezcla de hematíes y suero (en proporción de cinco gotas de suero con una gota de suspensión de hematíes a 20°) durante treinta minutos a 0°, se centrifuga a la misma temperatura aproximadamente, y los hematíes separados se lavan dos veces con disolución de NaCl en agua de hielo, y, finalmente, al depósito obtenido en el último lavado se adicionan cinco gotas de suero fresco de cobayo diluido o la misma cantidad de suero humano activo normal (que por sí mismo no lisa); inmediatamente después se llevan los tubos al termoestato.

La hemoglobinuria por frío se desarrolla casi siempre a consecuencia de una infección sífilítica, etiología que lleva a la conclusión de que la lisina, causa de la enfermedad, no puede considerarse como anticuerpo "natural", del mismo modo que tampoco puede hacerse con las reagentas del suero de los luéticos. Este paralelismo plantea inmediatamente la cuestión de la identidad entre la autolisina y la reagina de la sífilis. Esta posibilidad se ha desechado, sin embargo, en primer lugar, porque la reacción de los hemoglobinúricos por frío es mucho más rara que la reacción de WASSERMANN; en segundo lugar, porque se han observado casos indudables de sífilis en que la reacción de WASSERMANN era negativa, y positiva la de la lisina; en tercer lugar, porque si los hemoglobinúricos con reacción WASSERMANN positiva se someten a un tratamiento antiluético, se disocian ambas reacciones de modo que una desaparece o se debilita, mientras que la otra no se influye; en cuarto lugar, porque la lisina del suero de los hemoglobinúricos puede eliminarse totalmente o casi por completo por repetidas absorciones en frío, sin que por ello se impida la capacidad de reaccionar el suero en el ensayo de WASSERMANN [MORO y NODA (1909), MATSUO (1912), P. KAZNELSON (1922) y otros].

El modo de formarse no se ha descubierto con seguridad ni para las reagentas ni para las autolisinas de los hemoglobinúricos. K. LANDSTEINER (1945, págs. 102 y siguiente) ha planteado el problema del modo siguiente: Como puntos de partida para enfocar la producción de las reagentas sífilíticas pueden ser de importancia dos hechos: por una parte, que los sueros de los luéticos dan reacciones de floculación o de fijación de complemento tanto con extractos de tejidos que contienen espiroquetas, como con extractos alcohólicos de órganos nor-

males cualesquiera, y, por otra parte, la posibilidad de obtener antisueros de conejo por inmunización de combinación de estos animales con extractos alcohólicos de órganos a los que se añade un suero de otra especie [H. SACHS, KLOPSTOCK y WEIL (1925)]. H. SACHS y sus colaboradores admiten por ello que las reaginas sifilíticas se producen por autoinmunización con sustancias tisulares modificadas patológicamente; mientras que LANDSTEINER opina que la especificidad de la reacción de WASSERMANN para la sífilis (que aunque no absoluta es, sin embargo, muy acusada) sería más comprensible si las reaginas se concibieran como anticuerpos formados por la acción inmunizante de las espiroquetas y ofrecieran reacciones de parentesco con sustancias que existieran tanto en los espiroquetas como en extractos alcohólicos de los tejidos y que poseyeran constitución química semejante. En las autolisinas parece más plausible la hipótesis que supone una autoinmunización por células propias modificadas, incluso a causa de la adaptación específica de estos anticuerpos a los hematíes *humanos*. Según ello, el estado actual del problema de la génesis de las autolisinas, incluso considerado desde el punto de vista hipotético, no es satisfactorio porque falta un dato u opinión que explique la causa por la que esta autoinmunización, o la enfermedad condicionada por dicha autoinmunización, se produce tan rara vez en el curso de la infección sifilítica.

También se han buscado experimentalmente soluciones al problema planteado. M. NANBA (1925) obtuvo autolisinas muy activas que se comportan, tanto *in vitro* como *in vivo*, del mismo modo que las autolisinas de los hemoglobínuricos por frío, inmunizando conejos tanto sifilíticos como normales con el "antígeno de FORSSMAN", es decir, con emulsiones de riñones de cobayo, perro, caballo. Las inmunizaciones con riñones de bovino dan también resultados positivos, a pesar de que no ha podido descubrirse en el organismo de la vaca la sustancia de FORSSMAN: es cierto que los riñones de conejo y de cerdo, dos especies exentas de sustancias de FORSSMAN, resultan en cambio inactivas; pero la relación con el problema del antígeno de FORSSMAN queda sin poner en claro. Según la opinión de NANBA, los espiroquetas de la sífilis y los órganos de diferentes animales contienen sustancias iguales o semejantes que originan las reaginas de la reacción de WASSERMANN y las autolisinas que sólo se combinan en frío; esta formulación, naturalmente, no es satisfactoria. O. FISCHER (1928) parte de los experimentos de H. SACHS, S. KLOPSTOCK y A. J. WEIL (1925), que consiguen, por la inmunización de conejos con extractos alcohólicos de órganos de conejo (mezclados con suero de otra especie),

un antisuero que se comporta en la reacción de WASSERMANN como un suero de luético. FISCHER prepara, aplicando estos resultados, que al parecer pueden considerarse como "autoinmunizaciones", extracto alcohólico a partir de 20 a 50 ml. de sangre total de conejo, mezcla los extractos con suero de cerdo e inmuniza conejos con el antígeno combinado. Cuatro de siete conejos rinden a los veinte días de la última inyección inmunizante un antisuero que lisa los hematíes de conejo en las mismas condiciones que lo hace el suero de un hemoglobínúrico sobre los hematíes humanos. El valor de este resultado queda limitado, sin embargo, por la circunstancia de que NANBA obtuvo el mismo éxito utilizando extractos heterólogos de órganos, y también porque por la inmunización de combinación con extractos alcohólicos de órganos de la misma o de otra especie, no sólo se obtiene una autolisina que reacciona en frío, sino también una reagina equivalente serológicamente a la sífilítica; como ya se ha mencionado, ambos anticuerpos son distintos entre sí, y el uno se forma regularmente en el curso de la infección sífilítica del hombre, mientras que el otro sólo excepcionalmente; por último, también se ignora la razón inmunoquímica por la que las autolisinas están adaptadas específicamente a los hematíes del hombre (y no sólo a los hematíes de los hemoglobínúricos, sino a todos los hematíes humanos, es decir, a un receptor que condiciona la misma especificidad de especie). Para terminar, se menciona un trabajo de SH. SUNAMI (1930), que por inmunización de conejos con una mezcla de lecitina y suero de cerdo pretende haber obtenido también autolisinas. Sólo ofrece interés el dato de que existen dos especies de conejos, de las cuales sólo una es capaz de producir lisinas, porque sus hematíes poseen el correspondiente antígeno. Al autor no ha llegado noticia de que se haya basado experimentalmente la afirmación de que las autolisinas obtenidas de conejos sean específicas para los hematíes de conejo.

F. LAS HEMAGLUTININAS EN FRÍO.

Con el título de *Relaciones entre el suero sanguíneo y las células del cuerpo*, K. LANDSTEINER (1903) comunicó observaciones según las cuales el suero sanguíneo de diversas especies animales (conejo, gallina, cobayo, caballo, perro y vaca) posee la capacidad de aglutinar enérgicamente hematíes de la misma especie o individuo a temperatura baja (temperatura de la cámara frigorífica ó 0°). LANDSTEINER señala que esta reacción, que designa como "autoaglutinación", se

debe a la existencia en el suero normal de sustancias ("autoaglutininas") que se fijan en los hematíes, y que este enlace, tanto como su consecuencia apreciable, la floculación de los hematíes, puede hacerse reversible si se eleva la temperatura de la mezcla de la reacción a 18°-20°. La sustancia activa del suero, por consiguiente, puede disociarse por aplicación de calor moderado y descubrirse, después de separar los hematíes por centrifugación, en el líquido reaccionante si éste se hace reaccionar en frío. Si los hematíes aglutinados a 0° se lavan con disolución de NaCl en agua de hielo y se calienta la suspensión de los hematíes lavados en disolución de NaCl, se obtiene la aglutinina en estado muy puro. LANDSTEINER observa que tales disoluciones de aglutinina purificada actúan no sólo sobre hematíes de la misma especie, sino sobre los de especies ajenas, y aduce, por ejemplo, que "una aglutinina" aislada de suero de conejo no sólo aglutina los hematíes de conejo, sino los de paloma; sin embargo, no profundiza más en esta falta de especificidad, y tampoco señala explícitamente si los hematíes de otra especie también se precipitan sólo a temperatura suficientemente baja, a pesar de que esta circunstancia ofrecería una prueba importante de que la capacidad de reacción que exige una temperatura baja es una propiedad de la sustancia del suero independiente de la especie de hematíes utilizados en la prueba. La "autoaglutinación", observada por LANDSTEINER, considera este autor que está íntimamente relacionada con las aglutinaciones en forma de pilas de monedas (pseudoaglutinación), porque observa que cuando la acción es grande, los hematíes se reúnen en grumos grandes que pueden apreciarse fácilmente a simple vista, mientras que las muestras que poseen actividad escasa también ofrecen, "cuando se añade abundante sangre o a temperatura más elevada", la formación de pilas de monedas. En otro lugar dice: "La tendencia a formar estos aglomerados en la aglutinación por un suero propio bien conservado, concuerda con que habitualmente en los flóculos grandes se observan los mencionados aglomerados en pilas de monedas." LANDSTEINER ha investigado también microscópicamente los aglutinados producidos por la aglutinación en frío y ha observado imágenes que se asemejan a las de la figura 8. A continuación también O. THOMSEN (1928) se ha ocupado de la estructura microscópica de los aglutinados producidos en frío y de las relaciones entre la formación de pilas de monedas y la aglutinación; de sus observaciones se tratará después por extenso. En el trabajo citado de LANDSTEINER se encuentra también el dato de que la sustancia activa del suero de conejo puede también aislarse por precipitación con ácido carbónico

y reprecipitación o purificación de las globulinas separadas; el preparado obtenido aglutina, además de los hematíes de conejo, los de caballo. No se han hecho determinaciones cuantitativas de la aglutinina en los sueros normales ensayados; LANDSTEINER se limita a variar en sus pruebas seriadas la proporción entre el suero y la sangre desfibrinada (10:1, 10:0,1, 10:0,02, 10:0,01, etc.); cuando ha necesitado efectuar diluciones, suele utilizar el propio suero y más rara vez disolución de NaCl al 1 por 100.

En el mismo año U. BIFFI (1903) descubrió que también el suero humano aglutina los hematíes del dador de suero, y que esta "autoaglutinación" parece especialmente acusada en ciertas enfermedades infecciosas (neumonía, malaria, fiebre de Oroya). BIFFI no era de la opinión de que estas reacciones fueran idénticas o semejantes a la aglutinación en pilas de monedas; admite más bien que ambos fenómenos están provocados por distintas sustancias del suero ("aglutininas").

En la última edición de su conocida obra *The specificity of serological reactions* (1945) considera K. LANDSTEINER que la propiedad más esencial de las aglutininas por él descubiertas es la capacidad de actuar sobre los hematíes del mismo individuo, y por ello las denomina *autoaglutininas normales*. Otros autores son de la misma opinión que LANDSTEINER, pero PR. MINO (1924) toma posición en contra, porque la expresión de autoaglutinación implica una afirmación sobre la especificidad, a saber, la capacidad de reaccionar de modo exclusivo con hematíes del mismo organismo o de especies análogas, lo que de hecho no es cierto; lo característico para las autoaglutininas mencionadas es más bien que actúan precipitando un gran número de hematíes de especies próximas o alejadas, y por ello propone MINO, por extensión al caso extremo, el término *panaglutininas*. De la dependencia de las reacciones respecto a la temperatura se deduce el tercer sinónimo de "aglutininas en frío". Resulta claro, en primer lugar, que cada una de las tres expresiones sólo destaca un aspecto del fenómeno sin considerar las otras propiedades, y, en segundo lugar, que el carácter en que se apoya el término en ningún caso lo define de modo estricto. No se aglutinan de modo expresivo los hematíes propios, ni tampoco unos hematíes cualesquiera; tampoco es muy conveniente la designación de aglutinación en frío, porque deja sin determinar el grado de temperatura que permite la reacción; siempre existe un intervalo de temperaturas en las que la reacción puede transcurrir, y este intervalo no es, de ningún modo, igual en todas las aglutinaciones en frío y está influido no sólo por la naturaleza del

anticuerpo, sino también por su título [K. KETTEL (1930) y otros]. Hasta la fecha, no es posible expresar por una única palabra todas las propiedades de las reacciones que consideramos y de las sustancias del suero que en ellas actúan; sin embargo, se puede, como se ha demostrado con frecuencia en la serología, proceder a elegir arbitrariamente un término para facilitar la comprensión y precisar su sentido por enumeración de los caracteres esenciales. Así han procedido D. STATS y L. R. WASSERMAN (1943). Se deciden por la designación "aglutininas en frío" porque expresa una propiedad fundamental de esta categoría de anticuerpos, que es importante clínica y experimentalmente, y describen el contenido de este concepto serológico del modo siguiente:

1. Una mezcla de hematíes y suero da en frío una aglutinación que se descubre del mejor modo entre 0° y 5°. A 37°, y habitualmente ya a temperaturas por encima de 25°, no se produce aglutinación.
2. La aglutinación producida en frío puede hacerse reversible por calefacción a 20°-30° y volverse a provocar enfriando entre 10°-20°.
3. Los anticuerpos existentes en uno de estos sueros, en el caso que sea humano, aglutina todos los hematíes humanos cualquiera que sea el grupo a que pertenezcan. Se observan ligeras variaciones en la intensidad de la aglutinación.
4. El suero aglutinante actúa también en diversos grados sobre los hematíes de muchas especies no emparentadas.
5. Un suero que contenga hemaglutininas en frío puede agotarse por una absorción apropiada con hematíes efectuada en frío.
6. Las aglutininas absorbidas pueden ser cedidas por los hematíes aglutinados cuando se eleva la temperatura a 37°.
7. Como otras aglutininas, la hemaglutinina en frío se conserva si se mantiene en lugar frío, experimentando sólo una ligera pérdida de actividad.
8. Las hemaglutininas en frío no pierden su actividad cuando se les calienta durante treinta minutos a 56°.

El punto 5 de esta lista tiene especial importancia. Todo anticuerpo se fija por el antígeno correspondiente; cuando el antígeno tiene la forma de células (hematíes, bacterias), puede eliminarse por centrifugación de las células cargadas con el anticuerpo, separándolo de este modo del suero utilizado para la reacción. Cuando esta prueba de absorción, incluso efectuada en condiciones óptimas, da siempre resultado negativo, puede excluirse que una reacción antígeno-anticuerpo sea la causa de los procesos desarrollados al mezclarse el suero

con las células. Esto es lo que sucede en la *seudoaglutinación* que origina aglutinados que, examinados al microscopio, aparecen como pilas de monedas. El principio activo existente en el suero o plasma que provoca la formación de pilas de monedas, es "inabsorbible", como expresan los serólogos, haciendo valer los resultados negativos obtenidos. La *seudoaglutinación*, en su mayor parte, está condicionada por el contenido en el suero o plasma de globulina y fibrinógeno, así como por modificaciones en otras seroproteínas [R. FAHRÄUS (1929), T. H. HAM y F. C. CURTIS (1938) y otros]; es decir, por los factores que determinan la viscosidad; la reacción *puede* por ello no ser específica; es decir, el suero de un hombre que da con sus propios hematíes aglomerados en pilas de monedas, reacciona de modo análogo con cualquier otro hematíe, como ha podido comprobarse efectivamente. El hecho de que la viscosidad del medio en que se suspende las células sea decisivo para la *seudoaglutinación*, se confirma por haberse obtenido efectos análogos en experimentos con sustancias viscosas, goma de acacia, tragacanto y gelatina [H. WILTSHIRE (1912/13)] y porque los sueros o plasmas se vuelven inactivos cuando se diluyen, aunque sea en pequeño grado (1:2 ó 1:3), con disolución fisiológica de NaCl [S. G. SHATTOCK (1900)]; si se observa la *seudoaglutinación* entre el cubre y el portaobjetos, basta la adición de una gota de disolución de NaCl para disociar la mayor parte de las veces los agregados celulares. Esta extraordinaria sensibilidad frente a la dilución con disolución de NaCl recuerda el comportamiento de la conglutinina y de la proteína X de K. O. PEDERSEN (consúltese el apartado que sigue); es posible que exista, de hecho, una íntima conexión.

Por ello, la *seudoaglutinación* debe separarse claramente de las aglutinaciones efectuadas por "sustancias absorbibles del suero", a las que pertenecen también las aglutinaciones en frío, a pesar de todas las tentativas de hacer valer la opinión contraria. Si bien O. THOMSEN (1928) defiende el punto de vista de que los aglomerados en pilas de monedas y la aglutinación en frío ("aglutinación genuina") son procesos enteramente distintos, opina, sin embargo, que "una aglomeración energética en pilas de monedas proporciona una buena base para la actividad de aglutininas a temperatura más alta", entendiendo por "temperatura más alta" de 18° a 20°. Aquí mencionaremos únicamente un experimento ilustrado por figuras de preparaciones observadas al microscopio. THOMSEN mezcla a 18° en un portaobjetos una suspensión de hematíes con una aglutinina en frío, y coloca encima un cubreobjetos. Después de producida la aglutinación pasa el preparado dos a cuatro veces rápidamente sobre la llama de mantenimiento de

un mechero de Bunsen, de modo que temple a unos 35°, y de nuevo vuelve a enfriar; al templar desaparece a simple vista la aglutinación, pero al refrigerar vuelve siempre a aparecer. Ahora bien, la imagen microscópica va ofreciendo el aspecto de pilas de monedas con claridad creciente, hasta que después de cuatro calefacciones con las refrigeraciones subsiguientes predominan aglutinados en forma típica de pilas de monedas. Hay que suponer que el suero aplicado no contiene exclusivamente una aglutinina en frío que posea también la propiedad de producir una enérgica aglomeración en pilas de monedas. La aglomeración en pilas de monedas al principio se enmascara probablemente por la aglutinación en frío, y si al final domina la primera, puede atribuirse a que se debilita la aglutinina en frío. Ahora bien, el que después de cuatro calefacciones y refrigeraciones sucesivas terminen apareciendo en el campo microscópico los hematíes aglutinados en forma de pilas de monedas, parece indicar que los hematíes sufren poco en la aglutinación (menos que por aglutinaciones a 37°). (Consúltese la figura 9.) Sin embargo, esto debe comprobarse de modo indudable por experimentos apropiados. En las pruebas de THOMSEN los hematíes se suspendían en suero muy diluido (una gota de suero más una gota de suspensión de hematíes al 1,2 por 100), mientras que, para efectuar las titulaciones, los sueros deben diluirse mucho más, con disolución de cloruro sódico, a causa de la intensidad de su acción.

De las aglutinaciones en frío puede separarse también el fenómeno denominado de THOMSEN, es decir, el hecho de que los hematíes por la acción de determinadas bacterias sufran una modificación en virtud de la cual pueden aglutinarse por cualquier suero humano, incluso el de las personas de que proceden, así como por sueros de individuos del grupo AB. Como se expuso en la página 25, V. FRIEDENREICH (1930), en la monografía que dedica al estudio de este fenómeno, interpreta el mecanismo de la reacción por la hipótesis de que las bacterias ceden fermentos que activan un aglutinógeno T que existe en estado latente en todos los hematíes humanos, sobre el que actúa una aglutinina T existente en todo suero humano. Que, de hecho, se trata de una reacción antígeno-anticuerpo, intenta probarlo FRIEDENREICH por una modificación interesante de la prueba de absorción; transforma hematíes del grupo O por bacterias, y con ellos absorbe la aglutinina T de un suero humano; si se examinan con el suero así absorbido los hematíes transformados, éstos no se comportan ya como "panaglutinables", sino que sólo floculan por la isoaglutinina que corresponde al grupo a que pertenecen. La aglutinina de la

que depende el fenómeno de THOMSEN se absorbe en los hematíes a los que floclula y actúa sobre los hematíes humanos, cualquiera que sea el grupo a que pertenecen; compórtase, pues, como una "aglutinina en frío". La dependencia de la temperatura en el fenómeno de THOMSEN y en la aglutinación en frío, no es lo suficientemente acusada para constituir un criterio que permita una separación estricta entre ambos fenómenos; tanto las aglutininas T como las aglutininas en frío ofrecen a temperatura baja un título más elevado, y la temperatura máxima a la que aun se observa la aglutinación, tampoco difiere de modo manifiesto con uno y otro anticuerpo, si bien, en general, sucede que las aglutininas en frío sólo rara vez pueden actuar por encima de 25°, mientras que el fenómeno de THOMSEN, aunque en forma debilitada, puede aún observarse a 37°. Esta analogía permitió a L. LATTES y C. CREMA (1928) admitir la identidad del fenómeno de THOMSEN y la aglutinación en frío, opinión de la que se aparta V. FRIEDENREICH (1930), porque pudo demostrar serológicamente la independencia de los anticuerpos que participan en ambas reacciones; en efecto, de un suero que contenga ambos anticuerpos pudo absorber sin dejar residuo la aglutinina en frío sin alterar el contenido de aglutinina T. Esta diferenciación por absorción puede deberse a que la aglutinina T se ancla en otro receptor de los hematíes que las aglutininas en frío ordinarias; lo observado serológicamente permite en todo caso definir la aglutinina T como "una aglutinina en frío de afinidad especial". Existe, sin embargo, otra diferencia fundamental. Las aglutininas en frío actúan sobre los hematíes de nuestras sanguíneas recientes y estériles, mientras que el fenómeno de THOMSEN sólo se pone de manifiesto con suspensiones de hematíes viejas y en general impurificadas por bacterias, de modo que parece deberse a una modificación secundaria de los hematíes independiente del grupo sanguíneo a que pertenece el dador del suero.

En este lugar debemos mencionar aún que la especificidad de los sueros hemaglutinantes conservados estériles puede reducirse por su conservación a temperaturas bajas (en nevera). W. C. BOYD, L. G. BOYD y E. R. WARSHAVER (1945) y D. F. CAPPELL y M. N. McFARLANE (1946) pudieron observar la pérdida espontánea de la especificidad en antisueros conservados con fines de diagnóstico que se habían preparado por la absorción con hematíes apropiados, de modo que eran específicos para el factor RH. Sin embargo, en el fenómeno de THOMSEN estamos en presencia de alteraciones de los hematíes y no de modificaciones de los sueros activos que participan en el fenómeno (véase antes), y esta circunstancia basta para atribuir a

esta "panaglutinación" un lugar especial y separarla del grupo de las aglutinaciones en frío, para las cuales indudablemente es decisivo las propiedades particulares de las seroglobulinas aglutinantes.

Las hemaglutininas en frío, que ofrecen las propiedades estudiadas por D. STATS y L. R. WASSERMAN (véase págs. 218 y siguiente), como se dijo en un principio, fueron descubiertas por K. LANDSTEINER (1903) en el suero normal de diferentes especies animales; los descubrimientos de LANDSTEINER se confirmaron por R. ÖTTENBERG y W. THALHIMER (1915), I. YU (1928), G. WALTHER (1929) y K. M. WHEELER (1938), que las completaron por investigaciones en otros animales. En el suero del hombre parecen existir normalmente, como se demuestra si se utiliza la técnica de K. KETTEL (1936), en que se deja coagular a 37° la sangre del donante para impedir la adsorción de la aglutinina a los hematíes propios, que fácilmente se produciría en frío (consúltese pág. 212). En estas circunstancias, KETTEL obtuvo resultado positivo con el 95 por 100 de 600 personas estudiadas. Si bien las investigaciones de KETTEL, así como las previas de R. AMZEL y L. HIRSZFELD (1925), se limitaron a individuos que a causa de diversas enfermedades se encontraban en tratamiento en un hospital, cabe opinar con gran verosimilitud (considerando además el descubrimiento de las aglutininas en frío en el suero de diferentes animales) que estos anticuerpos se encuentren también, con frecuencia, en el suero de hombres sanos. Por otra parte, no existe duda de que se observa la formación de aglutininas en frío en estados patológicos; una revisión tabular de los casos publicados, que comprende el período de 1940 a 1943, se encuentra en el extenso artículo de STATS y WASSERMAN. Según estos autores, las aglutininas en frío patológicas pueden desaparecer o persistir después de pasada la enfermedad. Aglutininas en frío que desaparecen pasada la enfermedad se han observado en enfermedades infecciosas agudas (1), en la tripanoso-

(1) Las aglutininas en frío han podido descubrirse con especial frecuencia (entre el 35 y el 40 por 100 de los casos) en los individuos que padecen de neumonía primaria por virus; con frecuencia se aprecian títulos de 1:160 y superiores, y en ocasiones se registran valores muy altos (1:10.000). Como las aglutininas en frío son raras y sólo ofrecen títulos bajos en neumonías de otra etiología, por ejemplo en las neumonías del grupo de la psitacosis, su determinación parece ofrecer cierta importancia como método de diagnóstico para diferenciar las neumonías primarias por virus. [M. FINLAND, *J. clin. Invest.*, 24, 491 (1944); F. PESTALOZZI, *Kältoagglutinine bei der Virus-pneumonie*, Basel, 1945; M. D. EATON, *Virus-pneumonia and Pneumonitis viruses of man and animals*, *Handb. d. Virusfshg.* 2 Erg. Band (en prensa).]

miasis, en la anemia hemolítica aguda y en muchos casos de anemias crónicas hemolíticas; los datos concernientes a aglutininas en frío persistentes se refieren a cirrosis hepática, complejo sintomático de RAYNAUD, gangrena de los dedos de manos y pies y algunos casos de anemia hemolítica crónica. Ahora bien, si es correcto admitir que las hemaglutininas en frío pueden también descubrirse en el suero de hombre sano, se plantea el problema de si estas aglutininas normales difieren de las patológicas, es decir, de las producidas durante una enfermedad. Es éste un caso especial de problema general de si los anticuerpos naturales (producidos sin estímulo antigénico apreciable) se producen del mismo modo que los anticuerpos obtenidos por inmunización. Naturalmente debe decidirse, ante todo, si ambos tipos de anticuerpos se distinguen por propiedades especiales. En las páginas 31 a 81 se ha expuesto por extenso que este camino no conduce al fin propuesto, experiencia que se repite en las hemaglutininas en frío. Aunque se observen diferencias en el título de las aglutininas en frío, así como en su amplitud termal, son, sin embargo, de grado y ni siquiera constantes. Las aglutininas en frío de los animales normales poseen, en general, título bajo. De los sueros investigados por K. KETTEL, el 86 por 100 aglutinaban únicamente a diluciones al 1:16 o menores. Es cierto que las muestras procedían, como se ha dicho, de pacientes hospitalizados, lo que, ciertamente, no posee mucho valor para interpretar el predominio de valores bajos, pero sí para explicar los casos de sueros con títulos más altos (ya que se observaron muchas muestras con un título que alcanzaba 1:1024); cabe la duda de si estos valores altos deben considerarse como valores excepcionalmente apartados de la norma o como consecuencia de una enfermedad determinada. STAS y WASSERMANN (1943) estudiaron 20 pruebas de sueros de animales sanos; sólo pudieron apreciarse hemaglutininas en frío en diez muestras, y sólo en un caso el título alcanzó a 1:4; sin embargo, la técnica empleada no estaba libre de objeciones, porque el suero se separó de las tortas sanguíneas a la temperatura ambiente, de modo que fué posible que se produjera una absorción de las aglutininas en los hematíes del coágulo. Hasta la fecha no se han determinado con seguridad los títulos límite entre los que pueden variar las aglutininas en frío de los sueros de hombres sanos. Las observaciones anteriores permiten, sin embargo, llegar a la conclusión de que son raras y únicamente aparecen en condiciones patológicas hemaglutininas en frío que sean activas entre 6° a 4° y que a esta temperatura posean un título de 1:500 o más alto.

Los límites de temperatura dentro de los cuales actúan las hema-

glutininas en frío, o, como lo expresan W. BIALOSUKNIA y L. HIRSZFELD (1924), la *amplitud termal* es función, en primer lugar, del título del suero, ya que la temperatura máxima en la que aún se observa aglutinación se desplaza proporcionalmente a lo elevado del título [P. MINO (1924), K. KETTEL (1930), V. FRIEDENREICH (1930)]. El hecho de que existan excepciones de esta regla [K. KETTEL (1930)] no modifica que la amplitud termal no pueda considerarse como un segundo criterio diferencial de las aglutininas patológicas, ya que tal amplitud, a su vez, está condicionada por el título elevado de estas aglutininas. Como no se han podido apreciar otras diferencias entre hemaglutininas en frío, normales y patológicas, los datos conocidos, considerados serológicamente, no permiten sino una diferenciación empírica análoga a la delimitación entre las aglutinaciones de bacterias patógenas valiosas para el diagnóstico producidas por sueros de pacientes y las aglutinaciones de la misma especificidad producidas por sueros normales, que toma como base un valor límite del título del suero que permita considerarlo como indudablemente patológico. La interpretación más sencilla sería, según ello, que en ciertas circunstancias patológicas se exalta la producción de hemaglutininas en frío normales.

La comparación entre las aglutininas bacterianas normales e inducidas por inmunización no se ajusta, sin embargo, en todos los puntos a los dos modos de producirse las hemaglutininas en frío. Es cierto que las hemaglutininas en frío, normales y patológicas, como todas las seroproteínas que actúan como anticuerpos, son globulinas, lo que ya fué apreciado por K. LANDSTEINER (1903) y confirmado posteriormente por M. C. GLOUGH e I. M. RICHTER (1918) y F. KÖPPLIN (1936 a, b); según las investigaciones electroforéticas de D. STAS. PERLMAN, BULLOWA y GOODKIND (1943), que compararon un suero de título 1:25600 en estado nativo y después de seis absorciones con estromas de hematíes, se trata de una globulina γ , ya que el área ocupada por esta fracción en el diagrama electroforético del suero absorbido era manifiestamente menor que en el diagrama del suero nativo. No puede decidirse *a priori* por qué existen aglutininas en frío en el suero *normal*. Esta imprecisión es común a todos los "anticuerpos naturales", siempre que no existan suficientes puntos de apoyo para afirmar que se producen por la dotación hereditaria; pero no hay investigaciones que permitan afirmar que éste sea el caso de las hemaglutininas en frío, y si efectivamente sucediera que pueden descubrirse en todo suero humano, no se trataría de un carácter racial hereditario, sino de una propiedad condicionada por la especie misma.

El punto en que el problema de las hemaglutininas en frío difiere de los otros problemas que conciernen a la oposición entre anticuerpos naturales y provocados por inmunización, está dado, sin embargo, por la exaltación patológica. Pues las exaltaciones que alcanzan grados elevados son raras, se observan en diferentes enfermedades, aunque sin regularidad, y no puede emitirse ninguna hipótesis acerca del estímulo antigénico que provoca la exaltación. Las hemaglutininas en frío actúan sobre los hematíes del individuo, en cuyo suero aparecen a elevada concentración; actúan, por consiguiente, sobre un antígeno que no se introdujo desde fuera, sino de origen endógeno, y que pudiera ser la causa del efecto inmunizador. Ahora bien, es sabido que los hematíes, regularmente, perecen después de una vida relativamente breve, sin que por ello den lugar a hemaglutininas por frío de valor elevado, y que en la malaria, así como en la fiebre palúdica africana, los resultados positivos son, en todo caso, raros, a pesar de que en estas enfermedades los hematíes se destruyen patológicamente en gran cantidad y son captados en estado relativamente intacto por los reticulocitos que se consideran como sede, o al menos como lugar de acción preparatoria de los anticuerpos. En la anemia hemolítica se tiende a considerar una conexión etiológica entre los anticuerpos circulantes en la sangre—las hemaglutininas en frío—y el proceso patológico; es decir, y la destrucción elevada de los hematíes. Las hemaglutininas en frío de título elevado son raras, sin embargo, en las anemias hemolíticas, y cuando actúan aglutinan, pero en pocos casos originan hemolisis; por último, en casos aislados se ha observado que la anemia se curaba por la extirpación del bazo, pero que persistían las hemaglutininas en frío, por lo que debe considerarse como improbable toda relación entre la observación serológica y la anemia.

Por otra parte, las publicaciones según las cuales las hemaglutininas en frío sólo aparecen por primera vez después de una o varias transfusiones de sangre, así como los experimentos de O. H. ROBERSON y P. ROUS (1918), que pudieron observar circunstancialmente en el conejo la aparición de aglutininas en frío después de repetidas transfusiones de sangre o sangrías, no aportan ninguna explicación, porque no se trata de consecuencias constantes, sino excepcionales, y porque no ha podido precisarse la conexión causal entre el agente y la modificación del suero. P. MINO (1923) no ha podido, por lo demás, comprobar que por repetidas transfusiones de sangre se eleve el título de las aglutininas en frío.

Las hemaglutininas en frío, en la mayoría de los casos en que

aparecen en distintas enfermedades, se han considerado como descubrimientos aparentemente desprovistos de significación clínica. Además, en numerosos casos se observa que las transfusiones en individuos en cuya sangre circulan estas aglutininas no provoca consecuencias de ningún tipo. Como la aglutinación de los hematíes habitualmente no se produce si la temperatura pasa de 30°, esta experiencia se explica por sí misma. Se conciben, sin embargo, excepciones en dos sentidos posibles, y de hecho se han observado.

En pacientes que sufren de la enfermedad de Raynaud, se contraen en el ataque los vasos periféricos, enfriándose los dedos de manos y pies. Por ello la circulación de la sangre en las regiones concernientes se hace más lenta e incluso se interrumpe, reduciéndose la temperatura de la sangre; en estas circunstancias puede producirse *in vivo* una aglutinación en frío, local, especialmente cuando las aglutininas existentes posean un título elevado y, por lo tanto, una amplitud térmica grande. Si se lava el saco conjuntival de tales individuos con agua de hielo, puede producirse el estancamiento en los vasos de los bulbos de la conjuntiva y observarse directamente al microscopio la aglutinación intravasal (apreciable por la fragmentación de la columna sanguínea) [S. IWAI y M. SIN (1925, 1926), C. U. JESSEN y J. BING (1940), D. STATS y J. G. M. BULLOWA (1943)]. J. NAKAMURA (1931) pudo efectuar esta prueba, con el mismo resultado, en las orejas de conejos que poseían aglutininas en frío de título elevado. Cuando la temperatura se eleva sobre el límite desaparece rápidamente la aglutinación intravasal. La relación entre las aglutininas en frío con la patogénesis de los síntomas de la enfermedad de Reynaud no se puede precisar claramente, porque existen casos en los que se aprecia el síndrome típico a pesar de no poderse descubrir en el suero ninguna aglutinina en frío (STATS y WASSERMAN, obra citada, página 390) (1). El autor, aunque ni por experiencias clínicas ni por investigaciones serológicas propias esté autorizado para ello, del hecho de que el síndrome de Reynaud no siempre esté asociado con la existencia de aglutininas en frío de título elevado, llega a la conclusión de que estos anticuerpos constituyen en dicha enfermedad un fenómeno accidental, y que no hacen sino intensificar las consecuen-

(1) La observación citada, en el idioma original, es ésta: "It has even been proposed that cold haemagglutination may be the cause of the ischemia in the large majority of cases of Raynaud's syndrome. This is highly questionable since serological study of 4 cases of Raynaud's syndrome by the authors did not reveal cold haemagglutination."

cias de la constricción primaria de los vasos y de la refrigeración periférica, y quizá también participen en el desarrollo de la gangrena de los dedos de manos y pies.

Las hemaglutininas en frío no hemolizan *in vitro*, excepto raras veces; los hematíes, a consecuencia de la aglutinación, tampoco sufren modificaciones grandes que puedan apreciarse al microscopio; sin embargo, es indudable que algo sufren, como se deduce de que los hematíes aglutinados se hemolicen por simple suspensión en NaCl o por repetidos lavados con disolución de NaCl, o por simple agitación de la mezcla reaccionante [E. B. SALÉN (1935), M. BOULÉ, HILLEMAND y BONNARD (1933), STATS y WASSERMAN (obra citada, página 407)]. Por el contrario, si se la aglutina, se diluye con disolución de NaCl y se añade después a los hematíes, cesa la hemolisis. Únicamente las aglutininas de título elevado pueden hemolizar también *in vitro*; pero la lisis sólo se produce en frío (4°), el suero o plasma aglutinante debe utilizarse poco diluido y la acción del anticuerpo debe reforzarse por un procedimiento mecánico (agitación de las probetas) [STATS y WASSERMAN (obra citada, págs. 402 y siguientes)]. Los sueros que contienen aglutininas en frío y que en el tubo de ensayo no hacen sino aglutinar, en el organismo humano pueden actuar hemolizando, aunque no posean un título aglutinante especialmente alto. Este comportamiento contradictorio se ha observado también en otros anticuerpos; la incompatibilidad entre los grupos sanguíneos a que pertenecen donante y receptor se comprueba siempre, como es sabido, por reacciones de aglutinación; pero si se administran hematíes incompatibles (aglutinables por el plasma del receptor), la consecuencia que ante todo se teme no es una aglutinación intravascular, sino una hemolisis de los hematíes extraños. Pero si la aglutinación en frío, que no puede producirse a la temperatura del cuerpo humano, ya que requiere un intervalo de temperaturas más bajo, ha de ocasionar una lisis intravascular, deben cooperar influencias que creen las condiciones indispensables para que reaccionen las hemaglutininas en frío y los hematíes; a saber: una refrigeración de la superficie del cuerpo, de la suficiente intensidad y extensión, y que se prolongue durante bastante tiempo. Este es el caso de las *hemoglobinurias por frío paroxismales*, poco frecuentes, en las que la conexión causal parece afirmarse por el hecho de que en tales individuos la hemoglobinuria puede provocarse arbitrariamente por la acción del frío.

Con respecto a los resultados experimentales de DONATH y LANDSTEINER, tratados en el apartado anterior, acerca del mecanismo de las hemoglobinurias por frío paroxismales, pudiera admitirse que este

estado patológico se debe, en todos los casos, a que un anticuerpo existente en la sangre se combina en los vasos muy refrigerados con los hematíes propios, y que la lisis se produce con la coope-
ración de complemento cuando los hematíes alcanzan la corriente sanguínea templada. En este mecanismo se basan también las pres-
cripciones que DONATH y LANDSTEINER recomiendan para efectuar la reacción de diagnóstico de esta autohemolisina, que se combina en frío y hemoliza en la ulterior calefacción (véanse págs. 210 y 212). Según D. STAS y L. R. WASSERMAN, existe, sin embargo, una forma de hemoglobinuria por frío que no está ocasionada por la autohemolisina descubierta por DONATH y LANDSTEINER, sino por *hemaglutininas en frío*, y como estos anticuerpos sólo hemolizan en frío (véase página 227) la hemolisis, es decir, la hemoglobinemia, se limita a los vasos de la zona enfriada y se interrumpe inmediatamente que la parte del cuerpo que se enfría vuelve a templarse; en los estados patológicos investigados por DONATH y LANDSTEINER, la lisis, por el contrario, se produce cuando la sangre enfriada vuelve a templarse, y, a consecuencia de ello, la hemoglobinuria es mucho más intensa y va acompañada de fenómenos generales (escalofríos, fiebre, caída de la presión sanguínea) que faltan en las formas ocasionadas por aglutininas en frío.

En la casuística de STAS y WASSERMAN figuran únicamente diez casos de hemoglobinuria producidos por hemaglutininas en frío; siete pacientes mostraban además el síndrome de RAYNAUD y dos padecían gangrena. Los antecedentes sifilíticos, que casi siempre se descubren en la forma de DONATH y LANDSTEINER—reacción de WASSERMAN positiva en el 92 por 100 de los casos [G. HÖGLUND (1927)]—, en cuanto puede apreciarse en el pequeño material, parece, en cambio, darse rara vez en estas hemaglutininas. La prueba de DONATH y LANDSTEINER da resultado negativo: los sueros actúan aglutinando energicamente a 4°, lo que es raro o se produce en pequeño grado con las autolisinas de DONATH y LANDSTEINER; no se fija complemento, y las aglutininas en frío actúan sobre los hematíes de diferentes especies, mientras que la autohemolisina de DONATH y LANDSTEINER, según datos explícitos de estos autores, se adaptan específicamente a la sangre humana. Fundándose en estos datos, debe admitirse que la hemoglobinuria provocada por hemaglutininas en frío es completa-
mente distinta de la enfermedad de DONATH y LANDSTEINER, y no sólo por el anticuerpo que participa en ella, sino por el mecanismo patogénico y por la gravedad (que depende de él) de los ataques provocados por la refrigeración. Investigaciones posteriores aclara-

rán si está justificado admitir una delimitación estricta. El hecho de que se conozca una hemoglobinuria asociada a la posesión de hemaglutininas en frío, en la que el desencadenamiento no se consigue por refrigeración, parece señalar que el problema no es tan sencillo como presentan STATS y WASSERMAN. Sucede también que las aglutininas en frío de título elevado son extraordinariamente raras, y también, por consiguiente, las hemoglobinurias debidas a ellas. En todo caso, entre las aglutininas en frío y las autohemolisinas descubiertas por DONATH y LANDSTEINER existe un único lazo: que la reacción antígeno-anticuerpo requiere temperatura baja.

Esta propiedad la ofrecen muchos anticuerpos y los sueros que los contienen, y las características de las aglutininas en frío típicas, dadas por STATS y WASSERMAN (véase pág. 218), no hacen sino separar del conjunto de tales anticuerpos un grupo que, a pesar de sus caracteres específicos, posee tantas propiedades comunes con los restantes del conjunto que no está justificado atribuirles rango especial. Al mismo grupo pertenecen las *isoaglutininas irregulares del suero humano* descritas por K. LANDSTEINER y P. LEVINE (1929), y observadas, como descubrimiento raro, en los cuatro grupos sanguíneos del sistema A—B—O—. Los dos representantes más importantes de esta categoría, a saber, las variantes α_1 y α_2 de la aglutinina regular α , se estudiaron por extenso en las páginas 107 y siguientes; difieren de las aglutininas en frío típicas por su avidéz específica de grupo, ya que la α_1 aglutina los hematíes que poseen el factor A_1 y muy débilmente los que poseen el A_2 , mientras que α_2 (o anti—O) reacciona fuertemente con los eritrocitos—O y más débilmente con los A_2 . Estas isoaglutininas constituyen una primera desviación del tipo de las aglutininas en frío, por poseer una orientación específica del grupo en su capacidad reaccionante; pero, además, como se dijo en otro lugar, existen aglutininas que difieren en que la hemaglutinación también es posible a 37° [P. MINO (1923), C. AUBERTIN (1930), T. H. HAMM y W. B. CASTLE (1940), A. S. WIENER (1942), E. H. REISNER y M. KALKSTEIN (1942) y otros], o en que la aglutinación sólo se hace reversible calentando a una temperatura no habitual (45° a 50° [L. D'ANTONA (1930)]). STATS y WASSERMAN comprenden estas designaciones del tipo de las aglutininas en frío, bajo la denominación de "*hemaglutininas en frío irregulares*", lo que debe considerarse como un testimonio de que el tipo no posee límites estrictos y que la posición especial que se le atribuye no se debe sino a la frecuencia con que existen en los sueros animales y humano. Por lo demás, a temperatura baja no sólo actúan hemaglutininas, sino también anti-

cuerpos de otra designación. P. B. BEESON y W. F. GOEBEL (1939) comunican, por ejemplo, que un antisuero de caballo obtenido con el neumococo tipo XIV da precipitados específicos con la sustancia A de los hematíes humanos, obtenida de la peptona comercial, incluso a diluciones del antígeno 1:10⁶, pero sólo a 0°; si se calienta a más de 20° se deshacen los precipitados.

G. LA CONGLUTININA.

P. EHRLICH y H. SACHS (1902) habían observado que los hematíes del cobayo pueden disolverse en una mezcla de suero fresco de caballo, por sí mismo inactivo, y de suero bovino, inactivado (calentado a 56°). Opinan que en el suero de bovino existe un amboceptor lítico que completa su acción por el complemento del suero fresco de caballo, constituyendo una hemolisina; concepción que sin embargo está en oposición con el hecho, observado por los autores, de que los hematíes de caballo no pueden fijar el hipotético amboceptor del suero de bovino. G. BORDET y F. P. GAY (1906) demostraron después que la esencia de la reacción de EHRLICH y SACHS no corresponde a una hemólisis por un amboceptor lítico y complemento; en efecto, antes de que los hematíes se disuelvan, se agrupan constituyendo grumos grandes, proceso que nunca se observa cuando, sobre los hematíes de cobayo, se deja actuar uno solo de los dos sueros normales (suero fresco de caballo o suero de bovino inactivado). El fondo de la cuestión fué puesto en claro por BORDET y GAY por la siguiente prueba, que efectuaron también, con el mismo resultado y con independencia de ellos, M. MUIR y C. H. BROWNING (1906). Si se mezclan hematíes de bovino con suero fresco de bovino, aquéllos, naturalmente, no se modifican; pero si previamente los hematíes de bovino se han sensibilizado por un amboceptor específico de conejo, se produce en seguida una enérgica aglutinación que, inmediatamente, concluye en hemólisis. El resultado, sin embargo, es negativo si en lugar de suero fresco de bovino (que contiene complemento) se utiliza suero inactivado de bovino. En la prueba de EHRLICH y SACHS también se produce la aglutinación y la lisis cuando se calienta el suero de bovino a 56°, porque en este caso el suero fresco de caballo proporciona el complemento y (en forma de un anticuerpo natural) el amboceptor. El complemento, por consiguiente, es necesario para el efecto, y MUIR y BROWNING quieren atribuir el proceso a un efecto aglutinante del complemento. BORDET y GAY, sin embargo, están convencidos de que

la actividad peculiar del suero de bovino no se debe a un anticuerpo que participe en la reacción ni al complemento necesario para ella, sino a una sustancia coloidal inespecífica que se adhiere a las células sensibilizadas en presencia de complemento, y por ello favorece la floculación rápida y la lisis. La sustancia inespecífica del suero de bovino fué designada provisionalmente como "coloide de bovino", expresión que posteriormente fué sustituida por J. BORDET y O. STRENG por "conglutinina"; las aglutinaciones provocadas por la conglutinina se designan como "conglutinaciones". Por estos términos quiere significarse, por una parte, la diferencia entre la sustancia del suero de bovino que provoca o favorece la aglutinación de los hematíes y las aglutininas específicas, y, por otra parte, que el proceso esencial es la aglutinación de los hematíes y no la lisis. Esto se funda en que la hemolisis siempre va precedida de una floculación intensa, y en que BORDET y STRENG han conseguido disociar más o menos completamente el efecto conglutinante del suero de bovino y la hemolisis. Para ello calentaron a 56° el suero de bovino y lo dializaron. Se forma un precipitado que separa por centrifugación y que no se disuelve en disolución de cloruro sódico de modo transparente, sino que origina un líquido turbio; si en el experimento de EHRLICH y SACHS se utiliza este líquido en lugar de suero inactivado de bovino, no se observa sino una hemolisis débil, en cambio se aprecia una intensa floculación de los hematíes de cobayo. Puede observarse un resultado análogo si se añade suero inactivado de bovino, diluido en nueve partes de agua destilada y se hace burbujear por la mezcla CO₂; el precipitado producido se recoge por centrifugación, y contiene, al disolverlo en disolución de cloruro sódico, la totalidad de la conglutinina, mientras que el líquido sobrenadante parece favorecer principalmente la hemolisis. Estos experimentos indican, aunque esta conclusión no está expresada explícitamente por BORDET y STRENG, que la conglutinina es una seroproteína o está compuesta de seroproteínas, lo que recientemente (véase luego) se ha demostrado que es cierto. De los experimentos aducidos se deduce que la conglutinina del suero de bovino resiste una calefacción a 56°. y que se fija—como puede demostrarse por pruebas de absorción—a los hematíes que están combinados con un anticuerpo específico y complemento, pero no a los hematíes normales.

De los trabajos de BORDET y GAY y de BORDET y STRENG resulta implícitamente que la capacidad de reacción de la conglutinina y la del complemento, en importantes aspectos, son muy análogas, a pesar de las diferencias funcionales y sustanciales de ambos productos del

suero. Ni el complemento ni la alexina pueden fijarse directamente a las células antigénicas, sino cuando éstas han fijado previamente el anticuerpo específico y ambas son inespecíficas, pudiendo en principio anclarse a cualquier célula cargada con anticuerpos y permitir o intensificar la reaccionada condicionada por el anticuerpo.

O. STRENG (1909, 1929), que prosiguió los estudios comenzados tan brillantemente por J. BORDET, pudo descubrir la conglutinina en el suero de otras especies, especialmente de rumiantes, y también en el de caballo. Según STRENG, falta por completo en los sueros de gato, perro y paloma; el suero de cabra posee débil cantidad y, en cambio, el de antilope aglutina con extraordinaria intensidad. STRENG observó también que la conglutinación no sólo se produce cuando se utilizan hematías, como célula con antígenos, sino también empleando otros elementos celulares, en especial bacterias, si se observa un modo de operar idéntico.

Resulta notable que tanto BORDET y sus colaboradores, como otros autores que se ocuparon en esta época de modo experimental de la conglutinación [O. STRENG (1909), MUIR y BROWNING (1906), H. R. DEAN (1911), W. LESCHLY (1916), K. POPE (1919, 1923) y otros], afirmaran que la conglutinina sólo actúa sobre células que, además del anticuerpo, hayan fijado también complemento, a pesar de que es sabido que las reacciones de floculación condicionadas por un anticuerpo (precipitación y aglutinación) no requieren la cooperación de complemento. No se ha aclarado esta evidente contradicción. Ahora bien, el hecho de que la conglutinación esté condicionada por la presencia de complemento se ha intentado demostrar, por otra parte, por el hecho de que los bacilos de la difteria y de la tuberculosis puedan aglutinarse en voluminosos grumos por suero fresco de bovino, mientras que resulta inactivo el suero bovino inactivado; en el primer caso el suero bovino contiene un anticuerpo natural, complemento y conglutinina, y en el segundo falta el complemento. Pero si al suero bovino inactivado se añaden indicios de suero normal fresco, por ejemplo de suero de conejo, se produce la conglutinación. El mismo experimento puede efectuarse con suero de bovino, activo o inactivado y reactivado por un complemento heterólogo, y hematías, siempre que el suero de bovino posea un anticuerpo natural para los hematías utilizados en la prueba [BORDET y GAY (1906), O. STRENG (1909)].

J. BORDET, en su conocida obra *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses* (1935, pág. 408), hace notar que los copos producidos en una conglutinación son mucho mayores y más compactos y

que por ello se destruyen más difícilmente por agitación que los producidos por un suero inmune aglutinante, observación que debe investigarse más a fondo considerando las circunstancias descritas en las páginas 124 y siguiente.

La teoría de J. BORDET, aunque bien fundada, debe contrastarse con diferentes objeciones, en parte objetivas y en parte teñidas de matiz polémico [H. SACHS y J. BAUER (1911), O. BAIL (1909), W. SPÄT (1910)]. Desde el punto de vista de su época, se comprende la oposición. Al lado del complemento, a cuya constitución compleja se prestaba atención desde 1907 [consúltese R. DOERR (1947 b)], hay que situar un segundo componente inespecífico de los sueros normales que, como aquél, también permite reacciones serológicas; ahora bien, mientras que la fijación del complemento al antígeno combinado con su anticuerpo toma forma concreta por el descubrimiento de la pieza intermedia [E. BRAND (1907)], la conglutinina sólo se fija al complejo anticuerpo-antígeno y ejerce su acción cuando dicho complejo se ha combinado previamente con el complemento inespecífico. BORDET impone finalmente su concepción; pero la conglutinina encuentra poco eco, y en las revisiones modernas, como en la de LANDSTEINER, *The specificity of serological reactions* (1945), o en la de W. C. BOYD, *Fundamentals Immunology* (1947), no se hace más que mencionarla y dar una desnuda definición de ella. La razón de este menosprecio no es, por lo demás, la falta de interés teórico, sino la circunstancia de que la conglutinación, a diferencia de otras reacciones serológicas, en especial del método de la fijación de complemento, no ha conseguido situarse entre el cúmulo de métodos de diagnóstico clínico.

La conglutinación sólo ha adquirido cierta importancia para la diagnosis del muermo, porque el suero de mulos, asnos y yeguas preñadas poseen con frecuencia fuertes propiedades anticomplementarias. Se han propuesto diversos métodos; por ejemplo, se mezclan cantidades convenientes de un extracto de bacilos del muermo, de suero problema del animal que padece la enfermedad y de complemento, y, después de transcurrido el tiempo de combinación, se añade el sistema conglutinante, que consiste en hematies de carnero y suero inactivado bovino; si aparece conglutinación, se considera como prueba de que en la primera fase de la reacción el complemento quedó sin combinar debido a que en el suero investigado no existe el anticuerpo específico, y, por lo tanto, el animal dador de suero no estaba infectado (es decir, el resultado, en el sentido de la pregunta clínica, es negativo). Se trata, como en la reacción K-H propuesta por W. PFEILER

y SCHEFFLER (1915), de una desviación del complemento, en la que en lugar de un sistema hemolítico se utiliza un sistema conglutinante como indicador del consumo de complemento efectuado por una reacción antígeno-anticuerpo. Pueden encontrarse en K. POPPE (1919, 1923) datos más precisos sobre la técnica y resultados de estas reacciones.

En tiempos muy recientes, sin embargo, la conglutinina y la aglutinación de los hematíes debida a su efecto han vuelto a pasar a primer plano. Para comprender estas peripecias deben recordarse, ante todo, los fenómenos.

Como ya se expuso en el volumen I de estas *Investigaciones sobre inmunidad*, págs. 186 y siguientes, M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 a, b) y F. HAURWITZ (1942) observaron que entre las seroglobulinas normales y las globulinas inmunes completamente formadas existen formas intermediarias designadas como *anticuerpos incompletos* o *indiferenciados* (*low-grade antibodies*) que se caracterizan porque, aunque se combinan específicamente con el antígeno, no provocan la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo (aglutinación, precipitación), a consecuencia de su adaptación defectuosa a los determinantes del antígeno.

En segundo lugar, P. EISENBERG y R. VOLK señalaron ya en 1902 que si los sueros aglutinantes se calientan durante unos minutos a 70°-80°, dejan de aglutinar; pero, sin embargo, conservan el poder de fijarse a las bacterias e impedir la aglutinación por sueros inmunes no calentados. Esta transformación de antisueros floculantes en sueros que siguen anclándose al antígeno sin flocularlo puede conseguirse por distintos agentes [consúltase R. DOERR (1947 a, pág. 79)]; el hecho de que el antisuero transformado se combina al antígeno, se pone siempre de manifiesto en que sobre éste dejan de actuar los antisueros, lo que se debe a que los determinantes del antígeno se saturan por el derivado transformado, es decir, se bloquean. Se entiende fácilmente y no necesita aclaración especial que estos bloqueos no sólo se producen por sueros inmunes modificados artificialmente, sino también por los *low-grade antibodies* producidos en el organismo. Con ello quedan establecidas las premisas para lo que a continuación se expone.

A. S. WIENER y H. R. PETERS (1940) encuentran con frecuencia aglutininas anti-Rh en el suero de individuos cuyos hematíes no contienen el factor *rhesus* y que reaccionan con perturbaciones frente a la administración de células Rh. Pero por las transformaciones de sangre se conocen también individuos Rh negativos y extraordinaria-

mente sensibles a la administración del factor Rh en cuyo suero no puede apreciarse directamente por el método ordinario la aglutinina anti-Rh. A. S. WIENER (1944) procede del modo siguiente: mezcla hematíes Rh con el suero de tales individuos, mantiene la mezcla durante treinta a sesenta minutos en un baño de agua a 38°, con lo que los hematíes se sedimentan; separa el líquido sobrenadante y añade entonces suero anti-Rh₀; en muchos casos no se produce entonces la aglutinación por el antisuero, lo que señala que los hematíes están "bloqueados", y, por tanto, que las muestras de suero investigadas deben contener un anticuerpo que se combine con las células Rh sin flocularlas, pero volviéndolas inaglutinables. WIENER designa este método indirecto como ensayo por bloqueo (*blocking test*). Los anticuerpos que descubre este procedimiento se designan por WIENER como "anticuerpos bloqueantes", designación que, aunque expresa su papel en el ensayo, no es recomendable. Pero WIENER atribuye al anticuerpo floculante en esta misma floculación una propiedad particular: en oposición a las aglutininas bivalentes, debe ser univalente, a lo que atribuye su incapacidad para aglutinar los hematíes. Esta concepción está derivada de la *teoría reticular*, que admite que las moléculas de antígeno y de anticuerpo forman una red en los productos de floculación obtenidos en las reacciones serológicas, red que se produce por el enlace mutuo de los determinantes del antígeno con los grupos polares del anticuerpo; una estructura de este tipo exige que no sólo la molécula del antígeno, sino también la del anticuerpo sean multivalentes o, formulado de modo más preciso, que sean capaces al menos de dos enlaces (*teoría de la multivalencia recíproca*). Esta hipótesis, sin embargo, no la admiten, de ningún modo, la generalidad de los investigadores. F. HAUROWITZ defiende el punto de vista de que todos los anticuerpos son univalentes, y la ha reforzado mediante experimentos nuevos [F. HAUROWITZ, RADIYE CINDI y P. SCHWERN (1946)]. Ahora bien, para las investigaciones de A. S. WIENER concernientes a la conglutinación, es, por lo demás, indiferente que la teoría reticular que sin previo examen admite [WIENER (1945 a, b, 1946), WIENER, HURST y SONN-GORDON (1947)] sea dudosa o incluso equivocada.

WIENER (1945 b, 1946) afirma, por ejemplo, que los anticuerpos anti-Rh que no poseen sino efecto bloqueante, cuando se fijan a los hematíes les comunican la propiedad de reaccionar frente a la adición de conglutinina (añadida en forma de plasma oxalatado o de suero de adultos normales) con formación de flóculos. Para efectuar la prueba de bloqueo indirecta repite la demostración directa con ayuda

de congulutinas, a las que considera idóneas para demostrar no sólo la presencia de anticuerpos Rh, sino también la de anticuerpos de cualquier especie, capaces de combinarse de modo específico con el antígeno empleado, sin que en este caso se produzca, como consecuencia, una modificación visible (floculación) de la mezcla de la reacción [WIENER y E. B. SONN (1946), J. J. GRIFFITHS (1947)]. La congulutina, como el complemento, es inespecífica, fijándose por diversos complejos antígeno-anticuerpo, como se sabe, no solamente por datos recientes, sino desde los trabajos fundamentales de BORDET y GAY y de BORDET y STRENG, que supieron encontrar, para lo fundamental, una formulación muy clara que sólo ahora reanuda su desarrollo.

A. S. WIENER (1945) considera, por lo demás, claro que su método para la demostración directa de aglutininas anti-Rh imperfectas es semejante a las reacciones con que BORDET y colaboradores analizaron serológicamente el suero de bovino, y por ello designa su método como "congulutinación". Inmediatamente tomaron posición en contra R. R. A. COOMBS, A. E. MOURANT y R. R. RACE (1945). Señalan que la congulutina existente en el suero de bovino, como se ha dicho, no actúa sobre los hematíes que sólo han fijado el anticuerpo específico, sino que para que la floculación se produzca es necesario que los hematíes, además de los anticuerpos, fijen también complemento. Pero WIENER, mediante el ensayo por él propuesto, pudo utilizar como "congulutina" suero humano, que se había calentado durante media hora a 60°, y que, por tanto, según la experiencia, estaba totalmente privado de la función de complemento. La designación con una misma palabra de dos tipos de reacción que se producen en condiciones tan diferentes, se considera, por los autores citados, como causa de posible error. WIENER, en trabajos posteriores, no hace referencia a la objeción y mantiene las expresiones "congulutina y congulutinación", con razón en opinión del autor. Las analogías son más importantes que las diferencias, por lo demás no aclaradas, y una subdivisión de la terminología en estas circunstancias sólo tendría como consecuencia lastrar las relaciones manifiestas con designaciones particulares. Lo que no constituiría ciertamente un primer caso.

El trabajo de A. S. WIENER, J. G. HURST y E. B. SONN-GORDON (1947) contiene referencias a datos aparecidos en distintas comunicaciones de A. S. WIENER que conciernen a la técnica de la nueva reacción de congulutinación, a su mecanismo, a su aplicación a la medicina clínica y a su importancia teórica, y trae además los resul-

tados de las investigaciones acerca de las propiedades y naturaleza de la conglutinina utilizada en el nuevo ensayo.

Se ha señalado que el plasma oxalitado actúa, por término medio, con una intensidad doble que la del suero, y que la capacidad conglutinante del suero o del plasma resulta tan sensible frente a la dilución con disolución de cloruro sódico, que basta la adición de su volumen de ésta para inhibir la actividad conglutinante. Por ello, al efectuar las pruebas, debe evitarse utilizar disolución de cloruro sódico como medio de dilución; si se quiere determinar el contenido de anticuerpos Rh en el suero de un enfermo, efectuando una prueba seriada, debe diluirse con suero o plasma y no con disolución de NaCl. En ello se aprecia una diferencia entre conglutinación y aglutinación, ya que el suero floculante, sin que se perturbe su actividad, puede diluirse hasta varios miles de veces con disolución de cloruro sódico.

La sensibilidad para la dilución entraña que los sueros de hombres Rh negativos y sensibles frente a la administración de Rh aglutinen a menudo en el primer tubo de ensayo de una serie de diluciones, pero que en los tubos siguientes reaccionen muy débilmente o no reaccionen. Utilizando una técnica adecuada se llega a la conclusión de que no se produjo aglutinación, sino conglutinación, y que ésta se puso de manifiesto porque en el primer tubo de ensayo el suero sólo se había diluido a la mitad con disolución de cloruro sódico.

El contenido de conglutinina en el plasma o suero humano de adultos sanos es siempre considerable, y en ello se funda la posibilidad de utilizar mezclas de plasma o de suero en lugar de muestras individuales para llevar a cabo la reacción de conglutinación y su estudio. Por el contrario, el plasma o suero del feto es pobre en conglutinina, lo que WIENER y colaboradores han relacionado con su contenido de proteínas relativamente bajo (consúltese pág. 239). Después del nacimiento aumenta rápidamente la concentración de conglutinina; a ello atribuye WIENER la ictericia grave, que aparece repentinamente después del nacimiento, si los hematíes contienen el factor Rh y en el útero fijan el anticuerpo anti-Rh, que se transmite por vía placentaria desde la sangre materna al feto. Esta ictericia, que aparece repentinamente después del nacimiento y que amenaza la vida, debe considerarse, en opinión de WIENER, como una conglutinación *in vivo*. Por ello, según WIENER, está totalmente contraindicado el método usado hasta ahora para tratar las eritroblastosis del recién nacido (1) por

(1) La enfermedad designada como eritroblastosis no debe proceder de la reacción del factor Rh contenido en los hematíes de un feto Rh positivo con

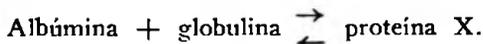
transfusiones con sangre total (hecha incoagulable por adición de citrato), porque, como se deduce de la investigación del suero, inmediatamente después de una de estas transfusiones se eleva considerablemente la concentración de proteínas en la sangre circulante y simultáneamente el contenido de conglutininas. Por ello WIENER propone eliminar las dos quintas partes del plasma de la sangre donante y sustituirlas por su mismo volumen de disolución de NaCl; la transfusión no modifica entonces el contenido proteico de la sangre ni el de conglutininas de la misma, y los resultados terapéuticos son decididamente mejores [WIENER y J. B. WEXLER (1946), WIENER, WEXLER y T. GRUNDFAST (1947)]. Además, la prognosis prenatal, cuando se espera una eritroblastosis en el niño, resulta más segura que hasta ahora lo ha sido por la posibilidad de descubrir los anticuerpos anti-Rh imperfectos en el suero de la mujer embarazada con ayuda de conglutinación; incluso cabe predecir el tipo y gravedad de la enfermedad que se teme en el niño.

Para la demostración de anticuerpos incompletos se utilizan también otras reacciones. Además de la prueba ya mencionada del bloqueo (véase pág. 235), se ha utilizado el ensayo de la albúmina de L. K. DIAMOND y R. L. DENTON (1945), que consiste en centrifugar los hematíes cargados de los anticuerpos incompletos (no aglutinantes), tomar con pipeta el líquido sobrenadante y sustituirlo por una disolución de albúmina al 20 por 100. Otro método teórico interesante fué propuesto primero por C. MORESCHI (1908), y posteriormente, en forma incompleta, por COOMBS, MOURANT y R. R. RACE (1945), y considerado como muy conveniente por otros autores [J. M. HILL y

los anticuerpos Rh procedentes de la sangre de la madre Rh negativa y pasados a la circulación del feto por la placenta. En los últimos años aumentan los datos de madres Rh positivas que alumbran también niños que poseen síntomas más o menos acusados de eritroblastosis, y, en tales casos, la madre y el hijo pertenecen a grupos distintos del sistema AB. Si, por ejemplo, la madre pertenece al grupo A y el hijo al B, pueden pasar hematíes B, fetales, a la circulación de la madre y dar lugar a la producción de antiaglutininas A de elevado título (véase pág. 109) que pasan al feto por vía diaplacentaria y dan lugar a reacciones patológicas [E. F. AUBERT, J. B. COCHRANE y M. E. ELLIS (1945), S. GRUBER, A. LITVAK y M. JACOBI (1946), A. S. WIENER, E. B. SONN y J. B. HURST (1946)]. Hay que señalar, especialmente, el caso comunicado por L. DE KROME y L. A. M. VAN DER SPECK (1947) de la muerte de los dos primeros niños de una mujer que había que atribuir necesariamente a la existencia de una aglutinina anti-N (estúdiase el pág. 109) en el suero de la madre; el tercer niño poseía una fórmula sanguínea MM y se mantuvo sano, lo que pudo considerarse como una confirmación.

S. HABERMAN (1946), W. T. J. MORGAN y H. SCHÜTZE (1946)]. Finalmente, N. M. ABELSON (1946) ha apreciado que si los hematíes, a los que se han anclado anticuerpos bloqueantes, se lavan hasta dejarlos exentos de suero y después se les añade su volumen de sangre completa Rh positiva, provocan una aglutinación de todos los hematíes existentes en la mezcla de la reacción. Sin embargo, WIENER, HURST y SONN (1947) consideran que la aglutinación es una reacción más sensible y que, además, no requiere sino reactivos sencillos, al alcance de los pequeños laboratorios.

En lo que respecta a su comportamiento físico-químico (y esto constituye la parte más interesante de las comunicaciones de WIENER, HURST y SONN), la conglutinina aparece en el plasma y suero del hombre como un agregado de las proteínas del líquido sanguíneo que se identifica con la proteína X descrita por K. O. PEDERSEN (1945). PEDERSEN había observado que el plasma o suero, cuando está diluido, se comporta en la ultracentrífuga como si únicamente contuviera dos proteínas especiales, albúmina y γ -globulina. A diluciones decrecientes (concentraciones de proteína crecientes) aparece un tercer componente, la proteína X, que aumenta a expensas de la albúmina y de la globulina γ , y cuya cantidad es proporcional al aumento de la concentración total de proteínas en el plasma o suero. Según PEDERSEN, esta proteína X es un agregado de albúmina, globulina y ciertos lipoides cuyo peso micelar se aproxima al millón; al diluir este coloide complejo se disocia, y al concentrar se recombina según la fórmula



Con el descubrimiento de PEDERSEN y con su significación concuerdan notablemente las propiedades conglutinantes del plasma (o suero) humano determinadas por WIENER, HURST y SONN. La acción conglutinante se debilita también rápidamente al diluir con disolución de cloruro sódico, y termina por cesar (véase pág. 237); en pruebas seriadas se ha podido determinar como límite para una reacción de conglutinación positiva, un contenido mínimo de proteínas del 3 por 100. Sin embargo, con respecto a la aparición de la conglutinación, debe decirse que no sólo intervienen la concentración de las proteínas, sino también la cantidad y calidad de la conglutinina. Esto se deduce de las tentativas de "sintetizar" la conglutinina o de intensificar la conglutinina natural.

Las disoluciones de albúmina que contienen menos del 12,5 por 100 de albúmina humana conglutinan débilmente, o no conglutinan

en absoluto, y análogamente se comportan las disoluciones de globulina con menos del 4,6 por 100. Pero si reúnen tales disoluciones de albúmina y globulina, las mezclas ejercen un efecto de coagulación mucho más fuerte que el plasma promedio natural. Ha podido comprobarse después que una mezcla óptima de ambos componentes (4,2 g. de albúmina y 3,2 g. de globulina por 100 ml.) se aproxima al cociente albúmina-globulina del suero humano normal. La mezcla albúmina-globulina apropiada, a pesar de que su contenido de proteínas totales no es más alto que el del suero humano normal, manifiesta, sin embargo, un título de coagulininas cuatro veces más alto, lo que debe atribuirse a que en el plasma (suero) natural existen sustancias que mantienen a la albúmina y a la globulina en dispersión molecular oponiéndose a su agregación, o a que la albúmina y globulina, al separarse del suero total, se vuelven poco hidrófilas y por ello se hacen apropiadas para reunirse en agregados coloidales. En todo caso se consigue reforzar la acción coagulinante de mezclas de plasma humano adulto normal por la adición de albúmina humana hasta cuatro veces, siempre que se utilice la cantidad óptima (cuatro partes de plasma y una parte de una disolución al 25 por 100 de albúmina humana); si se pasa por alto o por bajo de la concentración de albúminas disminuye el efecto reforzador.

Hay que esperar que los resultados experimentales comunicados por WIENER y colaboradores se comprueben, y también que se someta a juicio crítico su interpretación teórica. Si se demostrara que los resultados experimentales son justos, se plantearía la cuestión de si el plasma o suero humano ofrece características especiales en uno u otro respecto, y la respuesta a esta pregunta nos llevará más pronto o más tarde a investigar en el suero de diversos animales la conexión con la aglutinina descrita por BORDET y colaboradores. En cuanto a la exigencia de complemento presentada por la coagulinina estudiada por BORDET en el suero de bovino, debemos recordar que O. GENGOU (1911) y MURTO (1914) observaron que para obtener un resultado positivo no se requiere sino el anclaje de la pieza central, y que la final, aunque necesaria para que se produzca la acción citotóxica propiamente dicha del complemento, no juega, en cambio, ningún papel en la coagulación. Por último, BORDET, y colaboradores y continuadores, no utilizan plasma, sino exclusivamente suero, y las células coagulinadas no eran hematíes humanos, sino hematíes de cobayo o de bovino, diversas bacterias, etc. También existen varias diferencias entre el modo de experimentar estos autores, con el de WIENER, y es, por lo menos, posible que a estas diferencias se deban las diferen-

cias de criterio respecto a la participación del complemento en la aparición de la conglutinación. En todo caso, la conglutinina investigada por BORDET es también una sustancia coloidal contenida en sueros normales, y, como la descrita por WIENER, resiste una calefacción de 55° y puede separarse de las seroproteínas por precipitación del suero; del mismo modo que la conglutinina de WIENER, no actúa sobre células normales, sino sólo sobre células que han fijado anticuerpos específicos y no da lugar por sí sola a la aglutinación, sino que intensifica la acción de una aglutinina imperfecta, en sí no floculante. Sin razones forzosas no cabe dudar de la fuerza demostrativa de estas analogías para admitir la identidad o íntima semejanza de la conglutinina de BORDET con la de WIENER.

En cuanto a las relaciones de la conglutinación con la teoría re-ricular, ya hemos dicho que WIENER, en todas sus publicaciones, admite hasta la fecha que los sueros inmunes aglutinantes actúan floculando sus antígenos porque contienen anticuerpos bivalentes, únicos capaces de formar la red hipotética que se traduce en la aparición de un precipitado constituido por floculos irregulares. Los anticuerpos imperfectos (en la terminología de WIENER, anticuerpos bloqueantes o glutininas), en opinión de WIENER y otros autores, no pueden aglutinar por ser univalentes, y WIENER les atribuye aún otra propiedad, que relaciona con su presunta univalencia. WIENER afirma que, por no ser sino univalentes, puede decirse que poseen una molécula menor que las aglutinas bivalentes; opinión sostenida por investigaciones de WIENER y E. B. SONN (1946) y de WIENER y R. B. BERLIN (observaciones no publicadas), y según la cual los anticuerpos bloqueantes pasarían la placenta más fácilmente que las aglutininas. Sin embargo, esta afirmación es muy improbable. Los anticuerpos imperfectos, como los perfectos, son *globulinas inmunes con especificidad de especie*, y reaccionan, como demuestra el ensayo de globulinas de COOMBS MOURANT y RACE, con un suero antiglobulina de conejo; por ello deben poseer el mismo peso molecular que los anticuerpos perfectos, lo que parece más probable considerando que, como se sabe desde los trabajos de J. A. PARFENTJEW, el fraccionamiento de la molécula de anticuerpo puede dejar intacta la función anticuerpo y reducir, o incluso destruir, la especificidad de especie que posee por su carácter de globulina [consúltese R. DOERR (1947 a, págs. 27 y 48)]. La tesis de que los anticuerpos imperfectos bloqueantes posean un peso molecular menor que las aglutininas sólo podrá admitirse si se hacen investigaciones físicas que hagan aceptarla a pesar de lo improbable que, *a priori*, parece. Ya se señaló en la página 234 que las aglutini-

nas pueden transformarse por diversos agentes en anticuerpos no aglutinantes, pero capaces de bloquear de modo específico: en opinión del autor, no es admisible que en todos los casos de este tipo se destruyan todas las "valencias", excepto una que permita su combinación específica en el antígeno.

Finalmente, no parece clara la relación entre la conglutinina y el anticuerpo imperfecto (dicho inequívocamente y la célula cargada con un anticuerpo específico). Incluso los defensores más osados de la teoría reticular retroceden ante la opinión de que la conglutinina suministre al anticuerpo incompleto la segunda valencia necesaria para la constitución de una red. En el estado actual de las cosas lo mejor es admitir que el anticuerpo bloqueante no sólo bloquea, sino que también aglutina potencialmente, pero sólo cuando los hematies, u otras células, por la fijación de la conglutinina adquieren el estado de aglutinabilidad exaltada. El proceso sería, pues, semejante al ensayo de globulinas de COOMBS, MOURANT y RACE, en el cual se consigue aglutinar las células cargadas con anticuerpos imperfectos, no aglutinantes por sí mismos, por adición de un antisuero de conejo precipitante de la globulina del anticuerpo. El estado actual de la investigación no permite aventurar ninguna hipótesis más concreta.

CONCLUSION

En el primer volumen, *Antikörper* (1947), y en el tercero, *Die Antigene* (1948), se señaló hasta qué límites la experimentación y la hipótesis alcanzan a explicar las propiedades de las sustancias activas citadas cuando, como objeto de la investigación, se eligen los anticuerpos obtenidos por inmunización, y por esta elección pueden dominarse las relaciones entre un antígeno y la producción del anticuerpo correspondiente, lo que además ofrece un *leit-motiv* para otras posibilidades. Indudablemente, los anticuerpos inducidos por inmunización presentan grandes ventajas tanto para el análisis experimental como para la interpretación hipotética de los resultados. La relación dinámica con el antígeno inductor, cuyos grupos determinantes de la especificidad pueden, en ocasiones, estar definidos químicamente, ofrece un punto de partida concreto que, como los hechos enseñan, se ha colocado en el punto central de toda la actividad científica y del pensamiento en este campo; pero, además, la elevada actividad de los anticuerpos producidos por inmunización abre un amplio campo experimental para las investigaciones serológicas *in vivo* e *in vitro*.

Los anticuerpos naturales, es decir, apreciables en el plasma (sue-ro) sanguíneo normal, carecen de estas dos ventajas importantes. Pero puede considerarse indudable que estos anticuerpos naturales pueden producirse sin impulso antigénico exógeno, y que esta formación, debida a un origen endógeno, representa el caso de máxima frecuencia y anuncia que existen anticuerpos producidos de modo espontáneo dotados de afinidades con gran número de sustancias de los tipos más diversos (bacterias, hemátias, toxinas, virus). Técnicamente, y también especulativamente, la desventaja puede dar ocasión a que la formación de los anticuerpos originados sin estímulo antigénico específico se constituya en fuente de conocimientos más profundos. Los anticuerpos naturales, como los producidos por inmunización, casi

siempre son globulinas γ , y este hecho señala que esas propiedades especiales de las globulinas, manifestadas en la afinidad con determinada sustancia, deben adquirirse por ellas fácilmente a causa de la fuerte variabilidad de estas proteínas en el campo condicionado por la especificidad de especie. Que esta variabilidad, en ocasiones, se oriente en determinada dirección por un estímulo antigénico, parece, como expresan también K. LANDSTEINER y L. HIRSZFELD, menos extraño y misterioso que la formación de modo espontáneo de globulinas lábiles que dan a las mismas reacciones que las inducidas por inmunización. Es cierto que tampoco se ha resuelto el problema en lo que respecta a cómo debe concebirse la configuración de las globulinas lábiles ni en que radique su capacidad de reaccionar con una sustancia determinada.

BIBLIOGRAFIA

- ABDOOSH, Y. B. (1936), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 36, 355.
 ABEL, R. (1894), *Dtsch. med. Wschr.* 20, 899, 936.
 ABELSON, V. M. (1946), citado por E. L. POTTER (1947, pág. 294).
 ALEXANDER, J. (1931), *Protoplasma (Al.)* 14, 296.
 AMZEL, R. und L. HIRSFELD (1925), *Z. Immunföschg. (Al.)* 43, 526.
 ANDERSEN, T. (1935), *Z. f. Rassenphys. (Al.)* 7, 171.
 — (1938), *Z. f. Rassenphys. (Al.)* 10, 88.
 ANDERSON, J. S., F. C. HAPPOLD, J. W. MCLEOD and J. G. THOMSON (1931),
J. Path. a. Bact. (Brit.) 34, 667.
 ANDRESEN, P. H. (1935), *Z. Immunföschg. (Al.)* 85, 227.
 ASBELEW, W. N. und A. A. MARGO (1932), *Zbl. f. Bakt. I Orig.*, 126, 212.
 ASCHOFF, L. (1924 a), *Ergebn. inn. Med. u. Kinderh.* 26, 1.
 — (1924 b), *Lectures on pathology*, Nueva York, P. B. HÖBER.
 AUBERT, E. F., K. E. BOORMAN and B. E. DODD (1942), *J. Path. a. Bact.*
(Brit.) 54, 89.
 AUBERT, E. F., J. B. COCHRANE and M. E. ELLIS (1945), *Brit. med. J. II.*
 pág. 648.
 AUBERTIN, C. (1930), *Semaine d. hôp. de Paris*, 6, 228.
 BACCICHETTI (1922), *Boll. Clin. (Ital.)* 39, 362.
 BACON, D. K. (1943), *Arch. int. Med. (Am.)* 72, 581.
 BAIL, O. (1909), *Zbl. f. Bakt. I Orig.*, 51, 170.
 BAILEY, C. E. (1923), *Amer. J. Hyg.* 3, 370.
 BAILEY, G. H. (1927), *Amer. J. Hyg.* 7, 370.
 — (1928), *Amer. J. Hyg.* 8, 398, 477, 485, 723.
 BAILEY, G. H. and S. RAFFEL (1935), *J. clin. Investig. (Am.)* 14, 228.
 BANG, J. (1943), *Acta med. Scandinav.* 113, 304.
 BARR, M. and A. F. GLENNY (1938), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 47, 27.
 BAUER, J. and HUDSON (1930), *J. of prevent. Med. (Am.)* 4, 177.
 BAWDEN F. C. and A. KLECKOWSKI (1942), *Brit. J. exp. Path.* 23, 178.
 BAWDEN, F. C. and N. W. PIRIE (1938), *Brit. J. exp. Path.* 19, 251.
 BAY-SMITH, E. (1929), *Klin. Wschr.*, pág. 974.
 BEER, P. (1936), *J. clin. Investig. (Am.)* 15, 591.
 BEESON, P. B. and W. F. GOEBEL (1939), *J. exp. Med. (Am.)* 70, 239.
 BELL, S. D. and Z. ERICKSON (1931), *J. Immunol. (Am.)* 20, 447.
 BÉRARD, L. et A. LUMIÈRE (1925), *Presse médic.*, pág. 993.
 BERGER, E. und H. ERLIENMEYER (1932 a), *Z. Hyg. (Al.)* 113, 79.

- BERGER, E. und H. ERLLENMEYER (1932 b), *Bioch. Z. (Al.)* 252, 22.
 BERGEY, D. H. and S. ETRIS (1936), *J. Immunol. (Am.)* 31, 363.
 VAN DEN BERGHÉ, L. et P. LIESSENS (1939), *C. r. Soc. Biol. Paris*, 132, 90.
 BERNSTEIN, F. (1925), *Z. induct. Abstamm.- u. Vererbgs. l.* 37, 237.
 — (1930), *Z. induct. Abstamm.- u. Vererbgs. l.* 56, 233.
 BIALOSUKNIA, W. et L. HIRSZFELD (1923), *C. r. Soc. Biol. Paris*, 89, 1361.
 — — (1924), *C. r. Soc. Biol. Paris* 90, 1108.
 BIANCALANA, L. et ST. TENEFF (1930), *Boll. Soc. Int. Microb., Soz. Ital.*,
 2, 397.
 DE BIASI, B. (1923), *J. Amer. med. Ass.* 81, 1776.
 RIDOLI, L. (1936), *Rivista Clin. Pediatr. (Ital.)* 34, 193.
 BIELING, R. (1923/24), *Z. Immunf. schg. (Al.)* 38, 193.
 BIELING, R. und S. ISAAC, *Klin. Wschr.* 1922 II, 1453.
 BIELING, R. un H. HEINLEIN (1947), *Viruskrankheiten des Menschen. Fiat*
Reviews of German Science, deutsche Ausgabe, Bd. 65.
 BIFFI, U. (1903), *Ann. d'igiene sperim. (Ital.)* 13, 232.
 BJORNBOE, M. (1945), *Acta path. et microb. scand.* 22, 323.
 — (1946), *Acta med. scand.* 123, 393.
 BLEYER, L. (1927), *Z. Immunf. schg. (Al.)* 53, 386.
 BOAS (1883), *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 32, 355.
 BOLVIN A. et A. DELAUNAY (1946), *Presse médic.* 54, 16.
 BOLTON, M. H. (1896), *J. exp. Med. (Am.)* 1, 543.
 BONNETT, H., S. TIEFFRY et MONTEFIORE (1936), *C. r. Soc. Biol. Paris*
 123, 781.
 BOORMANN, K., B. DODD and B. E. GILBEY (1948), *Ann. Eugenics, cit. por*
Morgan and Watkins (1948).
 BORDET, J. (1898), *Ann. Inst. Past. Paris* 12, 688.
 — (1899), *Ann. Inst. Past. Paris* 13, 225.
 — (1910), *Congrès intern. d. Méd. Budapest, pag.* 37.
 — (1920), *Traité de l'Immunité, Paris, Masson, 2. Ed.*
 — (1938), *Traité de l'Immunité, Paris, Masson, 3. Ed.*
 BORDET, J. et F. P. GAY (1906), *Ann. Inst. Past. Paris* 20, 467.
 BORDET, J. et O. STRENG (1909), *Zbl. f. Bakt. I Orig.*, 49, 260.
 BOVARNICK, M. and P. M. DE BURGH (1947), *Science (Am.)* 105, 550.
 BOVERI, R. (1933), *Klin. Wschr.*, pag. 666.
 BOYD, W. C. (1939), *Blood groups. Tabulae biologicae* 17, 113.
 BOYD, W. C. and L. G. BOYD (1934), *J. Immunol. (Am.)* 26, 489.
 — — (1937), *J. Immunol. (Am.)* 32, 307.
 BOYD, W. C., L. G. BOYD and E. R. WARSHAVER (1945), *J. Immunol. (Am.)*
 51, 191.
 BRAND, E. (1907) *Berl. Klin. Wschr. Nr.* 34.
 BRANDEN, K. F. and D. T. FRASER (1936), *J. Immunol. (Am.)* 31, 387.
 BRAUN, H. (1909), *Arch. f. Hyg. (Al.)* 68, 116.
 BREINL, F. und F. HAUROWITZ (1930), *Z. phys. Chemie (Al.)* 192, 45.
 BRIODY, B. A. (1948), *J. Immunol. (Am.)* 59, 115.
 BROCKMANN, H. (1911), *Z. Immunf. schg. (Al.)* 9, 87.
 BROCO-ROUSSEU, D. et G. ROUSSEL (1939), *Le sérum normal. Paris.*
 BROWNING, C. H. (1931), *Antigens and Antibodies. Syst. Bact. (Brit.)* 6,
 202, 219.

- BOULÉ, M., P. HILLEMAND et R. BONNARD (1933), Bull. Soc. méd. d. hôp. de Paris 49, 429.
- BUCHBINDER, L. (1933), J. Immunol. (Am.) 25, 33.
- BÜHLER, E. (1935), Z. indukt. Abstamm.- u. Vererbgs. (Al.) 70, 463.
- BUNCH, C. P., R. C. MORROW, J. R. TIMMONS and D. F. SMITH (1940), J. Immunol. (Am.) 39, 427.
- BUNNELL, W. W. (1933), Amer. J. med. Scienc. 186, 346.
- BUNTING, C. H. (1925), Wisconsin med. J. 24, 305.
- BURGH DE, P. M., P. C. YU, C. HOWE and BOVARNICK (1948), J. exp. Med. (Am.) 87, 1.
- BÜRGI, E. (1907), Arch. Hyg. (Al.) 62, 239.
- BURNET, F. M. (1940), Med. J. Australia 27, 325.
- (1941), Monographs Hall Institute N.º 1, MacMillan, Melbourne.
- BURNET, F. M., A. V. JACKSON and E. G. ROBERTSON (1939), Austral. J. exp. Biol. a. Med. Scienc. 17, 253.
- BURNET, F. M., J. F. MCCREA and J. D. STONE (1946), Brit. J. exp. Path. 27, 228.
- BURNET, F. M. and D. LUSH (1938), Austral. J. exp. Biol. a. Med. Scienc. 16, 261.
- BUXTON, J. B. and A. T. GLENNY, Lancet 1921 II, pág. 1109.
- CAMPBELL, D. H. (1938 a), J. Immunol. (Am.) 35, 205.
- (1938 b), J. Immunol. (Am.) 35, 465.
- CANDELA, P. B. (1940), Amer. J. Phys. Anthrop. 27, 209.
- CANDELA, P. B., A. S. WIENER and L. J. GOSS (1940), Zoologica (Am.) 25, 513.
- CANNON, P. R. (1945 a), J. Amer. med. Assoc. 128, 360.
- (1945 b), Advanc. Protein Chem. 2, 135.
- CANNON, P. R., W. E. CHASE and R. W. WISSLER (1943), J. Immunol. (Am.) 47, 133.
- CANNON, P. R., R. W. WISSLER, R. L. WOOLRIDGE and E. P. BENDITT (1944), Ann. Sur. (Am.) 120, 514.
- CAPPEL, D. F. and M. N. MCFARLANE (1946), Lancet I, pág. 558.
- CARLINFANTI, E. (1935), C. r. Soc. Biol. Paris 120, 942.
- CARREL, A. and A. H. EBELING (1922), J. exp. Med. (Am.) 36, 365.
- CASTELLANI, A. (1902), Z. Hyg. (Al.) 40, 1.
- CAVALIERI (1922), Arch. Pat. et Clin. med. (Ital.), 1, 5.
- CAULFIELD, A. H. W. (1936), Transact. Amer. Clin. a. Climat. Ass. 52, 234.
- CHASE, J. H., A. WHITE and TH. F. DAUGHERTY (1946), J. Immunol. (Am.) 52, 101.
- CHASE M. W. (1947), J. exp. Med. (Am.) 86, 515.
- CHATTON, E. et M^{me} CHALTON (1925), C. r. Acad. Scienc. Paris 180, 1225.
- CHERRY and LANGROCK (1916), J. Amer. med. Ass. 66, 626.
- CHIAROTTI, C. (1939), Giorn. Batter. (Ital.) 23, 430.
- CHIARUTINI (1900), Arch. science med. (Ital.) 24, 77.
- CIANTINI, F. e A. MAGGIO (1940), Boll. Ist. sieroth. Milan, 19, 510.
- CLARK, E. and F. P. O. NAGLER (1943), Austral. J. exp. Biol. a. Med. Scienc. 21, 103.

- CLAUSEN, J. (1934), Undersogeler over de serologiske Blodtypeegenskarer. Kopenhagen.
- CLOUGH, M. C. and I. M. RICHTER (1918), Bull. Johns Hopkins Hosp. (Am.) 29, 86.
- COBBETT, L. (1899), The Lancet, S. 332.
- COCA, A. F. (1931), J. Immunol. (Am.) 20, 263.
- COHN, E. J. (1945), Science (Am.) 101, 51.
- COHN, E. J., J. L. ONCLEY, W. L. HUGHES and S. H. ARMSTRONG (1944), J. clin. Investig. (Am.) 23, cuaderno 4.
- COLE, R. I. (1904), Z. Hyg. (Al.) 46, 371.
- COLEMAN, E. and K. MEYER (1926), J. inf. diseases. (Am.) 39, 332.
- CONDREA, P., H. POENARU et G. DIMA (1937), C. r. Soc. Biol. Paris 125, 768.
- COOMBS, R. R. A., A. E. MOURANT and R. R. RACE (1945), Brit. J. exp. Path. 26, 255.
- CROMWELL, H. W. (1922), J. Immunol. (Am.) 7, 461.
- CROWELL, M. J. (1926), J. Bact. (Am.) 11, 65.
- CUMLEY, R. W. and M. R. IRWIN (1943), J. Immunol. (Am.) 46, 63.
- DAHR, P. (1937), Z. f. Rassenphys. (Al.) 9, 124.
- (1938), Z. Immunfshg. (Al.) 92, 180.
- (1938 a), Z. Rassenphys. (Al.) 10, 78.
- (1939), Klin. Wschr., pág. 471.
- (1939 a), Klin. Wschr. 18, 806.
- (1939 b), Z. Immunfshg. (Al.) 97, 168.
- (1947), Schweiz. med. Wschr., pág. 846.
- DAHR, P. und H. KNÜPPEL (1944), Z. Immunfshg. (Al.) 105, 118.
- DAHR, P., OFFE und WEDER (1940), Z. f. Rassenphys. (Al.) 11, 78.
- DEAR, P. und ZEHNER (1941), Dtsch. med. Wschr. 67, 71.
- D'ANTONA, L. (1930), Rinasc. med. (Ital.) 7, 184.
- DALE, H. (1913), J. Pharmacol. (Brit.) 4, 178.
- DALE, H. and P. HARTLEY (1916) Bioch. J. (Brit.) 10, 408.
- DAVIDSOHN, J. (1928), J. Immunol. (Am.) 16, 259.
- (1933), Z. Immunfshg. (Al.) 79, 322.
- (1933 a), J. Inf. diseases. (Am.) 53, 219.
- (1937), J. Amer. med. Ass. 108, 289.
- DAVIDSOHN, I. and S. G. RAMSDALL (1929), J. Immunol. (Am.) 17, 365.
- DAVIDSOHN, I. and SCHIRMER (1941), Proc. Chicago Path. Soc. 13, oct.; cit. por A. S. WIENER, 1945, pág. 219.
- DAVIDSOHN, I. and PH. H. WALKER (1935), Amer. J. Clin. path. 5, 455.
- DEAN, H. R. (1911), Proc. Roy. Soc., B, 84, 416.
- DEBRÉ, R. et H. BONNET (1925), C. r. Soc. Biol. Paris 93, 331.
- DEICHER, H. (1926), Z. Hyg. (Al.) 106, 561.
- DIAMOND, L. K. and R. L. DENTON (1945), J. Lab. a. Clin. Med. (Am.) 30, 821.
- Diphtheria (N. ANDREWES, Bulloch, Douglas, Dreyer, Fildes, Ledingham, Wolf), London, 1923.
- DOERR, R. (1925), 14. Kongr. d. Dtsch. dermatol. Ges. Leipzig, impreso en Arch. f. Dermatologie.
- (1929 a), Allergie und Anaphylaxie, Handb. d. path. Microorg., 3. Aufl., 1, 759-1009.

- DOERR, R. (1929 b), Allergische Phänomene, Bethes Handb. d. norm. u. path. Phys. 13, 650.
- (1932), Klin. Wschr. (Al.) 2, 1409.
- (1942), Die Lehre v. d. Infektionskrankh. in allg. Darstellung. Lehrb. d. inn. Medizin, Springer, págs. 68-169.
- (1946 a), Helvetica medica acta, Ser. A, 13, 473.
- (1946 b), Ann. Allergy (Am.) 4, 339.
- (1947 a), Die Antikörper, Erster Teil, Wien.
- (1947 b), Das Komplement, Wien.
- (1948), Die Antigene, Wien.
- DOERR, R. und W. BERGER (1921), Bioch. Z. (Al.) 123, 144.
- — (1922 a), Z. Hyg. (Al.) 96, 191.
- — (1922 b), Z. Hyg. (Al.) 96, 258.
- — (1922 b), Bioch. Z. 131, 13; Klin. Wschr. 1922 I, pág. 949.
- DOERR, R. und W. FRIEDLI (1925), 14 Kongr. Dtsch. dermat. Ges. Dresden.
- DOERR, R. und R. PICK (1913), Z. Immunföschg. (Al.) 19, 251.
- — (1914), Bioch. Z. (Al.) 60, 257.
- DOERR, R. und V. RUSS (1909), Z. Immunföschg. (Al.) 3, 181.
- DOERR, R. und S. SEIDENBERG (1931), Z. Immunföschg. 71, 242.
- DOLD, H. und F. WEIGMANN (1935 a), Z. Hyg. (Al.) 116, 146.
- — (1935 b), Z. Hyg. 116, 154.
- — (1935 c), Z. Hyg. 116, 158.
- DOLE, V. P. (1944), J. clin. Investig. (Am.) 23, 708.
- DONATH, J. und K. LANDSTEINER (1904), Münch. med. Wschr., pág. 1590.
- — (1925), Ergebn. d. Hyg. (Al.) 7, 184.
- DOOLÉY, P. (1932), J. Amer. med. Ass., pág. 1778.
- DOUGHERTY, T. F., J. H. CHASE and A. WHITE (1944), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 57, 295.
- — — (1945), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 58, 135.
- DOUGHERTY, T. F. and A. WHITE (1943 a), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 53, 132.
- — (1943 b), Science (Am.) 98, 367.
- — (1944), Endocrinology (Am.) 35, 1.
- DOUGHERTY, T. F., A. WHITE and J. H. CHASE (1944), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 56, 28.
- DOULL, J. A. and W. F. FALES (1923), Amer. J. Hyg. 3, 604.
- DOWNIE, A. W., GLENNY, PARISH, SMITH and WILSON (1941), Brit. med. J. II, 717.
- DUDLEY, S. F. (1922), Brit. J. exp. Path. 3, 204.
- (1923), Spec. Rep. Ser. med. Res. Council. (Brit.), N.° 75.
- (1926), Spec. Rep. Ser. med. Res. Council. (Brit.), N.° 111.
- (1932), J. of Hyg. (Brit.) 32, 193.
- DUDLEY, SH. F., P. M. MAY and J. O. FLYNN (1934), Spec. Rep. Ser. med. Res. Council. (Brit.), N.° 195.
- DUKE, H. L. and W. B. SCOTT (1943), Brit. med. J. II, 710.
- v. DUNGERN, E. (1902), Z. allg. Phys. (Al.) 1, 34.
- (1903), Die Antikörper, Jena.
- v. DUNGERN, E. und L. HIRSZFELD (1911), Z. Immunföschg. 8, 526.
- — (1910), Z. Immunf. (Al.) 6, 284.
- DUPONT, R. (1934), Arch. intern. de Méd. exp. (Franc.) 9, 133.

- EAGLE, H. (1935 a), *J. Immunol. (Am.)* 29, 467.
 — (1935 b), *J. Immunol. (Am.)* 29, 485.
 EASON, J. (1906), *J. Path. & Bact. (Brit.)* 11, 167.
 EDSELL, J. T. (1947), *The Plasma Proteins and Their Fractionation. Advances in Protein Chem.* 3, 383—479.
 EHRICH, W. E. and T. N. HARRIS (1942), *J. exp. Med. (Am.)* 76, 335.
 — (1945), *Science (Am.)* 101, 28.
 EHRICH, W. E., T. N. HARRIS and E. MERTENS (1946), *J. exp. Med. (Am.)* 83, 373.
 EHRICH, P. (1898), *Berl. Klin. Wschr.*, pág. 273.
 — (1881), *Z. f. Klin. Med. (Al.)* 3, 383.
 — (1899), *Berl. Klin. Wschr.*, Nr. 22.
 EHRICH, P. und H. SACHS (1902), *Berl. Klin. Wschr.* 39, 492.
 EISEN, H. N., M. M. MEYER, D. H. MOORE, R. TARR and H. C. STOERK (1947), *Proc. Soc. exp. Biol. & Med. (Am.)* 65, 301.
 EISENBERG, P. (1906), *Zbl. f. Bakt. I Orig.* 41, 96.
 EISENBERG, P. und R. VOLK (1902), *Z. Hyg. (Al.)* 40, 155.
 EISLER, M. (1928), *Tetanus, Handb. d. path. Mikroorg.* 3 Aufl. 4, 1027—1066.
 — (1930), *Z. Immunschg. (Al.)* 67, 39.
 — (1931), *Z. Immunschg. (Al.)* 73, 37.
 — (1931), *Z. Immunschg. (Al.)* 70, 48.
 ELMORE, M. E. (1928), *J. Immunol. (Am.)* 15, 21.
 ENDERS, J. F. (1944), *J. clin. Investig. (Am.)* 23, 510.
 EVANS, A. S. and E. C. CURNEN (1948), *J. Immunol. (Am.)* 58, 323.
- FAGRÄUS, A. (1947), *Nature (Brit.)*, pág. 499.
 — (1948), *J. Immunol. (Am.)* 58, 1.
 FAHRÆUS, R. (1921), *Acta med. scand.* 55, 1.
 — (1929), *Physiol. Rev.* 9, 241.
 FAMULENER, L. W. (1912), *J. inf. diseases. (Am.)* 10, 332.
 FARAGO, F. (1930), *Z. Hyg. (D.)* 118, 417.
 FELIX, A. and L. OLITZKI (1929), *Brit. J. exp. Path.* 10, 26.
 FELTON, L. D. and G. H. BAILEY (1926), *J. Immunol. (Am.)* 11, 197.
 FERGUSON, L. C. (1941), *J. Immunol. (Am.)* 40, 213.
 FERGUSON, L. C., CL. STORMONT and M. R. IRWIN (1942), *J. Immunol. (Am.)* 44, 147.
 FERRÉ (1896), *Bull. méd. (Franc.)* 10, 773.
 FEUILLE, P., P. THIRY et C. BLANCARDI (1934), *C. r. Soc. Biol. Paris* 115, 367.
 FILDES, P. (1925), *Brit. J. exp. Path.* 6, 62.
 FINLAND, M. and E. C. CURNEN (1938), *Science (Am.)* 87, 417.
 FISCHER, F. K. (1944), *Schweiz. med. Wschr.* 74, N.° 13.
 FISCHER, O. (1932), *Z. Immunschg. (Al.)* 74, 244.
 FISCHER, ODÖN (1928), *Klin. Wschr.* 7, 2061.
 FISCHER, W. und F. HAHN (1935), *Z. Immunschg. (Al.)* 84, 177.
 FISCHL, R. und WUNSCHHEIM (1895), *Prager med. Wschr. N.° 45; ref. Zbl. f. Bakt.* 19, 652 (1896).
 FLEISHER, M. S. and LLOYD JONES (1931), *J. exp. Med. (Am.)* 54, 597.
 — (1933 a), *J. Immunol. (Am.)* 24, 369.
 — (1933 b), *J. Immunol. (Am.)* 24, 383.

- FORSSMAN, J. (1911), *Bioch. Z. (Al.)* 37, 78.
— (1946), *Acta path. et microb. Scand.* 23, 145.
- FRASER, D. T. and K. F. BRANDON (1936), *Canad. publ. health J.* 27, 597.
- FREUDENBERG, K., O. WESTPHAL and P. GREENWOOD (1936), *Naturwissenschaften (Al.)* 24, 522.
- FRIEDBERGER, E. (1931), *Diphtherieepidemien der letzten Jahre, das Heilserum und die Schutzimpfung*, Berlin.
- FRIEDBERGER, E., G. BOOCK und A. FÜRSTENHEIM (1929), *Z. Immunschg. (Al.)* 64, 294.
- FRIEDBERGER, E. und D. GAJZÁGÓ (1930), *Z. Immunschg.* 67, 67.
- FRIEDBERGER, E. und HEIM (1929), *Dtsch. med. Wschr.* 43, 131.
- FRIEDEMANN, H. (1933), *Zbl. inn. Med. (Al.)*, pág. 570.
- FRIEDEMANN, H. und BEER (1933), *Dtsch. med. Wschr.*, pág. 440.
- FRIEDEMANN, U. (1947), *Dynamics and Mechanism of Immunity reactions in vivo*, *Bact. Reviews (Am.)* 2, 275.
- FRIEDEMANN, U. and A. HOLLANDER (1943), *J. Immunol. (Am.)* 47, 23, 29.
- FRIEDEMANN, U. and B. ZUGER (1939), *J. Immunol. (Am.)* 36, 193.
- FRIEDENREICH, V. (1930), *The Thomsen Hämagglutination Phenomenon*. Copenhagen.
- FRIEDENREICH, V. (1931), *Z. Immunschg. (Al.)* 71, 314.
— (1931 a), *Z. Immunschg.* 71, 283.
— (1936), *Z. Immunschg.* 89, 409.
— (1937 a), *Klin. Wschr.* 15, 310.
— (1937 b), *Klin. Wschr.* 16, 753.
— (1937 c), *Z. Immunschg.* 91, 485.
- FRIEDJUNG, K. (1919), *Monatsschr. Kinderh., Orig.* 15, cuaderno 6.
- FRIEDWALD, W. F., E. S. MILLER and L. R. WHEATLEY (1941), *J. exp. Med. (Am.)* 86, 65.
- FURUHATA, T. (1927), *Japan. Med. World* 7, 197.
- FURUHATA, T. and S. IMAMURA (1935), *Japan. J. Genet.* 11, 91.
- GAMMELGAARD, A. und P. V. MARCUSSEN (1940), *Z. Immunschg. (Al.)* 98, 411.
- GARRIDO-MORALES and MANDRY O. COSTA (1931), *Amer. J. Hyg.* 14, 89.
- GATES, R. R. (1939), *Amer. J. Phys. Anthropol.* 24, 385.
- GEISER, P., K. SCHAUB und H. STAUB (1946), *Schweiz. med. Wschr.* 76, 285.
- GELL, P. G. H., C. R. HARRINGTON and R. P. RIVERS (1946), *Brit. J. exp. Path.* 37, 267.
- GENGOU, O. (1911), *Z. Immunschg.* 11, 725.
- GIBSON, H. J. (1930), *J. Hyg. (Brit.)* 30, 337.
— (1932), *J. Immunol. (Am.)* 22, 211.
- GINSBERG, H. S., W. F. GOEBEL and F. L. HORSFALL (1947), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 66, 99.
- GLANZMANN, E. und F. OTTENSOOSER (1935), *Schweiz. med. Wschr.*, pág. 520.
- GLENNY, A. T. (1925), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 28, 241.
— (1936), *Rep. Proc. II intern. Congr. Microb. London*, pág. 363.
- GLENNY, A. T. and K. ALLEN (1921), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 24, 61.
- GLENNY, A. T. and M. BARR (1932), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 35, 99.

- GLENNY, A. T., C. G. POPE and H. WADDINGTON (1925), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 28, 279.
- GLENNY, A. T. and H. J. SÜDMERSEN (1921), *J. Hyg. (Brit.)* 20, 176.
- GLENNY, A. T. and U. WALLACE (1925), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 28, 317.
- GLIMSTEDT, G. (1936), *Acta path. microb. scand. N.º 30 (Supplement)*.
- GOEBEL, W. F. (1938), *J. exp. Med. (Am.)* 68, 221.
- GORDON, J. (1933), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 37, 367.
- GORDON, J. and H. S. CARTER (1932), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 35, 549.
- GORDON, J. and L. HOYLE (1936), *J. Hyg. (Brit.)* 43, 545.
- GORDON, J. and K. I. JOHNSTONE (1940), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 50, 483.
- GRAFE, E. (1911), *Dtsch. med. Wschr.*, pág. 2035.
- GRAFE, E. und L. MÜLLER (1908), *Arch. exp. Path. (Al.)* 59, 95.
- GRASSET, E., A. PERRET-GENTIL, J. FRIEDMAN and I. GROSS (1933), *South Afric. med. J.* 7, 779.
- GREEN, R. H. and D. W. WOOLEY (1947), *J. exp. Med. (Am.)* 86, 55.
- GREENFIELD, G. (1928), *Z. Immunschg.* 56, 107.
- GRIFFITHS, J. J. (1947), *Publ. Health. Rep., U. S. P. H. S.* 62, 865.
- v. GROER, FR. und K. KASSOWITZ (1919), *Z. Immunschg.* 28, 327.
- GRÖNWALL, A. (1935), *Bioch. Z. (Al.)* 292, 257.
- GROSSMANN, M. (1917), *Münch. med. Wschr.*, pág. 725.
- GRUBER, S., A. LITVAK and M. JACOBI (1946), *J. Pediatrics (Am.)* 29, 518.
- GRUMBACH, A. (1946), *Ann. pediatr.* 166, 210.
- GUILLAUME, M. (1944), *C. r. Soc. Biol. Paris* 138, 68.
- GUTHRIE, C. G., J. GELIEN and W. L. MOSS (1920), *John Hopkins Hosp. Bull.* 31, 388.
- GUTHRIE, C. G., B. C. MARSHALL and M. L. MOSS (1921), *John Hopkins Hosp. Bull.* 32, 369.
- HaidvoGL, M. (1926), *Münch. med. Wschr.* 73, 358.
- HALLAUER, C. (1946), *Scientia (Ital.)* 40, 46.
- HAMBURGER, FR. und HAIDVOGL (1927), *Arch. Hyg. (Al.)* 98, 108.
- HAMBURGER, FR. und J. SIEGL (1929), *Münch. med. Wschr.*, pág. 1537.
- HAMM, T. H. and W. B. CASTLE (1940), *Trans. A. Amer. Physicians* 55, 127.
- HAMM, T. H. and F. C. CURTIS (1938), *Medicine (Am.)* 17, 447.
- HANGANATZIU, M. (1924), *C. r. Soc. Biol. Paris* 91, 1457.
- HANNEMA, L. S. and J. R. RYTMA (1922), *Lancet (Brit.)*, pág. 1217.
- HAPP, J. (1920), *J. exp. Med. (Am.)* 31, 313.
- HAPPEL (1915), *Münch. med. Wschr.*, pág. 1030.
- HARDT, O. (1937), *Z. Rassenphys. (Al.)* 9, 178.
- HARMON, P. H. and N. H. HARKINS (1936), *J. Amer. med. Ass.* 107, 552.
- HARPOTH, H. (1935), *Z. Rassenphys. (Al.)* 7, 135.
- HARRIS, T. N. and W. E. EHRLICH (1946), *J. exp. Med. (Am.)* 84, 157.
- HARRIS, T. N., E. GRIMM, E. MERTENS and W. E. EHRLICH (1945), *J. exp. Med. (Am.)* 81, 73.
- HARRIS, T. N., J. RHOADS and J. STOKES (1948), *J. Immunol. (Am.)* 58, 27.
- HARRISON, J. A. and E. H. FOWLER (1945), *Science (Am.)* 102, 65.
- HART, A. (1942), *Bruns Beitr.* 173, 488.
- HARTLEY, P. (1931), *Syst. of Bact. (Brit.)* 6, 251.
- HARTLEY, P. and C. J. MARTIN (1919/20), *Proc. roy. Soc. Med. (Brit.)* 13, 277.

- HAUROWITZ, F. (1936), *Kolloid-Zschr. (Al.)* 74, 208.
— (1942), *J. Immunol. (Am.)* 43, 331.
— (1943), *Schweiz. med. Wschr.,* pág. 264.
— (1946/47), *C. r. ann. Soc. Turque des Scienc.,* fasc. 13.
HAUROWITZ, F. und F. BREINL (1932), *Z. Phys. Chem. (Al.)* 205, 259.
HAUROWITZ, F. und F. KRAUS (1936), *Z. phys. Chem. (Al.)* 239, 76.
HAUROWITZ, F., RADIJE CINDI and P. SCHWERIN (1946), *Tib Fakültesi Mecmuasi,* pág. 265.
HAUROWITZ, F., P. SCHWERIN and SAIDE TUNC (1946), *Arch. of Biochem. (Am.)* 11, 515.
HAUROWITZ, F., M. TUNKA und P. SCHWERIN (1943), *Bioch. J. (Brit.)* 37, 249.
HAURÖWITZ, F., M. VARDAR and P. SCHWERIN (1942), *J. Immunol. (Am.)* 43, 327.
HEIDELBERGER, M. (1942), *J. gener. Phys. (Am.)* 25, 523.
HEIDELBERGER, M. and E. A. KABAT (1934), *J. exp. Med. (Am.)* 60, 643.
— — (1941), *J. exp. Med. (Am.)* 74, 105.
HEIDELBERGER, M. and F. E. KENDALL (1930), *Science (Am.)* 72, 252.
— — (1935 a), *J. exp. Med. (Am.)* 61, 559.
— — (1935 b), *J. exp. Med. (Am.)* 62, 697.
HEIDELBERGER, M., H. P. TREFFERS and M. MAYER (1940), *J. exp. Med. (Am.)* 71, 271.
HELMMEYER, L. (1942), *Handb. d. inn. Medizin MOHR-STÄHELIN* 2.
HEIM (1926), *Monatsschr. f. Geb. u. Gyn. (Al.)* 74, 52.
HEINBECKER, P. and IRVINE-JONES (1928), *J. Immunol. (Am.)* 15, 395.
HEINLEIN, H. (1943), *Z. ges. exp. Med. (Al.)* 112, 535.
HEINMETS, F. (1948), *J. Bact. (Am.)* 55, 823.
HEKTOËN, L. (1915), *J. inf. diseases. (Am.)* 17, 415.
HELLER (1937), *Kinderärztl. Praxis* 4; citado por H. SCHMIDT, 1940, pág. 108.
HELLMAN, T. und G. WHITE (1930), *VIRCHOWS Arch. (Al.)* 278, 221.
HERDER, R. H. (1934), *Z. f. Kinderheilk.* 56, 51.
HEYROVSKY, H. und K. LANDSTEINER (1907), *Zbl. f. Bakt. I Orig.* 44, 150.
HILL, J. M. and S. HABERMAN (1946), *Internat. Hematol. and Rh-Conference,* Dallas, Tex., 15. Novemb.
HIRANO, H. (1932), *Philippine J. Scienc.* 47, 449.
HIRST, G. K. (1942), *J. exp. Med. (Am.)* 76, 195.
— (1948 a), *J. exp. Med. (Am.)* 87, 301.
— (1948 b), *J. exp. Med. (Am.)* 87, 315.
HIRSZFELD, L. (1926), *Ergebn. d. Hyg. (Al.)* 8, 367.
— (1928), *Konstitutionserologie und Blutgruppenforschung,* Berlin.
— (1934), *Ergbn. d. Hyg. (Al.)* 15, 54.
— (1947), *J. Immunol. (Am.)* 55, 147.
HIRSZFELD, L. et R. ANZEL (1940), *Rév. d'Immun. (Franz.)* 6, 31.
— — (1940 a), *Ann. Inst. Past. Paris,* 65, 251, 386.
HIRSZFELD, H. und L. HIRSZFELD (1927), *Z. Immunföschg. (Al.)* 54, 81.
HIRSZFELD, H., L. HIRSZFELD und H. BROKMAN (1924), *J. Immunol. (Am.)* 9, 571.
HIRSZFELD, L. und Z. KOSTUCH (1938), *Klin. Wschr.,* pág. 1047.
— — (1938 a), *Schweiz. Z. Path. u. Bakt.* 1, 23.
HIRSZFELD, L. und J. SEYDEL (1925), *Z. Hyg. (Al.)* 104, 465.

- HIRSZFELD, L. und H. ZBOROWSKI (1925), *Klin. Wschr.* 4, 1152.
 HÖGLUND, G. (1927), *Acta med. Scand.* 66, 33.
 HOOKER, ST. (1941), *New England J of Med.* 225, 871.
 HOOKER, S. B. and W. C. BOYD (1932), *J. Immunol. (Am.)* 23, 465.
 HOTTINGER, A. (1935), *Schweiz. med. Wschr.*, pag. 772.
 — (1936), *Schweiz. med. Wschr.*, pag. 1236.
 HOTTINGER, A. und E. LORENZ (1932 a), *Z. exp. Med. (Al.)* 82, 719.
 — — (1932 b), *Klin. Wschr.*, pag. 1335.
 HOWE, H. A. and D. BODIAN (1945), *Amer. J. Hyg.* 42, 266.
 HOWE, H. A. and J. CRAIGIE (1943), *J. Bact. (Am.)* 45, 87.
 HOWE, P. E. (1921), *J. biol. Chem. (Am.)* 49, 115.
 — (1922), *J. biol. Chem. (Am.)* 53, 479.
 HOWELL, K. (1920), *arch. int. Med.* 26, 706.
 HÜBENER, G. (1926), *Z. Immunschg. (Al.)* 45, 223.
 HUNTER, P. S. (1930), *Ann. Rep. for 1930, Health. Dep. of Singapore.*

 IMAMURA, S. (1935), *Hanzaigaku-Zasshi (Jap.)* 9, 589.
 IMAMURA, S. y SUZUKI (1936), *Japan. J. Genetics* 12, 50.
 INGALLS, S. (1937), *J. Immunol. (Am.)* 33, 123.
 IWAI, S. and M. NIN (1925), *Japan. med. World* 5, 119.
 — — (1926), *Japan. med. World* 6, 345.

 JACKSON, F. W. (1937), *Canad. publ. Health* 28, 363.
 JAMESON, E., C. ALVAREZ-TOSTADO and H. H. SORTOR (1942), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 51, 163.
 JENNINGS, R. K. and L. DESPAIN SMITH (1942), *J. Immunol. (Am.)* 45, 105.
 JENSEN, CL. (1931), *C. r. Soc. Biol. Paris* 108, 528, 532, 543, 552, 577.
 — (1932), *Monatsschr. f. Kinderheilk. (Al.)* 52, 346.
 JENSEN, ERIKA (1938), *Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. (Al.)* 42, 481.
 JESSEN, C. U. and J. BING (1940), *Acta med. Scand.* 105, 287.
 JOHANN, A. M. (1941), *Z. Immunschg. (Al.)* 100, 292.
 JONES, F. S. (1927), *J. exp. Med. (Am.)* 46, 291.
 — (1928), *J. exp. Med. (Am.)* 47, 245.
 JONES, F. S. and R. B. LITTLE (1933), *J. exp. Med. (Am.)* 57, 721, 729.
 JONES, LLOYD and M. S. FLEISHER (1934), *J. Immunol. (Am.)* 26, 455.
 — — (1936), *J. Immunol. (Am.)* 31, 215.
 JORDAN, E. O. (1937), *J. inf. diseases (Am.)* 61, 79.
 JUDE, A. (1939), *Rév. d'Immunol. (Franc.)* 5, 90.
 JUNGEBLUT, C. W. (1935/36), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 33, 137.
 JUNGEBLUT, C. W. and T. ENGLE (1931/32), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 29, 879.
 JUNGEBLUT, C. W., K. MEYER and ENGLE (1934), *J. Immunol. (Am.)* 27, 43-

 KACZKOWSKI, B. (1928), *C. r. Soc. Biol. Paris* 98, 386.
 KAEMPFER, A. (1932), *Z. induct. Abstammungs- u. Vererbgs. 61, 261.*
 — (1935), *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* 25, 231.
 KAGAN, N. W. (1931), *Z. Immunschg. (Al.)* 72, 20.
 KARASAWA, M. und B. SCHICK (1910), *Jahrb. f. Kinderheilk. (Al.)* 72, 264.
 KARELITZ, S. (1942), *J. Immunol. (Am.)* 44, 285.

- KARELITZ, S. and A. GLORIG (1943), *J. Immunol. (Am.)* 47, 121.
KARELITZ, S. and S. S. STEMPIEN (1942), *J. Immunol. (Am.)* 44, 271.
KASTENMEYER, W. (1919), *Arch. f. Kinderheilk. (Al.)* 67, 365.
KAZNELSON, P. (1922), *Dtsch. Arch. f. Klin. Med.* 138, 46.
KEILHACK, H. (1936), *Fol. haemat. (Al.)* 55, 406.
KEMP, H. A. and B. O. BAKER (1936 a), *Amer. J. clin. Path.* 6, 560.
— (1936 b), *Amer. J. clin. Path.* 6, 557.
KEMP, T. (1930), *Acta path. et microb. scand.* 7, 146.
KERRIN, J. C. (1929), *Brit. J. exp. Path.* 10, 370.
KETELSEN, O. (1938), *Z. Immunföschg. (Al.)* 93, 87.
KETTEL, K. (1930), *Undersogelser over Kuldehaemagglutinine. Copenhagen.*
KINDERMANN, M. (1935), *Z. Immunföschg. (Al.)* 85, 366.
KINNEARD, G. (1935), *Brit. med. J.*, pág. 201.
KIRSCHNER, L. (1929), *Meded. Dienst Volksgez. Ned.-Ind.* 18, 164.
KIRSTEIN, F. (1922), *Arch. f. Gynäk. (Al.)* 115, 327.
KLECZKOWSKI, A. (1941), *Brit. J. exp. Path.* 22, 188.
KLEINE, F. K. (1940), *Dtsch. med. Wöchr.*, pág. 1366.
KLEINE, F. K. und H. KROÓ (1930), *Dtsch. med. Wöchr.* 56, 46.
KLIEWE, H. und M. WESTHUES (1925), *Münch. med. Wöchr.*, pág. 587.
KLINGENSTEIN, R. (1930), *Z. Immunföschg. (Al.)* 66, 99.
KOBEL, M. (1899), *Z. Hyg. (Al.)* 31, 433.
KOBERT (1900), *Sitzungsber. naturw. Ges. Rostock*, 25. Mai 1900.
KÖPFLIN, F. (1936 a), *Z. f. Klin. Med. (Al.)* 129, 512.
— (1936 b), *Z. f. Klin. Med. (Al.)* 130, 784.
KRAMER, S. D. and M. L. AYCOCK (1931/32), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 29, 98.
KRAUS, R. (1903), *Zbl. f. Bakt.* 34, 488.
— (1923), *Wien. Klin. Wöchr.*, pág. 67.
KRAUS, R. und R. DOERR (1905), *Wien. Klin. Wöchr.*, pág. 158.
KRAUS, R. et A. SORDELLI (1920), *C. r. Soc. Biol. Paris* 83, 1497.
KREJCI, L. E., R. K. JENNINGS and L. DESPAIN SMITH (1924), *J. Immunol. (Am.)* 45, 111.
KREJCI, L. E., L. DESPAIN SMITH and T. J. DIETZ (1941), *J. Franklin Inst. (Am.)* 231, 396.
KRETZ, R. (1903), *Wien. Klin. Wöchr.*, pág. 528.
— (1909), *Technik d. Antikörperzeugung an grossen Tieren. Handb. d. Techn. u. Meth. Immunföschg.* 2, 1-32.
KROMME, L. de und L. A. M. VAN DER SPECK (1947), *Nederl. Tijdschr. Geneesk.* 32, 2202.
KUMAGAI und INOUE (1912), *Dtsch. med. Wöchr.*, pág. 361.
KÜSSNER, B. (1879), *Dtsch. med. Wöchr.*, pág. 475.
KUZIN, A. M. y N. A. NEVRAEVA (1947), *Biokhimiya (Rus.)* 12, 49; ref. en *Chemical Abstracts* 41: 4849 (1947).
KYES, P. and E. S. CAREY (1927), *J. Immunol. (Am.)* 14, 123.
LANDSTEINER, K. (1901), *Wien. Klin. Wöchr.* 14, 1132.
— (1903), *Münch. med. Wöchr.* 50, 1812.
— (1928), *The newer Knowledge of Immunology and Bacteriology. Chicago Press*, pág. 899.

- LANDSTEINER, K. (1938 a), C. r. Soc. Biol. Paris 99, 658.
 — (1928 b), J. Immunol. (Am.) 15, 589.
 — (1931), Science 73, 403.
 — (1945), The specificity of serological reactions. Rev. Edition. Harvard Univ. Press.
- LANDSTEINER, K. und CALVO (1902), Zbl. f. Bakt. 31, 781.
 LANDSTEINER, K. and M. W. CHASE (1936), J. exp. Med. (Am.) 63, 813.
 — — (1940), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 44, 559.
 LANDSTEINER, K. and HARTE (1940), J. exp. Med. (Am.) 71, 551.
 — — (1941), J. biol. Chem. (Am.) 140, 673.
 LANDSTEINER, K. and PH. LEVINE (1926), J. Immunol. (Am.) 12, 441.
 — — (1927), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 24, 600, 941.
 — — (1928), J. exp. Med. (Am.) 47, 757.
 — — (1929), J. Immunol. (Am.) 17, 1.
 — — (1930 a), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 28, 309.
 — — (1930 b), J. Immunol. (Am.) 18, 87.
 — — (1931), J. Immunol. (Am.) 20, 179.
 — — (1932), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 30, 209.
 LANDSTEINER, K. and C. PH. MILLER (1925), J. exp. Med. (Am.) 42, 853.
 LANDSTEINER, K. und E. PRÁSEK (1911), Z. Immunschg. (Al.) 10, 68.
 LANDSTEINER, K. und M. REICH (1905 a), Z. Hyg. (Al.) 58, 213.
 — — (1905 b), Zbl. Bakt. 39, 712.
 LANDSTEINER, K. and J. VAN DER SCHEER (1925), J. exp. Med. (Am.) 41, 427.
 — — (1932), J. exp. Med. (Am.) 55, 781.
 — — (1934), J. exp. Med. (Am.) 59, 751.
 — — (1936), J. exp. Med. (Am.) 63, 325.
 — — (1939), J. exp. Med. (Am.) 69, 705.
 LANDSTEINER, K., W. R. STRUTTON and M. W. CHASE (1934), J. Immunol. (Am.) 27, 469.
 LANDSTEINER, K. und A. STURLI (1902), Wien. Klin. Wschr., pág. 38.
 LATTES, L. und C. CREMA (1928), Z. Immunschg. (Al.) 57, 287.
 LEACH, CH. N. und G. PÖCH (1935 a), Wien. Klin. Wschr., Nr. 9.
 — — (1935 b), J. Immunol. (Am.) 29, 368.
 LE DANTEC (1912), Biologica 2, 225.
 LEHNDORFF, H. (1934), Münch. med. Wschr., pág. 447.
 LEMÉTAYER, E. et DE DIÉTRICH (1936), C. r. Soc. Biol. Paris 122, 614.
 LENART, G. und J. KÖNIG (1928), Klin. Wschr. 12, 549.
 LESCHLY, W. (1916), Z. Immunschg. (Al.) 25, 219.
 LEVINE, P., L. BURNHAM, E. KATZIN and VOGEL (1941), Amer. J. Obst. a. Gyn. 42, 925.
 LEVINE, P. and E. M. KATZIN (1941), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 48, 126.
 — — (1938), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 39, 167.
 LEWIS, K. H. and E. V. HILL (1947), J. Bact. (Am.) 53, 213.
 LEWIS, J. L. and H. G. WELLS (1922), J. Amer. med. Ass. 78, 863.
 LICHTHEIM, L. (1878), Virkm. Sammlg. Klin. Vorth. Nr. 134, pág. 1148.
 — (1883), Korresp.-Blatt f. Schweiz. Ärzte, pág. 372.
 LINCOLN, E. M. and CH. K. GREENWALD (1933), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 30, 1241.

- LIND, P. and N. McARTHUR (1948), Austral. J. exp. Biol. (cit. por B. A. BRIODY).
- LITTLE, R. B. (1929), J. Immunol. (Am.) 17, 377.
- LOISELEUR, J. (1946 a), C. r. Acad. Scienc. Paris 222, 159.
— (1946 b), C. r. Acad. Scienc. Paris 222, 461.
— (1946 c), C. r. Acad. Scienc. Paris 222, 978.
— (1946 d), C. r. Acad. Scienc. Paris 222, 1013.
— (1947), C. r. Acad. Scienc. Paris 224, 505, 687.
- LOISELEUR, J. et M. LÉVY (1947), Ann. Inst. Past. Paris 73, 116.
- LOITTEUR, J. et M. LÉVY et SUREAU (1946), Ann. Inst. Past. Paris 72, 731.
- LONGWORTH, L. G., R. M. CURTIS and R. H. PEMBROKE (1945), J. clin. Investig. (Am.) 24, 46.
- LOOS, J. (1896), Z. f. Kinderheilk. (Al.) 42, 360.
- LORENTZ, F. H. (1933), Münch. med. Wschr., pág. 1388.
- LOVELL, R. (1932), J. comp. Path. 45, 27.
— (1934), J. comp. Path. 47, 107.
- LÖWY, O. (1915), Wien. Klin. Wschr., pág. 1269.
- LÜDKE, H. (1905), Zbl. f. Bakt. 38, 81.
— (1906), Zbl. f. Bakt. I Orig. 42, 69.
— (1906), Zbl. f. Bakt. I Orig. 42, 260, 262.
- LUZZAEI und SORGENTE (1901), Arch. f. Kinderheilk. (Al.) 32, 183.
- MACDOWELL, E. and J. HUBBARD (1922/23), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 20, 93.
- MACHEBOEUF, M. (1939), L'Immunochimie. Expos. ann. d. Biocho. Med. 2. Série, pág. 117.
- MACKIE, T. J. and M. H. FINKELSTEIN (1930), J. Hyg. (Brit.) 30, 1.
— (1931), J. Hyg. (Brit.) 31, 35.
— (1932), J. Hyg. (Brit.) 32, 1.
- MADSEN, E. (1939), Acta path. et microb. scand. 16, 113.
- MADSEN, TH. (1909), Methoden der Immunisierung bei kleinen Versuchstieren. Handb. Techn. u. Meth. d. Immunschg. 2, 33-61.
- MADSEN, TH. und S. SCHMIDT (1929), C. r. Soc. Biol. Paris 102, 1091, 1093.
- MADSEN, TH. und O. STRENG (1910), Z. phys. Chem. (D.) 70, 263.
- MALKOFF, G. M. (1900), Dtsch. med. Wschr. 26, 229.
- MARIE, P. L. (1916), C. r. Soc. Biol. Paris 79, 149.
- MASUGI, M. (1927/28), Krankheitschg. (Al.) 3, 375.
- MATSUO (1912), Dtsch. Arch. f. Klin. Med. 107, 335.
- MAXIMOW, AL. (1928), Arch. exp. Zellfsg. (Al.) 5, 169.
- MAYER, J. B. (1937), Zbl. f. Bakt. I Orig. 139, 137.
- MAYER, M. and M. HEIDELBERGER (1942), J. biol. Chem. (Am.) 143, 567.
- MCCREA, J. F. (1947), Austral. J. exp. Biol. 25, 127.
- MCMMASTER, P. D. and S. S. HUDACK (1935), J. exp. Med. (Am.) 61, 783.
- MCMMASTER, P. D. and J. G. KIDD (1937), J. exp. Med. (Am.) 66, 73.
- METSCHNIKOFF, E. (1899), Ann. Past. Paris 13, 737.
- MEYER, E. und EMMERICH (1909), Dtsch. Arch. Klin. Med. 96, 287.
- MICHELIS, J. und B. SCHICK (1913), Z. Kinderheilk. (Al.) 5, 255.
- MICHON, P., M. VERRAIN et A. ZIEGLER (1936), C. r. Soc. Biol. Paris 121, 1419.
- MINNETT, F. C. (1922), J. comp. Path. a. Ther. (Brit.) 35, 291.

- MINO, P. (1923), *Giorn. d. Clin. med. (Ital.)* 4, 561.
 — (1924), *Dtsch. med. Wschr.* 50, 1533.
 MOLDOVAN, J. (1926), *Seuchenbekämpfung* 3, 188.
 MOORE, D. H., J. VAN DER SCHEER and R. G. WYCKOFF (1940), *J. Immunol. (Am.)* 38, 221.
 MORESCHI, C. (1908), *Zbl. f. Bakt. I* 46, 49.
 — (1914), *Z. Immunschg. (Al.)* 21, 410.
 MORGAN, I. M., H. A. HOWE and D. BODIAN (1947), *Amer. J. Hyg.* 49, 379.
 MORGAN, W. T. J. (1931), *Brit. J. exp. Path.* 12, 62.
 — (1936), *Bioch. J. (Brit.)* 30, 909.
 — (1937), *Bioch. J. (Brit.)* 31, 2003.
 — (1938), *Helvetica chim. acta* 21, 469.
 — (1947), *Experientia*, 3, 257.
 MORGAN, W. T. J. and R. VAN HEYNIGEN (1944), *Brit. J. exp. Path.* 25, 5.
 MORGAN, W. T. J. and S. M. PARTRIDGE (1940), *Bioch. J. (Brit.)* 34, 169.
 MORGAN, W. T. J. and H. SCHÜTZE (1946), *Brit. J. exp. Path.* 27, 286.
 MORGAN, W. T. J. and M. B. R. WADDELL (1945), *Brit. J. exp. Path.* 26, 387.
 MORGAN, W. T. J. and W. M. WATKINS (1948), *Brit. J. exp. Path.* 29, 159.
 MORO, E. und S. NODA (1909), *Münch. med. Wschr.*, pag. 545.
 MORVILLE, P. (1920), *Acta path. e microb. scand.* 6, 39.
 — (1930), *Undersogelser over Isoagglutiner hos Modre og Nyfodte. Habil.-Schr. Kopenhagen.*
 MOUREAU, P. et J. LAMBERT (1939), *C. r. Soc. Biol. Paris* 131, 148, 819.
 MUDD, ST. (1932), *J. Immunol. (Am.)* 23, 423.
 MUELLER, J. HOWARD (1941), *J. Immunol. (Am.)* 42, 353.
 MUIR, R. and C. H. BROWNING (1906), *J. Hyg. (Brit.)* 6, 20.
 MÜLLER, P. TH. (1909), *Arch. Hyg. (Al.)* 64, 62.
 MURAKAMI, J. (1936), *Z. Immunschg. (Al.)* 88, 182.
 MURPHY, J. B. and E. STURM (1925), *J. exp. Med. (Am.)* 41, 245.
 MURRAY, J. F. (1942), *South Afric. med. J.* 16, 247.
 — (1943), *J. Hyg. (Brit.)* 43, 159.
 MURTO (1914), *Akad. Abhandl. Helsinki.*
 NAKAMURA, I (1931), *Keijo J. Med. (Jap.)* 2, 425; cit. por Stats und Wassermann (1943).
 NAMBA, MUTSUMIE (1925), *Dtsch. med. Wschr.*, pag. 594.
 NEILL, J. M., E. L. GASPARI and R. A. MOSLEY (1931), *J. Immunol. (Am.)* 20, 347.
 NEILL, J. M., GASPARI, MOSLEY and J. V. SUGG (1931), *J. Immunol. (Am.)* 21, 101.
 NETTER, A. (1915), *C. r. Soc. Biol. Paris* 78, 505.
 NEUJEAN, G. (1937), *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 17.
 NICOLLE, M. (1908), *Ann. Inst. Past. Paris* 22, 237.
 NIGG, CLARA (1930), *J. Immunol. (Am.)* 19, 1.
 NOBLE, W. (1915), *J. inf. diseases. (Am.)* 16, 132.
 NOEGGERATH, C. und E. SCHOTTELIUS (1915), *Münch. med. Wschr.*, pag. 1293.
 OCHSENIUS, K. (1917), *Jahrb. f. Kinderheilk. (Al.)* 85, 280.
 OLBRICH, S. (1937), *Z. Immunschg. (Al.)* 91, 242.

- OLITZKI, L. (1931), *Z. Immunschg.* (Al.) 72, 498.
- OLIVER-GONZÁLEZ, J. (1941), *J. inf. diseases.* (Am.) 69, 254.
- OPIE, E. L. and J. FURTH (1926), *J. exp. Med.* (Am.) 43, 469.
- OPITZ, H. (1915), *Dtsch. med. Wschr.* 41, 914.
- (1927), *Klin. Wschr.*, pág. 1701.
- ORDMAN, C. W., C. G. JENNINGS and C. A. JANEWAY (1944), *J. clin. Invest.* (Am.) 23, 541.
- ORLOWSKI, W. (1895), *Dtsch. med. Wschr.* 21, 400.
- ORUDSCHIEW, D. (1912), *Z. Immunschg.* (Al.) 16, 268.
- OSTERLIND, G. (1938), *Acta path. microb. scand., Supplem.* No. 34.
- OTTENBERG, R. and W. THALHIMER (1915), *J. med. Research.* 28 N. S. 213.
- OTTENSOOSER, F. und TOBLER (1937), *Z. Immunschg.* (Al.) 90, 65.
- OTTO, H. und G. MITTAG (1937), *Klin. Wschr.*, pág. 294.
- PANUM (1847), *Virchows Arch.* 1, 492.
- PARFENTJEV, I. A., U. S. Patente No. 2065, 196 (1936), und No. 2123, 198 (1937).
- PARISH, H. J. and C. C. OKELL (1926), *Brit. J. exp. Path.* 7, 173.
- (1928), *Lancet* II, pág. 322.
- PARISH, H. J. and J. WRIGHT (1938), *Lancet* 234, 882.
- PARK, W. H. and A. ZINGHER (1916), *Amer. J. Public Health* 6, 431.
- PASCHLAU, G. (1938), *Dtsch. med. Wschr.* 64, 251.
- PATERSON, J. L. H., R. R. RACE and G. L. TAYLOR (1942), *Brit. med. J.* II, 37.
- PAUL, J. R. and W. W. BUNNEL (1932), *Am. J. med. Scienc.* 183, 90.
- PAULING, L. (1940), *J. Amer. Chim. Soc.* 62, 2643.
- (1945), *Molecular structure and intermolecular forces.* In K. LANDSTEINER (1945).
- PAULING, L. and D. H. CAMPBELL (1942 a), *Science* (Am.) 95, 440.
- (1942 b), *J. exp. Med.* (Am.) 76, 211.
- PEDERSEN, K. O. (1945), *Ultracentrifugal Studies on Serum and Serum Fractions.* Uppsala.
- PEHU, M. et P. DURAND (1920), *Ann. de Méd.* (Franc.) 7, 196.
- PENNA, J. (1918), *Rev. Inst. bact. Buenos Aires* 1, 116.
- PETRIE, G. F. (1942/43), *Bull. Health. Organ. L. of Nat.* 10, 113.
- PFEIFFER, R. und E. MARX (1898), *Z. Hyg.* (Al.) 27, 272.
- PICK, E. P. (1901), *Hofmeisters Beitr. z. chem. Phys. u. Path.* (Al.) 1, 321, 393, 445.
- PICKETT, M. J., P. D. HOEPRICH and R. O. GERMAN (1945), *J. Bact.* (Am.) 49, 515.
- PIJPER, A. (1938), *J. Path. a. Bact.* (Brit.) 47, 1.
- PILLMER, L., R. WITTLER and D. B. GROSSBERG (1946), *Science* (Am.) 103, 615.
- v. PIRQUET, C. and B. SCHICK (1905), *Die Serumkrankheit.* Leipzig u. Wien.
- PLASS, E. D. and C. W. MATTHEW (1926), *Amer. J. Obstet. a. Gyn.* 12, 847.
- POCHON, J. (1936 a), *Ann. Inst. Past. Paris* 57, 82.
- (1936 b), *C. r. Soc. Biol. Paris* 121, 300.
- POLAYES, S. H., M. LEDERER and A. S. WIENER (1929), *J. Immunol.* (Am.) 17, 545.

- POLSON, A. (1943), *Nature (Brit.)* 152, 413.
- POPPE, K. (1919), *Berl. tierärztl. Wschr.* 35, 173.
- (1923), *Zbl. Bakt., I Orig.* 89, 29.
- POPPER (1868), *Osterr. Z. f. prakt. Heilk.*, pág. 657.
- POTTER, E. L. (1947), *Rh... its relation to congenital hemolytic disease and to intragroup transfusion reaction.* Chicago.
- PRÁSEK, E. (1914), *Z. Immunforsch. (Al.)* 20, 146.
- PRESSMAN, D., D. H. CAMPBELL and L. PAULING (1942), *J. Immunol. (Am.)* 44, 101.
- PUTKONEN, T. (1930), *Acta Soc. med. Fennic. "Duodecim", Ser. A* 14, fasc. 2.
- RAMON, G. (1922), *C. r. Soc. Biol. Paris* 86, 661, 711.
- (1930), *C. r. Soc. Biol. Paris* 104, 31.
- (1936), *Rév. d'Immunol. (Franc.)* 2, 305.
- RAMON, G., R. DEBRÉ et P. THIROLOIX (1930), *C. r. Soc. Biol. Paris* 105, 748.
- RAMON G. et R. DESCOMBEY (1927), *Ann. Inst. Past. Paris* 41, 834.
- RAMON, G. et R. DESCOMBEY et E. LEMETAYER (1931), *Ann. Inst. Past. Paris* 46, 444.
- RAMON, G. et B. ERBER (1935), *Rév. d'Immunol. (Franc.)* 1, 425.
- RAMON, G., B. ERBER et R. RICHOU (1936), *C. r. Soc. Biol. Paris* 121, 285.
- RAMON, G. et F. LEMÉTAYER (1931), *Bull. Acad. Vétér. France* 6, 84.
- — (1932), *C. r. Soc. Biol. Paris* 109, 827.
- — (1933), *C. r. Soc. Biol. Paris* 112, 1157.
- — (1934), *C. r. Soc. Biol. Paris* 116, 275.
- — (1935), *Rev. d'Immunol. (Franc.)* 1, 209.
- RAMON, G. et P. NÉLIS (1935), *Rev. d'Immunol. (Franc.)* 1, 431.
- RAMON, G. et R. RICHOU (1936), *C. r. Soc. Biol. Paris* 121, 621.
- — (1936 a), *C. r. Soc. Biol. Paris* 123, 738.
- RAMON, G., R. RICHOU et J. DESCAZEUX (1935), *Rev. d'Immunol. (Franc.)* 1, 401.
- RAMON, G., R. RICHOU, L. NICOL et A. LUPU (1936), *C. r. Soc. Biol. Paris* 121, 521.
- RAMON, G. et C. ZOELLER (1926), *C. r. Acad. Scienc. Paris* 182, 245.
- — (1927 a), *C. r. Soc. Biol. Paris* 96, 762.
- — (1927 b), *Ann. Inst. Past. Paris* 41, 803.
- RAPPOPORT, M., M. I. RUBIN and D. CHAFFEE (1943), *J. clin. Investig. (Am.)* 22, 487.
- RATNER, B. (1943), *Allergy, Anaphylaxis and Immunotherapy.* Baltimore.
- VAN RAVENSWAAY, A. C. (1935), *New England J. Med.* 221, 1001.
- REGAMEY, R. (1943), *Schweiz. Z. Path. u. Bakt.* 6, 409.
- REGAMEY, R. et E. NOVEL (1943), *Schweiz. Z. Path. u. Bakt.* 6, 407.
- REH, TH. (1935), *C. r. Soc. Biol. Paris* 119, 520.
- REISNER, E. H. and M. KALKSTEIN (1942), *Amer. J. med. Scienc.* 203, 313.
- RICH, A. R. (1944), *The Pathogenesis of Tuberculosis*, Springfield, págs. 414 y 593.
- RICHOU, R. (1936), *C. r. Soc. Biol. Paris* 123, 741.
- RICHOU, R. et E. EICHHORN (1936), *C. r. Soc. Biol. Paris* 121, 307.
- RICHOU, R. et G. TORRISI (1933), *C. r. Soc. Biol. Paris* 114, 595.
- RICHTERS, E. (1935), *Berl. tierärztl. Wschr. (Al.)* 51, 401.

- RISSLING, P. (1907), *Zbl. f. Bakt., I. Orig.* 44, 54r.
- ROBERTSON, M. (1934), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 38, 363.
- ROBERTSON, O. H. and P. ROUS (1918) *J. exp. Med. (Am.)* 27, 563.
- RODET, A. (1907), *Zbl. f. Bakt., I. Orig.* 37, 714.
- RÖMER, P. H. (1908/9), *Z. Immunschg. (Al.)* 1, 363.
- RÖMER, P. und T. SAMOS (1909), *Z. Immunschg. (Al.)* 3, 344.
- ROSENMAN, M. (1937), *Bioch. Z. (Al.)* 294, 34.
- ROSENTHAL, N. und G. WENCKEBACH (1933), *Klin. Wschr.*, pág. 499.
- ROSENTHAL, L. (1943), *J. Bact. (Am.)* 45, 545.
- ROSLING, E. (1928), *Z. Immunschg. (Al.)* 59, 521.
- ROSS, H. (1946), *Naturwissensch. (Al.)* 33, 316.
- ROTHER, A. (1945), *Science (Am.)* 102, 446.
- (1946), *J. biol. Chem. (Am.)* 163, 345.
- ROTKY, K. (1914), *Zbl. f. inn. Med. (Al.)* 35, 953.
- ROUX, E. et L. MARTIN (1894), *Ann. Inst. Past. Paris* 8, 609.
- SABIN, F. R. (1939), *J. exp. Med. (Am.)* 70, 67.
- SACHS, H. (1929), *Hämolytische Serumwirkung (Hämolsine) und Komple-
mentbindung (Cytotoxische Sera). Handb. d. pathog. Mikroorg., 3. Aufl.*
2, págs. 778-928.
- SACHS, H. und J. BAUER (1911), *Arb. a. d. Inst. f. exp. Therap. Frankfurt*,
Cuaderno 3, 1.
- SACHS, H., A. KLOPSTOCK und A. J. WEIL (1925), *Klin. Wschr.*, Nr. 15 u. 25.
- SADUSK, J. F. (1929), *J. Amer. med. Ass.* 112, 1682.
- SALEN, E. B. (1935), *Acta med. Scand.* 86, 570.
- SALEUN, BORDES, CECCALDI, PALINACCI (1938), *Bull. Soc. Path. exot.* 31, 564.
- SASAKI, H. (1932), *Z. Immunschg. (Al.)* 77, 101.
- SAWYER, E. A. (1931), *J. prevent. Med. (Am.)* 5, 413.
- VAN DER SCHEER, J., R. W. G. WYCKOFF and F. H. CLARKE (1941), *J. Im-
munol. (Am.)* 40, 39.
- SCHUNEMANN, K. (1931), *Arch. Hyg. (Al.)* 105, 287.
- SCHICK, B. (1911), *Verh. Ges. f. Kinderheilk., Wiesbaden* 27, 212.
- (1913), *Münch. med. Wschr.*, 60, 2608.
- SCHIFF, F. (1927), *Klin. Wschr.*, pág. 303.
- (1934), *Z. Immunschg.* 82, 46, 302.
- (1937), *J. Immunol. (Am.)* 33, 305.
- SCHIFF, F. und L. ADELBERGER (1924), *Zbl. f. Bakt., I. Orig.* 93, 172.
- SCHIFF, F. und W. HALBERSTÄDTER (1926), *Z. Immunschg. (Al.)* 48, 414.
- SCHIFF, F. und L. G. HÜBENER (1926), *Z. Immunschg. (Al.)* 45, 207.
- SCHIFF, F. und L. MENDLOWICZ (1926), *Z. Immunschg. (Al.)* 48, 1.
- SCHITTENHELM, A. (1925), *Die Serumkrankheit und Serumaphylaxie. Handb.
inn. Med. Bergmann-Stähelin, 2. Aufl.* 1, págs. 1-30.
- SCHMIDT, H. (1940), *Grundlagen der spezifischen Therapie und Prophylaxe
bakterieller Infektionskrankheiten. Berlin.*
- SCHMIDT-SCHLEICHER, I. (1940), *Z. Immunschg. (Al.)* 97, 14.
- SCHÖNHEIMER, R., S. RATNER, D. RITTENBERG and M. HEIDELBERGER (1942 a),
J. biol. Chem. (Am.) 144, 541.
- — — (1942 b), *J. biol. Chem. (Am.)* 144, 545.
- SCHOENING, H. W. (1922), *J. Amer. veter. med. Ass.* 14, 286.

- SCHUCKMANN, W. (1920), Berl. Klin. Wschr. 57, 545.
 SCHULZ, FR. (1942), Klin. Wschr., pág. 265.
 SCHÜRER, J. (1929), Z. f. exp. Med. (Al.) 10, 225.
 SCHWARZMAN (1928), Z. f. Geburtsh. u. Gyn. 92, 505.
 SCHWARZMANN, L. (1927), Z. Immunföschg. (Al.) 51, 139.
 SCHWARTZ, A. B. and F. R. JANNEY (1938), J. Amer. med. Ass. 110, 1743.
 SHATTOCK, S. G. (1900), J. Path. a. Bact. (Brit.) 6, 303.
 SHERMAN, H. W. (1919), J. inf. diseases. (Am.) 25, 256.
 SHERMAN, W. B., S. F. HAMTON and R. A. COOKE (1940), J. exp. Med. (Am.) 72, 611.
 SIEGL, J. (1929), Arch. Kinderheilk. 88, 154.
 SIGURTONSSON, J. (1940), Z. Hyg. (Al.) 122, 189.
 SIMON, F. A. (1941), J. Allergy (Am.) 12, 610.
 — (1942), J. exp. Med. (Am.) 75, 315.
 SINCLAIR, M. W. and J. W. THOMAS (1939), J. Allergy (Am.) 10, 228.
 SLACK, F. H., B. L. ARMS, E. M. WADE and W. S. BLANCHARD (1910), I Amer. med. Ass. 54, 951.
 SMITH, C. H. (1928), Amer. J. diseases. Child. 36, 54.
 SMITS, E. (1926), Tijdschr. Geneesk. Ned.-Ind. (Hol.) 66, 634.
 SNYDER, L. H. (1926), Amer. J. Phys. Anthropol. 9, 233.
 — (1930), Human. Biology (Am.) 2, 218.
 SOHIER, R. (1942), Presse medic. (Franc.), pág. 706.
 SOHIER, R., CH. JAULMES et M. TISSIER (1945); Ann. Inst. Past. Paris 71, 463.
 SOHIER, R., P. LÉPINE et V. SAUTTER (1940), Ann. Inst. Past. Paris 65, 50.
 SOHIER, R. et M. TISSIER (1946), Rev. d'Immunol. (Franc.) 10, 211.
 SONNEBORN, T. M. (1932), Biol. Bull. 43, 187.
 SOPER, F. L. and A. DE ANDRADE (1933), Amer. J. Hyg. 18, 588.
 SORDELLI, A. (1921), Rev. de la Ass. Med. Argent. 34, 199.
 SPÄT, W. (1910), Zbl. f. Bakt., I. Orig. 54, 361.
 STANDENATH, F. (1923/24), Z. Immunföschg. (Al.) 38, 19.
 STANNUS, H. S. and G. M. FINDLAY (1939), Lancet II, 595.
 STATS, D. and J. M. G. BULLOWA (1943), Arch. int. Med. (Am.)
 STATS, D., E. PERLMAN, J. M. G. BULLOWA and R. GOODKIND (1943), Proc. Soc. exp. Biol. a Med. 53, 188.
 STATS, D. and L. R. WASSERMAN (1943), Medicine (Am.) 22, 363.
 STEINMAURER, H. und E. SCHMID (1938), Z. Immunföschg. (Al.) 92, 445.
 STIMPERT, F. D. and J. F. KESSEL (1939), Amer. J. Hyg. 29, 57.
 STOKES, J., E. P. MARIS and S. S. GELLIS (1944), J. clin. Investig. (Am.) 23, 531.
 STOKES, J. and NEEFE (1945), J. Amer. med. Ass. 127, 144.
 STONE, J. D. (1947), Austral. J. exp. Biol. 25, 137.
 STRAUS, R. (1936), Amer. J. Clin. Path. 6, 546.
 STRENG, O. (1909), Z. Hyg. (Al.) 62, 281.
 — (1909), Z. Immunföschg. (Al.) 2, 415.
 — (1929), Konglutinine. Handb. d. path. Mikroorg., 3. Aufl. 2, 1117.
 STUART, A. C. (1935), Proc. Soc. exp. Biol. a Med. (Am.) 32, 861.
 STUART, A. C., BURGESS, LAWSON and WELLMAN (1935), Arch. int. Med. (Am.) 54, 199.

- STUART, A. C., FULTON, R. P. ASH and K. K. GREGORY (1936), *J. inf. diseases. (Am.)* 59, 65.
- STUART, A. C., GRIFFIN, FULTON and E. G. E. ANDERSON (1936), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 34, 209.
- STUART, A. C., GRIFFIN, WHEELER and SH. BATTEY (1936), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 34, 212.
- STUART, A. C., SAWIN, WHEELER and BATTEY (1936), *J. Immunol. (Am.)* 31, 25.
- STUART, A. C., H. WELCH, J. CUNNINGHAM and A. M. BURGESS (1936), *Arch. int. Med. (Am.)* 58, 512.
- STUCKI, W. (1933), *Dissert. Bern (no impreso)*.
- SUNAMI, SH. (1930), *Tohoku J. exp. Med.* 16, 277.
- SZYMANOWSKY, Z., ST. STETKIEWICZ et B. WACHLER (1926), *C. r. Soc. Biol. Paris* 94, 204.
- TAKENOUCHI, M. (1918 a), *J. inf. diseases. (Am.)* 23, 415.
- (1918 b), *J. inf. diseases. (Am.)* 23, 393.
- (1918 c), *J. inf. diseases. (Am.)* 23, 398.
- TALIAFERRO, W. H. (1924), *J. exp. Med. (Am.)* 39, 171.
- (1932), *Amer. J. Hyg.* 16, 32.
- (1941), *Physiol. Reviews (Am.)* 20, 469.
- (1948), *Bact. Reviews (Am.)* 12, 1.
- TANIGUCHI, T. (1921), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 24, 217.
- TANZER, CH. (1941), *J. Immunol. (Am.)* 42, 291.
- TENBROECK, C. and J. H. BAUER (1922), *J. exp. Med. (Am.)* 36, 261.
- — (1923), *J. exp. Med. (Am.)* 37, 479.
- — (1923/24), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 21, 267.
- — (1926), *J. exp. Med. (Am.)* 43, 361.
- THOMSEN, O. (1927 a), *Münch. med. Wschr.*, pág. 1921.
- (1927 b), *Z. Immunschg. (Al.)* 52, 85.
- (1928), *Z. Immunschg. (Al.)* 57, 301.
- (1929), *Die mediz. Welt*, Nr. 566.
- (1930), *Hereditas* 13, 121.
- (1931), *Z. Immunschg. (Al.)* 70, 140.
- (1932), *Acta Soc. med. Fennic. "Duodecim"*, A 15, N.º 9.
- (1932 a), *Handb. d. Blutgruppenkunde*, München, pág. 48.
- (1932 b), *Z. f. Rassenphys. (Al.)* 5, 122.
- THOMSEN, O., FRIEDENREICH und WORSAAE (1930 a), *Klin. Wschr.* 9, 67.
- — — (1930 b), *Acta Path. e Microb. scand.* 7, 157.
- THOMSEN, O. und T. KEMP (1930), *Z. Immunschg. (Al.)* 67, 251.
- THOMSEN, O. und K. KETTEL (1929), *Z. Immunschg. (Al.)* 63, 67.
- THOMSEN, O. und A. THISTED (1928), *Z. Immunschg.* 59, 479, 491.
- THOMSEN, O. und E. WORSAAE (1929), *Z. f. Rassenphys. (Al.)* 2, 19.
- THOMSON, F. H., E. MANN und H. MARRINER (1928/29), *Metropol. Ass. Bd. Ann. Rep.*, pág. 304.
- TIMMERMAN, W. A. (1930), *Brit. J. exp. Path.* 11, 447.
- TODD, C. and R. G. WHITE (1910), *J. Hyg. (Brit.)* 10, 185.
- — (1910), *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B* 82, 416.

- TOLEDO, S. und VEILLON (1891), Zbl. f. Bakt. 9, 18.
 TOMCSIK, J. und H. SCHWARZWEISS (1947), Schweiz. Z. Path. und Bakt. 10, 407.
 TOPLEY, W. W. C. and G. S. WILSON (1946), Principles of Bacteriology and Immunity. 3. Ed., rev. by Wilson and A. A. Miles, London.
 TOYAMA, I. (1919), J. biol. Chem. (Am.) 38, 161.
 TREFFERS, H. P., D. H. MOOPE and M. HEILDERBERGER (1942), J. exp. Med. (Am.) 75, 135.
 TREVORROW, V., M. KASER, J. P. PATTERSON and R. M. HILL (1942), J. Lab. a. Clin. Med. (Am.) 27, 471.
 TROU-HIA-HSÜ (1922), Z. Immunföschg. (D.) 34, 507.
 TSEN, E. T. H. and H. T. CHANG (1928), China med. J. 42, 646.
 TULLOCH, W. J. (1919/20), J. Hyg. (Brit.) 18, 103.

 UNDERWOOD, E. A. (1935), Lancet 228, 364.

 VALCARENCHI, E. et R. RICHOU (1933), C. r. Soc. Biol. 114, 597.
 VOLK, V. K. and W. E. BUNNEY (1942), Amer. J. Public Health 32, 700.
 VORONOFF, S. et G. ALEXANDRESCU (1930), 1 Congr. intern. Microbiol. Paris 2, 198.
 VOSS, E. A. (1937/38), Z. f. Kinderheilk. 59, 612.
 VOSS, E. A. und E. HUNDT (1938), Z. Immunföschg. 94, 280.

 WALTHER, G. (1929), Folia haematol. (Al.) 38, 281.
 WASSERMANN, A. (1895), Z. Hyg. (Al.) 19, 235.
 WEIL, A. J. (1926), Z. Immunföschg. (Al.) 47, 316.
 WEIL-EMILE et P. ISCH-WALL (1923), C. r. Soc. Biol. Paris 88, 173.
 WEINBERG, FR. (1921), Münch. med. Wöchr., päg. 422.
 WEINERT, H. (1938), Z. Rassenphys. (Al.) 10, 7.
 WELLISCH, S. (1938), Z. Rassenphys. (Al.) 10, 27.
 WELLS, J. R. and P. HEINBECKER (1931), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 28, 887.
 — (1932), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 29, 1028.
 WERNICKE, E. und H. SMIDT (1928), Immunföät, Serumtherapie und Schutzimpfung bei Diphtherie. Handb. path. Mikroorg., 3, Aufl. 5, 525—606.
 WHEELER, K. M. (1938), J. Immunol. (Am.) 34, 409.
 WHEELER, K. M., P. B. SAWIN and C. A. STUART (1939), J. Immunol. (Am.) 37, 159.
 WHIPPLE, G. H. (1938), Amer. J. med. Scienc. 196, 209.
 — (1942), Amer. J. med. Scienc. 203, 477.
 WHITE, A. and T. F. DOUGHERTY (1944 a), Abstracts of Proc. Meetings Amer. Chem. Soc., September.
 — (1944 b), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 56, 26.
 WIDAL et ROSTAINE (1905), C. r. Soc. Biol. Paris 57, 321, 372.
 WIENER, A. S. (1929), J. Genetics (Am.) 29, 1.
 — (1942), Amer. J. Clin. Path. 12, 302.
 — (1942 a), Amer. J. Clin. Path. 12, 189.
 — (1944), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 56, 173.

- WIENER, A. S. (1944 a), *Science (Am.)* 100, 595.
— (1945), *Blood groups and Transfusion*. 3. Edition, Springfield.
— (1945 a), *Amer. J. Clin. Path.* 15, 106.
— (1945 b), *J. Lab. a. Clin. Med. (Am.)* 30, 662.
— (1945 c), *Science (Am.)* 102, 177.
— (1946), *Amer. J. Clin. Path.* 16, 477.
WIENER, A. S. and R. B. BERLIN, cit. por WIENER, HURST y SONN (v. éstos).
WIENER, A. S., P. B. CANDELA and L. J. GOSS (1942), *J. Immunol. (Am.)* 45, 229.
WIENER, A. S. and FORER (1941), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 47, 215.
WIENER, A. S., J. G. HURST and E. B. SONN-GORDON (1947), *J. exp. Med. (Am.)* 86, 267.
WIENER, A. S. and I. KOSOFSKY (1941), *J. Immunol. (Am.)* 41, 413.
WIENER, A. S., B. H. OREMLAND, M. A. HYMAN and A. S. SAMWICK (1941), *Am. J. clin. Path.* 11, 102.
WIENER, A. S. and PETERS (1940), *Ann. intern. Med. (Am.)* 13, 2306.
WIENER, A. S. and I. J. SILVERMAN (1940), *J. exp. Med. (Am.)* 71, 21.
WIENER, A. S. and E. B. SONN (1946), *J. Lab. and Clin. Med. (Am.)* 31, 1020.
WIENER, A. S., E. B. SONN and J. G. HURST (1946), *Pathogen. of erythroblastosis fetales*, III. WIENER Laboratories, Brooklyn.
WIENER, A. S. and I. B. WEXLER (1946), *J. Lab. and Clin. Med. (Am.)* 31, 1016.
WIENER, A. S., I. B. WEXLER and T. GRUNDFAST (1947), *Bull. Nueva York Acad. Med.* 23, 207.
WIGODTSCHIKOW, G., W. GEKKER y R. SCHUFER (1936), *Z. Mikrobiol. (Russ.)* 16,35; revisión alemana. *Ref. Zbl. Hyg.* 37, 222 (1936).
WILTSHIRE, H. (1912/13), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 17, 282.
WISING, P. J. (1939), *Acta med. Scand.* 98, 328.
WITEBSKY, E. and N. C. KLENDSHOJ (1941), *J. exp. Med. (Am.)* 73, 665.
WITEBSKY, E., N. C. KLENDSHOJ and McNEIL (1944), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 55, 167.
WITEBSKY, E. und OKABE (1927), *Klin. Wsch.*, pág. 1095.
WOLF, FR. (1937), *Dtsch. med. Wsch.*, pág. 94.
WOLFF, E. und B. JONSSON (1933), *Dtsch. Z. f. d. ges. gerichtl. Med.* 22, 84.
WOLLMAN, E. et M. BARDACH (1935), *C. r. Soc. Biol. Paris* 118, 1425.
WUHRMANN, F. (1947), *Zur Entstehung und Bildung der Bluteiweisskörper.* en WUHRMANN und WUNDERLY, págs. 312-335.
WUHRMANN, F. und CH. WUNDERLY (1945), *Schweiz. med. Wschr.*, pág. 234.
— (1946), *Schweiz. med. Wschr.*, pág. 251.
— (1944), *Gastroent. (Al.)* 69, 121.
— (1947), *Die Bluteiweisskörper des Menschen*, Basel.

YOKOI, K. (1932), *Japan. J. exp. Med.* 10, 291.
YORKE, W. and J. W. S. MACFIE (1921), *Brit. J. exp. Path.* 2, 115.
YOSIDA, KAN-ITI (1928), *ges. exp. Med. (Al.)* 63, 331.
YOUNG, C. C., W. E. BUNNEY, M. CROOKS, G. D. CUMMINGS and F. C. FORSBECK (1934), *Amer. J. Public Health* 24, 835.

- YOUNG, L. E. and E. WITEBSKY (1945), *J. Immunol. (Am.)* 51, 111.
YU, I. (1928), *Zbl. f. Bakt., I. Orig.* 106, 388.
- ZINGHER, A. (1923), *Amer. J. diseases. Child.* 25, 392.
ZIRONI, A. (1941), *Z. Immunschg. (Al.)* 99, 309.
ZISCHINSKY, H. (1934), *Jahrb. f. Kinderheilk. (Al.)* 142, 43.
ZLATOGOROFF, S. I. et S. A. KOSTEREFF (1931), *C. r. Soc. Biol. Paris* 106, 96.
ZOELCII, P. (1933), *Z. f. Kinderheilk.* 55, 518.
— (1934), *Z. f. Kinderheilk.* 56, 358.
ZUCKER, K. (1905), *Wien. Klin. Wschr.*, Nr. 44.
ZURUKZOGLU, S. und O. MUNDEL (1935), *Schweiz. med. Wschr.* 65, 559.

INDICE ALFABETICO DE MATERIAS

A (Sustancia), 91.

- variantes, 92.
- — A₁, A₂, A₃, A₄, A₆, 93.
- origen, a partir de O, 94.
- — a partir de H, 100.

Ablastina, 28.

- comportamiento con el antígeno, 28.
- existencia en la seroglobulina, 28.
- modo de actuar, 29.

Abrina, 44, 208.

Acción a distancia, 7.

- fermentos, 7.

Aglutinación en frío, 107, 215.

- aglutinación T y, 220.
- amplitud termal, 224.
- — relación con el título del suero, 223.
- existencia, normal, 224.
- — patológica, 22, 226 y s.
- panaglutinación y, 220.
- pseudoaglutinación, 219.

Aglutininas purificadas, 38.

- termolabilidad, 38.
- — en el suero normal, 32.
- — en el suero inmune, 33 y s.

Albúmina (ensayo de), 238.

Alcohol etílico, como antígeno, 9.

- habituación a, 17.
- — inmunoterapia, 17.

Anafilaxia, activa, 78.

- — persistencia del anticuerpo, 79.
- pasiva, 79, 143.
- pasiva inversa, 142.

Anamnesis (reacción de), 67.

- demostración experimental, 67, 68.

Anticuerpos, I, 243.

- diferencias con las globulinas inmunes, 72.
- especificidad, 41.
- incompletos, 40, 234, 242.
- naturales, véase estos.
- obtención *in vitro*, 2.
- velocidad de reacción, 6 y s.

Anticuerpos imperfectos, bloqueo por, 35, 234, 241.

Anticuerpos naturales, I, 31 y ss.

- circunstancias de la absorción, 41 y s.
- aparición en la sangre, 50.
- avidéz, 39.
- clasificación, 81.
- definición, 31.
- especificidad, 41, 44.
- índole química, 32.
- número en el mismo suero, 42, 43.
- origen, 58 y s.
- — inmunizatorio, I, 31.
- — espontáneo, I, 31.
- persistencia en la sangre, 78.
- termolabilidad, 33 y s.

Antígenos de bajo peso molecular, 8.

- inmunización con, 9.
- — fase negativa, 14.

- Antígenos de bajo peso molecular, anticuerpos contra, 8 y ss.**
 — — aislamiento a partir del antisuero, 10.
 — — especificidad, 13 y s.
 — — mecanismo de la formación, 12 y s.
 — — persistencia, 10.
 — — reacciones con el antígeno, 13 y s.
 — — tóxicos, 10.
 — — neutralización por antisuero, 15 y s.
- Antitoxinas en el suero normal, 170.**
 — coexistencia de varias, 207.
 — antitoxina diftérica, véase ésta.
 — antitoxina estafilocócica, véase ésta.
 — antitoxina tetánica, véase ésta.
- Autohemolisis, 209.**
 — obtención experimental, 212.
- Bacterianos (anticuerpos) normales, 157 y ss.**
 — aglutininas, 157, 159.
 — — título, 158.
 — — especie animal y, 158.
 — — especie bacteriana y, 158.
 — aglutininas H y O, 160.
 — aumento con la edad, 161.
 — bactericidas, 164.
 — — contra gérmenes no infecciosos, 158 y s.
 — origen, 158, 163.
- Bloqueo (ensayo de), 235.**
- Bovinos, individualidad serológica, 134.**
- Castellani (regla de), 42.**
 — anticuerpos naturales y, 43.
- Centros germinales, tejido linfoideo, 69.**
- Clostridium welchii, 207.**
 — antitoxinas naturales y, 207.
- Conglutinina, 230.**
 — en el plasma humano, 235, 237.
- Conglutinina en el plasma humano, diagnóstico de anticuerpos no floculantes, 238.**
 — — identidad con la proteína, 239.
 — en el suero de bovino, 231.
 — — aglutinados, 233.
 — — aplicación al diagnóstico, 233.
 — — complemento como factor de la reacción, 232, 233.
 — — hemaglutinación, 230.
 — — hemólisis, 230.
- Contraantígenos, 8.**
- Crotina, antitoxina normal, 209.**
- Diftérica (antitoxina) en el suero normal 170.**
 — de bovinos, de ovejas, 176.
 — de caballos, 170.
 — de hombres, 176.
 — — formación, 183 y s.
 — — herencia, 191.
 — — persistencia, 182 y s.
 — — presencia en las poblaciones libres de difteria, 193 y s.
 — — protección contra la infección, 186.
 — — prueba de Schick, 180.
 — — distribución con la edad, 185.
 — — título, 185 y s.
 — monos, 173.
- Disentérica (antitoxina), 40.**
 — velocidad de reacción, 40.
 — — aumento durante la inmunización, 40.
- Distonía, 29.**
 — por ablastina, 29.
 — por anticuerpos, 29.
 — por bacterias, 29.
- Enterococos EI, 159.**
 — inmunización enteral por, 159.
 — parentesco con el *Shigella dys.*, 159.
- Espermatocida (sustancia), 209.**
 — de huevos de estrellas de mar, 209.
 — neutralización por suero de conejo, 209.
- Estafilocócica (antitoxina) normal, 207.**

Fasina, 44.

- Fitaglutinina, 44, 123.
- hemaglutinación, 44.
- — especificidad, 44.

Globulinas (ensayo de), 238, 242.

- γ-Globulinas como anticuerpos naturales, 32.
- ausencia en el recién nacido, 50.
- contenido en concentrados de suero humano, 79, 164.
- — contenido de anticuerpos en, 79, 164.
- en linfocitos, 66.
- suministradas por el calostro, 53.

Grupos sanguíneos, del hombre, 82.

- sistema ABO, 82.
- sistema MN, 109.
- sistema PQ, 111.
- errores en la determinación, 118.
- imperfectos (defectivos), 105.
- — del hombre, 105.
- — de los animales, 105.

Hematíes de carnero (aglutininas para los), 135.

- adsorción a órganos, 136.
- en suero de conejo normal, 135.
- — alimentación con plantas que contienen antígeno de Forssman, 136.
- — inmunización con bacterias, 136.
- en suero humano normal, 135.
- — como anticuerpo de Forssman, 136.
- título normal, 135.
- — aumento con edad, 136.
- — exaltación en alergias, 145 y s.
- — — por sueros extraños, 137.
- — — en mononucleosis, 137 y ss.
- — — en la enfermedad del suero, 137.
- — — falta de especificidad, 140.

Hemoglobinuria por frío, 209.

- paroxismal, 209.
- — amboceptor autolítico, 211.
- — — reagina sifilítica y, 212.

Hemoglobinuria por frío, paroxismal,

- etiología sifilítica, 213, 228.
- por hemaglutininas en frío, 227.

Heterohemaglutininas normales, 135.

- del hombre, 135.
- de los animales, 155.
- poliespecificidad, 41.
- producción espontánea, 136.

Heterohemolisinas normales, 135.

Hiperinmunización, 156.

Hormona de la corteza suprarrenal, 67.

- acción, sobre linfocitos, 67.
- — sobre anticuerpos, 67, 68.
- — sobre seroproteínas, 67.

Inmunes (globulinas), 58, 60.

- formación a partir de aminoácidos de la alimentación, 59.
- origen, 58.
- — a partir del antígeno, 59.
- — humoral, 11.
- — celular, 60.
- — — fagocitosis, 60, 62.
- — — lugar, 61 y ss.
- — — en linfocitos, 63, 68.
- — — en sistema reticuloendotelial,
- — — en ganglios linfáticos, 63, 65, 61.
- seroglobulinas normales y, 62.

Isoaglutininas (véase también Isoaglutininas de especies animales), 82.

- aparición en el suero, 55.
- autóctonas (fetales), 55.
- compatibles, 83.
- diaplacentarias (maternas), 54.
- formación, 75, 76.
- incompatibles, 83, 86.
- en líquidos orgánicos, 76.
- en órganos, 76.
- persistencia, 79.

Isoaglutininas de especies animales, 125.

- de bovino, 105, 133.
- de caballo, 133.
- de cerdo, 105; 133.

Isoaglutininas, de hombre, 82.

- — anti-A (α), 106 y s.
- — anti-A₁ (α_1), 107.
- — anti-A₂ (α_2), 107.
- — anti-B (β), 82, 85, 91.
- — anti-H, 90.
- — anti-M, 109.
- — anti-N, 109 y s., 238.
- — anti-O, 86, 90 y s.
- — anti-P, 111.
- — anti-Rh, 114, 234 y s.

Isoaglutinógenos [véase también A (Sustancia) y O (Sustancia)].

- carácter químico, 97 y s.
- — aminoácidos, 97.
- complejo antigénico con el antígeno O de Shiga, 97.
- especificidad, fundamento químico, 98 y s.
- mutaciones hipotéticas, 94, 95, 100, 102.

Leucemias, 57.

- aglutininas bacterianas en las, 57.
- isoaglutininas en las, 57.

Maduración serológica, 51.

- aparición de γ -globulinas y, 52.

Mamífero, especificidad de, 156.**Metanílico (ácido), 43.**

- azoproteína de, 43.
- antisuero contra, 43.
- — reacciones de parentesco, 43.

Mononucleosis infecciosa, 147.

- diagnóstico clínico, 147.
- serológico, 147.
- hemaglutininas para el carnero y, 150.
- antígeno, 151, 152.
- — aislamiento del, 151.
- transmisión, a hombres, 153.
- — a monos, 153.

Morfina como antígeno, 10, 15.

- habituación a, 16.
- — inmunoterapia, 17.

Neumococo XIV, 99.

- antisueros, de conejo, 99.
- — de caballo, 99.

O (sustancial), 86.

- demostración serológica, 87 y s.
- diferenciación entre O y H, 90.
- antígeno heterogenético H y, 90.
- producto de un gene O, 87, 90.
- — edad relativa, 96, 97.

Panaglutinabilidad, 25, 119, 217.

- aglutinina T, 25, 119, 220.
- aglutinógeno T, 25, 119, 220.
- inducida por bacterias, 25, 119, 220.

Penicilina, 18.**Péptidos, 5.**

- como determinantes, 5.
- — en proteínas, 2, 5.
- — en anticuerpos, 2, 5.

Poliomielitis (virus de la), 167.

- anticuerpos naturales, 168 y s.
- — en el caballo, 168.
- — en el hombre, 168.
- — en el mono, 167.

Protozoos (anticuerpos contra), normales, 162.**Rh (aglutininas), 114.**

- ausencia en el suero normal, 115.
- formación, 116.
- no aglutinantes, 234.
- — demostración, 235, 238.
- — — ensayo de albúmina, 238.
- — — ensayo de antiglobulina, 238, 242.
- — — ensayo del bloqueo, 235.
- — — ensayo según Abelson, 239.

Secundaria (combinación), inespecífica, 45.**Seudoaglutinación, 125, 219.****Shigella dysenteriae, 97.**

- antígeno O, 97.

Shigella dysenteriae, combinación con la
sustancia A, 97.
— polisacárido, 98.

Sueros inmunes, 1, 243.

— avidez, 39, 40.
— desnaturalización por el calor, 35.
— — de anticuerpos flagelares, 35.
— — de anticuerpos somáticos, 35.
— — de anticuerpos para virus, 35.
— — mecanismo, 34.
— — regulación electroforética, 36.
— formación de derivados no floculan-
tes, 33, 35, 234.

Tetánica (antitoxina), 201.
— en el suero normal, 201.
— — de bovino, 202.
— — de cobayo, 205.
— — de hombre, 203.

Tétano traumático, 201.
— antitoxina en la sangre, 201.
— infecciones latentes, 201.
— reinfecciones, 201.

Virus hemaglutinantes, 19.
— aglutinados, examen en el microscó-
pico electrónico, 19.
— especificidad de la hemaglutinación,
24.
— inhibidores, 20, 23, 24.
— receptores en los hematíes, 20.
— — inactivación, 25.
— — — filtrados del cólera, 23.
— — — peryodatos, 21.
— — — sueros normales, 20.
— — — tripsina, 21.
— — propiedades, 21.

PdO
535

Precio: 60 pesetas.