

BIBLIOTECA IBYS DE CIENCIA BIOLÓGICA

*

R. DOERR

Las investigaciones sobre inmunidad

TOMO PRIMERO

LOS ANTICUERPOS

PRIMERA PARTE



Revista de Occidente
MADRID

BIBLIOTECA IBYS



DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD

LAS INVESTIGACIONES SOBRE INMUNIDAD
(TOMO PRIMERO)

LOS ANTICUERPOS
(PRIMERA PARTE)

LAS INVESTIGACIONES SOBRE INMUNIDAD

RESULTADOS Y PROBLEMAS
RECOGIDOS EN MONOGRAFIAS

DIRIGIDAS POR EL
PROFESOR R. DOERR
Basilea.

TOMO PRIMERO

LOS ANTICUERPOS

PRIMERA PARTE

LOS ANTICUERPOS

PRIMERA PARTE

Definición.—Origen celular.—Intentos para obtener *in vitro* sustancias que actúen como anticuerpos.—Formación de anticuerpos como reacción de determinadas células al estímulo del antígeno.—El anticuerpo como proteína del suero.—El anticuerpo considerado en relación con el antígeno.—Reacciones antígeno-anticuerpo *in vitro*.

P O R

R . D O E R R

Basilea.

Traducción de la edición original alemana por

F . C O R D Ó N

Jefe del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Ibya.

Revista de Occidente

Bárbara de Braganza, 12

Madrid

LOS ANTICUERPOS

REVISTA DE

Copyright by
I. B. Y. S., S. A.
Madrid • 1952

Imp. Viuda de Galo Sáez. Mesón de Paños, 6. Teléfono 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.

with the same...

to the...

the...

...



P R O L O G O

Este volumen sobre "Anticuerpos" (primera parte) inicia una serie de monografías, independientes en sí mismas, cuyo conjunto abarcará todo el campo de la inmunidad, incluso el estudio de las relaciones entre ésta y los fenómenos observados en las infecciones y en las otras formas de influencia mutua entre parásito y huésped.

La distribución en monografías, que, aunque subordinadas a una idea general, posean independencia mutua, nos parece el camino acertado para evitar los graves inconvenientes de un manual. El enorme contenido de la ciencia inmunológica ha obligado a múltiples especializaciones; al concentrar la exposición alrededor de temas hasta cierto punto cerrados, se tiene en cuenta la diversidad de los campos de estudio con el fin de ofrecer a cada lector lo pertinente a su orientación teórica y práctica sin perturbarlo con llamadas a las otras monografías de la serie y sin gravarlo con un sacrificio económico, como supone la adquisición de un manual en varios volúmenes, que, en general, sólo se emplea como obra de consulta.

La forma elegida permite, además, la reedición de un volumen aislado de la obra cuando lo requiera el progreso de la investigación en su campo.

En este medio volumen puede apreciarse que en la serie de monografías no se pretenderá agotar las citas bibliográficas. La superproducción de literatura que se padece en la investigación inmunológica, como casi en ninguna otra rama de la ciencia, obliga a soltar el lastre de producciones secundarias o de valor ya enteramente perdido. En cambio se hacen valer los derechos espirituales de la propiedad intelectual de investigadores antiguos a los que se deban ideas importantes y fecundas. No va con nosotros el superponer continuamente sobre las adquisiciones originales nuevas publicaciones de igual contenido. Asimismo, al exponer las adquisiciones recientes respetamos la prioridad, sin tener en cuenta, naturalmente, la nacionalidad

del autor, y procuramos ante todo estimular el pensamiento del lector por el análisis crítico de los resultados experimentales y por consideraciones sugeridas por la teoría del conocimiento. La fidelidad a estas líneas generales mantendrá la homogeneidad de la serie.

En los índices bibliográficos no se recoge el título de los trabajos para no aumentar excesivamente el tamaño de los volúmenes y evitar la consiguiente elevación de su precio.

Basilea y Viena, otoño de 1946.

R. DOERR.

Como director de la Redacción.

O. LANGE / SPRINGER-VERLAG.

Como editor.

I N D I C E

	PÁGS.
CAPÍTULO PRIMERO.—Definición	1
CAPÍTULO II.—El origen celular de los anticuerpos.....	4
CAPÍTULO III.—Intentos de conseguir <i>in vitro</i> sustancias que actúen como anticuerpos	10
a) Los experimentos de L. PAULING y D. H. CAMPBELL.....	10
β) Los contra-antígenos de J. LOISELEUR.....	11
γ) Antitoxina diftérica y hemaglutinina.....	13
δ) Resumen	16
CAPÍTULO IV.—La formación de anticuerpos considerada como una reacción de determinadas células frente al estímulo del antígeno.....	18
CAPÍTULO V.—Los anticuerpos como proteínas del suero.....	20
I. Introducción	20
II. Comportamiento de los anticuerpos en el fraccionamiento de las proteínas de los antisueros.....	23
III. Motivos del interés especial que ofrecen las globulinas inmunes.	23
IV. Fraccionamiento por electroforesis de las proteínas totales del suero sanguíneo normal (A. TISELIUS).....	24
V. Resultados de los nuevos métodos de fraccionamiento del plasma sanguíneo de hombres adultos y normales (E. J. COHN)...	28
VI. El fraccionamiento por electroforesis de las proteínas totales de sueros inmunes con anticuerpos, según TISELIUS.....	30
VII. Examen electroforético de las alteraciones que experimentan las globulinas inmunes por diferentes agentes.....	34
VIII. El peso molecular de las globulinas inmunes.....	38
IX. Modificaciones en las cantidades de las proteínas del suero en la inmunización con antígenos muertos.....	40
X. Relaciones, deducidas del análisis electroforético, entre los sue-	

	PÁGS.
ros inmunes que contienen anticuerpo y algunos sueros patológicos de otra etiología.....	43
XI. Objeciones contra la hipótesis de que los anticuerpos son seroglobulinas modificadas	49
a) Los anticuerpos fijos (ligados a los tejidos).....	50
b) El fenómeno de la anafilaxia "hereditaria".....	51
c) La persistencia de los anticuerpos.....	52
d) Alteraciones de los anticuerpos en el transcurso de la inmunización	55
e) Los sueros inmunes "desespeciados"	57
f) El fenómeno de la extinción.....	57
XII. Un anticuerpo cristalizado.....	58
XIII. La tentativa de F. R. SABIN de observar ópticamente el proceso de la formación de las globulinas inmunes.....	60
XIV. Investigación en el metabolismo proteico de las seroglobulinas normales e inmunes con ayuda de aminoácidos isótopos	63
Vida de las moléculas de anticuerpo.....	67
Comportamiento de los anticuerpos adicionados por vía pasiva, frente a la alimentación de aminoácidos marcados con isótopos	68
XV. Diferencias entre globulinas inmunes y globulinas normales (crítica del estado actual del problema).....	70
XVI. Relaciones genéticas entre antígeno y anticuerpo.....	73
La hipótesis de L. PAULING.....	80
Comportamiento de las proteínas extendidas en películas en cuanto a sus funciones como antígeno y anticuerpo....	84
XVII. Tentativas para profundizar en la naturaleza de los anticuerpos por el ataque químico a los antisueros que los contienen	90
XVIII. Resumen de las investigaciones sobre la esencia de los anticuerpos	97
CAPÍTULO VI.—El anticuerpo considerado desde el punto de vista del antígeno	99
A. La especificidad de especie.....	100
I. Diferenciación de los antígenos procedentes de especies próximamente emparentadas	102
II. Especificidad natural de un orden más alto.....	107
III. Especificidades particulares dentro del cuadro de la especificidad de especie	110
IV. Horror autotoxicus. Anticuerpos contra antígenos de la misma especie	115
V. Los fundamentos de la especificidad inmunológica de las proteínas naturales	121
B. La especificidad química inducida artificialmente.....	133

Fundamentos experimentales	133
I. Métodos de sustitución (Fr. OBERMAVER y E. P. PICK).....	133
II. La copulación de combinaciones de composición química conocida con antígenos proteicos. Las azoproteínas (K. LANDSTEINER)	134
Crítica de los métodos llamados de sustitución.....	137
Ventajas del método de copulación.....	141
La función del componente proteico en la azoproteína.....	142
III. La inmunización de combinación.....	145
Los anticuerpos de antígenos artificiales obtenidos por copulación....	151
Influencia del componente químicamente conocido de los antígenos copulados sobre la especificidad de los anticuerpos.....	158
I. Determinantes múltiples	158
II. Concurrencia mutua de determinantes.....	159
III. La especificidad de los productos de disustitución del benceno isómeros	162
IV. La especificidad de los compuestos estereoisómeros.....	165
V. Combinaciones isósteras	167
VI. Longitud de la cadena lateral alifática del anillo bencénico....	168
VII. Las azoproteínas obtenidas a partir de péptidos.....	168
VIII. La especificidad del anticuerpo como función del proceso de inmunización	170
IX. Resumen de los resultados obtenidos con azoproteínas.....	172
Los anticuerpos en las reacciones de "parentesco"	177
Crítica de las reacciones serológicas entre antígeno y anticuerpo en cuanto fuente del conocimiento de las propiedades del anticuerpo...	184
 CAPÍTULO VII.—Las reacciones antígeno-anticuerpo <i>in vitro</i>	190
A. Métodos particulares para obtener los precipitados inmunes.....	190
I. Efecto de la modificación cuantitativa de ambos componentes en los ensayos con precipitinas.....	191
II. Diferencias cuantitativas entre la precipitación inmune y otra reacción serológica de floculación, la aglutinación.....	191
III. Aglutininas y precipitinas de las bacterias.....	192
IV. Estudio experimental de la influencia que sobre las relaciones cuantitativas entre antígeno y anticuerpo ejerce la modificación del tamaño de la partícula del antígeno.....	193
V. La teoría de M. H. MERRILL.....	194
VI. Análisis cuantitativo de los productos de la floculación.....	198
VII. Masa del precipitado y óptimo de floculación.....	200
VIII. Composición de los precipitados en anticuerpo y antígeno..	200
IX. La combinación del antígeno y de la proteína inmune examinada mediante el microscopio electrónico.....	212
X. Determinación del espesor de las películas de anticuerpo fijadas de modo específico a capas monomoleculares de antígeno.	215

	<u>PÁGS.</u>
XI. Proporción entre los elementos antigénicos y las moléculas de las globulinas inmunes.....	216
B. Monovalencia o polivalencia de los anticuerpos.....	220
La teoría del retículo.....	223
El crecimiento del complejo antígeno-anticuerpo.....	225
Investigaciones ópticas de los productos de las reacciones de antígeno y anticuerpo	228
C. Pluralidad o singularidad de los anticuerpos.....	230
D. El descubrimiento de G. K. HIRST.....	250
BIBLIOGRAFÍA	259
INDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS.....	283

CAPÍTULO PRIMERO

DEFINICION

El concepto de antígeno nació del descubrimiento de las relaciones entre los antígenos y los anticuerpos; de modo análogo y recíprocamente, los anticuerpos se definen fenológicamente por sus relaciones genéticas y de reacción con los antígenos. W. W. C. TOPLEY y G. S. WILSON, por ejemplo, designan con el nombre de anticuerpo *todas las sustancias que aparecen en el suero sanguíneo o en los líquidos del organismo de un animal como respuesta al estímulo (1) provocado por la administración parenteral de un antígeno en los tejidos y que reaccionan con este antígeno de modo específico en cualquier forma susceptible de ser observada.*

Entre los líquidos del organismo en que se producen anticuerpos como consecuencias de la acción de un antígeno se destaca, por las múltiples ventajas que ofrece para efectuar pruebas experimentales, el suero que se separa del plasma sanguíneo. Puede obtenerse fácilmente en gran cantidad y utilizarse en cuanto se separa de la torta

(1) En el suero sanguíneo de hombres y animales se encuentran también sustancias que actúan como anticuerpos y que se caracterizan, como éstos, por la especificidad de sus reacciones, pero que no se han producido a consecuencia de la inyección de un antígeno, o al menos que se ignora el mecanismo que las originó. Reciben la designación de anticuerpos *naturales* y se contraponen a los anticuerpos *inmunes*, que son los que se desarrollan como reacción a la incorporación de un antígeno determinado y conocido. Como para estudiar los anticuerpos naturales se carece de la base que ofrece la relación genética con un antígeno, hay que investigar estas sustancias siguiendo, en parte, caminos distintos de los que se utilizan con los anticuerpos engendrados por la vía de la inmunización. Esto, así como la circunstancia de que en el campo de los anticuerpos naturales se produzcan fenómenos peculiares, obliga a dedicar a este grupo de sustancias del suero capítulo especial, sin que por ello se prejuzgue que entre ellos y los anticuerpos inmunes exista un abismo que obligue a una separación más fundamental. Todas estas cuestiones se aclararán por extenso en el fascículo dedicado a "anticuerpos naturales".

sanguínea; resulta transparente e incoloro y permite que se midan de él las cantidades que se desee por pequeñas que sean. Por ello, para provocar las reacciones de los anticuerpos con los antígenos y estudiarlas, se utiliza casi exclusivamente sueros sanguíneos que contengan anticuerpos, designados abreviadamente como *antisucros* o *sueros inmunes*. Ciertos aparatos especiales, complicados y costosos, necesarios para aislar los anticuerpos del suero inmune, sólo se utilizan en el estudio de ciertos problemas teóricos especiales. En grandes líneas, este campo científico se ha desarrollado en todas direcciones por la aplicación de un método especial, particularmente idóneo; por ello la disciplina suele designarse, con el nombre que deriva de él, como *serología* o *ciencia de las reacciones serológicas*.

La reacción de un anticuerpo con su antígeno consiste solamente en su enlace recíproco, por el cual ambos componentes de la reacción, en tanto que permanezcan enlazados, pierden la capacidad de reaccionar. La formación de este compuesto puede demostrarse de distintos modos, según sean las propiedades del antígeno.

Por ejemplo, si el antígeno es un veneno, se neutralizará su toxicidad; si es una disolución proteica, se producirá un precipitado; si se trata del componente de ciertas células (eritrocitos, bacterias), éstas se reunirán en agregados mayores (aglutinación) o, con la participación de una sustancia del suero normal (el complemento), se disolverán o dañarán de cualquier otro modo (muerte de las bacterias), etc.; según esto, las manifestaciones ostensibles de las reacciones entre antígenos y anticuerpos dependen de la naturaleza y estado del antígeno, lo que al principio no estaba claro, ya que inicialmente se hacía responsables a los anticuerpos de la índole de la reacción, y, según fuera ésta, recibían los nombres de *antitoxinas*, *precipitinas*, *aglutininas*, *hemolisinas*, *bacteriolisinas*, *anticuerpos bactericidas*, etc. (véase página 230). Esta terminología se mantiene en uso y todavía ofrece un medio de entenderse cómodo e inevitable; sin embargo, debe entenderse en el sentido de *lucus a non lucendo*, lo que hay que tener especialmente en cuenta cuando la reacción entre antígeno y anticuerpo se produzca en el organismo de un animal o del hombre (*in vivo*), provocando determinadas manifestaciones patológicas (anafilaxia, fenómenos alérgicos). En estos casos se está muy cerca de atribuir a los anticuerpos una propiedad *sensibilizadora*. Pero de hecho también los anticuerpos anafilácticos o las reaginas de los alérgicos no hacen sino combinarse con sus antígenos, y para que los procesos patológicos se produzcan son indispensables otras circunstancias (el alojamiento de los anticuerpos en las células del organismo reaccionante, la velo-

cidad de la reacción, la liberación de sustancias análogas a la histamina).

En la definición de TOPLEY y WILSON está implícita la vieja concepción, aceptada sin reservas por PAUL EHRLICH, de que los anticuerpos se producen en células, que luego los ceden a los líquidos del organismo. De ser esto cierto, los anticuerpos deben existir, antes de su liberación, en las células que los producen o conservarse en ellas; es decir, habría que distinguir entre *anticuerpos en fase libre (circulando por la sangre)* y *anticuerpos fijos en los tejidos (contenidos en la célula)* y decidir si en esta fase pueden reaccionar con un antígeno que se introduzca en la célula y de qué modo lo hacen. La respuesta a estas cuestiones se discutirá al tratar de los fenómenos anafilácticos. Desde el punto de vista lógico parece racional admitir *a priori* que los anticuerpos sólo pueden formarse en células.

CAPÍTULO II

EL ORIGEN CELULAR DE LOS ANTICUERPOS

Los argumentos que abonan el origen intracelular de los anticuerpos pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Después de una inyección única e intravenosa de un antígeno, los anticuerpos no aparecen en el plasma inmediatamente, sino que lo hacen después de transcurrido un período de latencia de varios días; en el momento de su aparición no están en su concentración máxima, que no se alcanza sino transcurridos varios días de paulatino aumento [E. v. DUNGERN]. La segunda parte de esta aseveración no se discute;

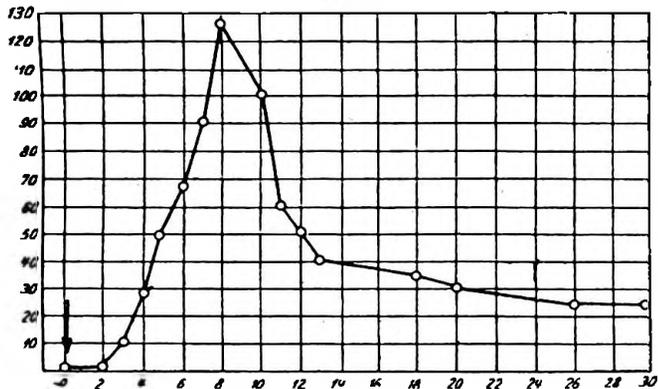


FIG. 1.ª Curva de aglutinina, según JÖRGENSEN y MADSEN. La flecha indica la inyección de vibriones del cólera.

sin embargo, se encuentran casos en los que la latencia inicial, previa a la aparición de los anticuerpos en el suero sanguíneo, desciende hasta venticuatro a cuarenta y ocho horas, e incluso hasta seis a diez horas [G. RAMÓN (1924 a, b, 1928), J. OERSKOV y E. K. ANDERSEN, EH-

RICH y T. N. NARRIS (1942)], lo que, sin embargo, no puede considerarse como una prueba decisiva contra el origen celular de los anticuerpos.

2. Cuando se inyecta el antígeno a un animal tratado previamente de modo específico, se producen los anticuerpos más rápidamente y alcanzan una concentración más elevada que como resultado de una primera inyección; las dosis de antígeno activas resultan asimismo más pequeñas que las requeridas para un animal sin tratamiento previo. Tampoco se pueden conseguir los mismos efectos inyectando de una vez una cantidad de antígeno equivalente a la suma de las dos dosis distanciadas [E. v. DUNGERN, R. I. COLE]. Esa transformación específica que sufre el organismo por una sola inyección del antígeno, y que se manifiesta por la aceleración y aumento de la formación de anticuerpos y también por la exaltación de la acción del antígeno, fué designada por R. PFEIFFER y BESSAU como *estado dinámico de inmunidad* e incluida más tarde por Cl. v. PIRQUET, como caso especial, en su esquema de las alergias.

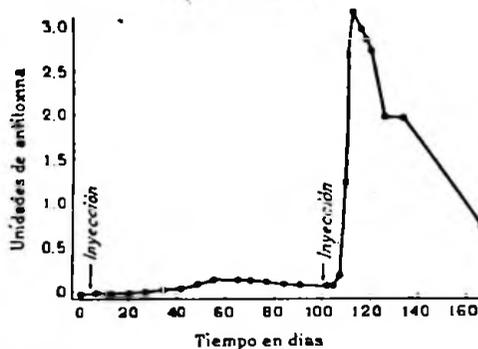


FIG. 2.ª Producción de antitoxina en el caballo; diferencia entre los efectos de la primera y de la segunda inyección (según GLENNY y SÜDMERSEN).

3. Como ya se deduce del apartado anterior, la cantidad de anticuerpo producido no corresponde a la de antígeno incorporado, sino que está condicionada también por otros factores. Incluso una primera inyección de mínimas cantidades de antígeno da lugar a una cantidad de anticuerpos para cuya saturación se requiere un múltiplo elevado de la masa de antígenos administrada; en la inmunización por reiterada administración de antígeno esta desproporción es, naturalmente, aún más palpable. Esta sorprendente disparidad se ha comprobado para diferentes antígenos, por ejemplo, para la toxina

tetánica (A. KNORR) y después, también, para bacterias muertas [E. FRIEDBERGER (1902)], para eritrocitos de otra especie (E. FRIEDBERGER y DORNER) y, finalmente, para los llamados anafictógenos, entre los cuales, por ejemplo, la dosis mínima de ovalbúmina que sensibiliza a un cobayo por vía subcutánea se reduce a 0,00005 mg. [G. H. WELLS (1908)]. Autores posteriores han corroborado esta desproporción entre las cantidades de antígeno administrado y de anticuerpo producido, utilizando, en parte, métodos cuantitativos más exactos [W. W. C. TOPLEY (1930), M. HEIDELBERGER, F. E. KENDALL y CHECK M. SOO HOO, A. M. PAPPENHEIMER (1940), S. B. HOOKER y M. C. BOYD (1931)].

La objeción de que el antígeno pudiera desdoblarse y que cada fragmento diera lugar a una molécula de anticuerpo resulta actualmente indefendible por razones cuantitativas; A. M. PAPPENHEIMER (1940) calcula que el peso del anticuerpo producido es diez mil veces más elevado que el del antígeno inyectado. Además: se conocen hoy antígenos, definidos químicamente, con un único o un corto número de "determinantes inmunológicos", de modo que por la fragmentación resultarían porciones inactivas o inespecíficas (M. MACHEBOEUF y M. FAURE).

P. JORDAN (1940) concibe la formación de anticuerpos como un proceso de dos fases; en la primera se formaría una cantidad relativamente pequeña de moléculas de anticuerpo con la participación del antígeno, y en la segunda esta cantidad de anticuerpos, surgidos en la sangre como una neoformación, actuaría, a su vez, como antígeno, para la formación de nuevas cantidades de anticuerpo, dando lugar a una producción ulterior de anticuerpos idénticos. En ambas fases se trataría de un proceso catalítico; en la primera actúa como catalizador el antígeno, que origina moléculas distintas a él, mientras que en la segunda se trata de un aumento autocatalítico, es decir, de una autoproducción de las moléculas del anticuerpo que actúa como antígeno secundario. Esta hipótesis aclararía ciertamente la discrepancia entre la cantidad de antígeno administrado y la de anticuerpos producidos, pero, desgraciadamente, la segunda (y más importante) parte del proceso postulado, carece de apoyo experimental, ya que no puede demostrarse que la incorporación de un anticuerpo a un animal normal dé lugar a la formación de más anticuerpos del mismo tipo.

4. Si el anticuerpo fuera un producto que resultara de la transformación del antígeno por un proceso humoral, no cabe duda que por sangrías profundas sería posible reducir permanentemente su concentración en la sangre e incluso en ocasiones hacerlos desaparecer. Sin embargo, este hecho no se produce, ya que la reducción de la cantidad de anticuerpos conseguida por este mecanismo es, en general, transitoria y suele ir seguida de una nueva elevación hasta alcanzar el nivel anterior e incluso hasta sobrepasarlo [E. ROUX y VAILLARD, C. J. SALOMONSEN y Th. MADSEN, G. DREYER y SCHRÖ-

DER]. Sin embargo, como hacen notar SALOMONSEN y MADSEN, este efecto de la sangría no se produce siempre.

Aun no se ha explicado satisfactoriamente por qué la sangría actúa del modo indicado. W. W. C. TOPLEY y G. S. WILSON señalan, con razón, que cuando un animal inmunizado por vía activa, en cuyos vasos circula sangre que contiene anticuerpos, se somete a una sangría profunda o muy reiterada, deben actuar en él dos factores contrapuestos. De no existir una compensación, la pérdida de sangre rebajaría el título de los anticuerpos; hay que investigar cuál es el mecanismo de esta reposición de anticuerpos. Considerando lo poco constante que resulta su efecto, E. FRIEDBERGER y DORNER expusieron la opinión de que la sangría actúa sobre las células productoras de anticuerpos como un estímulo inespecífico; con esta hipótesis concuerda la observación de que la producción de anticuerpos también puede exaltarse cuando se sangra antes de la inmunización o en el curso de ella. [FRIEDBERGER y DORNER, L. HEKTOEN y J. A. CARLSON, H. HAHN y H. LANGER, R. TROMSDORFF (1921)] Como se conocen diversos estimulantes inespecíficos de la producción de anticuerpos que exaltan tal formación o la desencadenan de nuevo si había cesado, expondremos aquí sucintamente la acción de la sangría.

H. SAHLI intentó sustituir esta solución, sin duda poco satisfactoria, por la hipótesis de que cualquier descenso de la cantidad de anticuerpos en la sangre provoca automáticamente una regeneración compensadora, e incluso hipercompensadora, con el fin de cubrir el déficit producido; es decir, la acción de la sangría habría que situarla en el mismo lugar que la "regeneración normal de los componentes de la sangre gastados o sustraídos". Sin embargo, el fundamento mismo de esta opinión es insostenible, ya que los anticuerpos no son "componentes normales de la sangre". Los anticuerpos incorporados por vía pasiva desaparecen espontáneamente del organismo y no se renuevan cuando se reduce su concentración mediante sangrías [R. DOERR (1929, b, pág. 831), M. HEIDELBERGER, H. TREFFERS, R. SCHÖNHEIMER, S. RATNER y RITTENBERG]. SAHLI desconoce manifiestamente que el fenómeno de la sangría sólo puede provocarse en animales inmunizados por vía activa; asimismo, en la época de su publicación (1920) aún no estaba establecido con seguridad, o al menos no se reconocía universalmente que los anticuerpos fueran seroglobulinas modificadas. Considerando estas dos circunstancias, TOPLEY y WILSON creen probable que la extracción de sangre actúe sobre la producción de anticuerpos, estimulándola en el mismo sentido que estimularía la producción de las proteínas normales del suero, a saber: con una reacción activa desencadenada por la pérdida sufrida. Naturalmente, no se trata más que de una opinión, pero que pudiera defenderse por investigaciones experimentales [S. C. MADDEN y colaboradores (1938, 1940)] con ayuda de la técnica denominada "plasmaferesis", desde un punto especial, a saber: investigando su efecto sobre las proteínas del plasma sanguíneo. La plasmaferesis consiste en extraer diariamente sangre a animales adecuados (perros) y compensar la pérdida de hematíes por la inyección intravenosa de la misma cantidad de ellos, pero suspendidos en disolución isotónica de cloruro sódico. Los perros simultáneamente se alimentan por una dieta pobre en proteínas. Se saca la conclusión de que en el organismo del perro debe existir una gran reserva de material apto para la formación de proteínas del plasma, porque sólo al cabo de dos y hasta seis semanas de continuar las sangrías diarias no se agota el plasma

sanguíneo. Durante este tiempo el déficit se cubre continuamente, y sólo después de agotadas las reservas, si se suprimen por completo las proteínas de la dieta, se atacan las proteínas del cuerpo, ya que el animal no puede producir, a expensas de los albuminoides de su organismo, sino cantidades mínimas de proteínas del plasma. Así se demuestra que las proteínas sustraídas al plasma se sustituyen por una reserva siempre disponible, y puede aceptarse que lo mismo sucede con los anticuerpos en animales inmunizados por vía activa de modo persistente, ya que los anticuerpos pueden considerarse como globulinas inmunes (véase página 23).

En la misma categoría que la regeneración de los anticuerpos perdidos por sangría hay que colocar el hecho de que cobayos hembras, a los que se inyecta por vía subcutánea, una sola vez, una dosis mínima de suero de caballo (0,002 c. c. = 0,0002 g. de proteína de otra especie), engendran durante un año a un año y medio hijos con anaflaxia pasiva; a la sangría corresponde, en este fenómeno, la cesión de anticuerpos al hijo [R. DOERR y S. SEIDENBERG (1931), Br. RATNER y H. L. GRUHEL (1931).]

5. Si el determinante inmunológico de un antígeno químicamente específico contiene una sustancia (arsénico, colorante azoico) que pueda descubrirse, aun estando en muy pequeña cantidad, por la inmunización, con tal antígeno se obtienen antisueros en que no puede demostrarse la sustancia determinante de la especificidad, aunque se apliquen los métodos analíticos más sensibles. Demostraron este hecho por primera vez R. DOERR y H. FRIEDLI y E. BERGER y H. ERLENMEYER (1932 a, b), dirigidos por DOERR, y más tarde, M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1930), S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1932), F. HAUROWITZ, M. VARDAR y P. SCHWERIN. Tampoco fué posible descubrir incluido en un anticuerpo el "resto del antígeno" con auxilio de la sensibilísima reacción anafláctica (E. WOLLMAN y M. BARDACH).

6. Si se inyectan animales con un antígeno *marcado químicamente* (por ejemplo, una azoproteína o yodoglobulina que contengan arsénico), éste desaparece rápidamente de la sangre circulante; de forma que puede quedar eliminado del torrente circulatorio en su mayor parte al cabo de pocas horas, y en su totalidad transcurridas veinticuatro. Si se investigan los distintos órganos, en ellos se encuentra el antígeno marcado, y su distribución no corresponde a la sangre que contengan, sino a su riqueza en células reticuloendoteliales (productoras de fagocitos); el máximo contenido en el elemento indicador (As o I) corresponde al hígado, y en segundo lugar, a la médula ósea [F. HAUROWITZ y F. BREINL (1932), F. HAUROWITZ y F. KRAUS]. Estos hechos no pueden compaginarse con la opinión de que la "transformación del antígeno en los anticuerpos" se produce en la sangre; refuerza, por

el contrario, la hipótesis, más antigua, que considera el tejido retículo-endotelial como el lugar donde se forman los anticuerpos [consúltese, entre otros autores, a E. METSCHNIKOFF, R. PFEIFFER y E. MARX, R. BIELING y S. ISAAC, F. STANDENATH y R. BIELING y colaboradores].

7. En los cultivos de tejidos a los que se añade antígenos (sueros o eritrocitos de otra especie, bacterias muertas) se observa la producción de precipitinas, hemolisinas, aglutininas y bacteriolisinas [A. CARREL y R. INGEBRIGTSEN, P. PRZYGODE, F. SCHILF, K. MEYER y LÖWENTHAL]. Se utilizaron cultivos de tejido de bazo, médula ósea, glándulas linfáticas, epiplón, todos los cuales poseen en su estructura elementos retículoendoteliales.

Ahora bien: estos experimentos no pueden considerarse concluyentes. Hay comunicaciones que exponen resultados negativos [M. H. KUCZYNSKI, E. TENNENBAUM y A. WERTHEMANN], y en la mayor parte de las que registran resultados positivos no se efectúa la totalidad del proceso en el tejido en fase de cultivo, sino que la formación de anticuerpos sólo se consigue cuando el contacto del tejido con el antígeno tuvo lugar en el animal vivo, es decir, cuando se cultivan tejidos de animales a los que algún tiempo antes se inyectó el antígeno (TSAI LEN HWON, R. C. PARKER). Según TSAI LEN HWON, no es preciso que se prolongue el contacto antigénico producido *in vivo*; si una a tres horas después de administrar una inyección intravenosa de anatoxina diftérica a conejos, se matan los animales y se cultiva tejido de su bazo, se observa en el cultivo el desarrollo de la antitoxina. Es muy notable la observación efectuada por los mismos autores de que no pueda demorarse mucho el período de actuación del antígeno en el animal vivo; un mes después de haber administrado tres inyecciones de anatoxina, el bazo de los animales ya no podía formar en los cultivos nada de antitoxina, si bien el suero del conejo todavía contenía el anticuerpo.

Aunque se comprobara, como cabe esperar de los datos anteriores, que también da lugar a la formación de anticuerpos el contacto del antígeno *in vitro*, habría que preguntarse si las sustancias de la porción líquida de los cultivos que actúan como anticuerpos son realmente productos de las células en proliferación; cabe también pensar en procesos de moldeado del tipo de los descritos por PAULING y CAMPBELL (véase a continuación).

CAPÍTULO III

INTENTOS DE CONSEGUIR "IN VITRO" SUSTANCIAS QUE ACTUEN COMO ANTICUERPOS (1)

a) *Los experimentos de L. Pauling y D. H. Campbell.*

En 1942, PAULING y CAMPBELL (1942 a) comunicaron que habían conseguido obtener *in vitro*, sin auxilio de células, por un procedimiento extraordinariamente sencillo, anticuerpos específicos.

Mezclaron γ -globulinas de suero vacuno (también obtuvieron resultados positivos con otras globulinas o albúminas) con haptenos (colorantes azoicos de alto peso molecular o un polisacárido específico del neumococo tipo III); calentaron la mezcla a 55-65° y dejaron enfriar lentamente; en otros experimentos alcalinizaron la mezcla y restablecieron paulatinamente la primitiva neutralidad. De este modo obtuvieron *anticuerpos artificiales* que dieron siempre precipitaciones específicas con los haptenos empleados, y en el caso de los polisacáridos del neumococo aglutinaron, además, específicamente los neumococos del tipo III.

Explicaron el proceso suponiendo que las cadenas peptídicas de las proteínas del suero apelotonadas esféricamente se desplegaban ("desovillaban") y se adaptaban al hapteno, constituyendo una especie de matriz de éste: en su opinión, después de separar el hapteno persiste su vaciado plástico en la molécula proteica, y esta impronta determina la especificidad de las proteínas y su capacidad de reaccionar con el hapteno (véase pág. 78). En el mismo año publicaron sus autores un informe más extenso sobre estos experimentos [PAULING y CAMPBELL (1942 b)]; hasta la fecha, la literatura científica no ha insistido en la corroboración de los resultados consignados. En la nueva edición de su obra *The Specificity of serological reactions* (2), K. LANDSTEINER

(1) No se consideran comunicaciones antiguas refutadas posteriormente.

(2) Esta edición apareció después de la muerte de K. LANDSTEINER, acaecida en junio de 1943. Sin embargo, la opinión sobre los resultados de PAULING debe atribuirse, indudablemente, a LANDSTEINER mismo y no a su hijo, E. K. LANDSTEINER, que se encargó de redactar dicha edición.

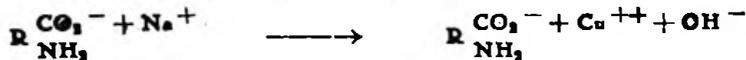
(1945) se manifiesta reservado; opina que hay que efectuar numerosas reacciones cruzadas, así como obtener precipitinas para antígenos proteicos y células para poder emitir un juicio concluyente acerca de las analogías que presentan, en cuanto a su especificidad, las disoluciones de proteínas tratadas del modo descrito con los anticuerpos obtenidos en el organismo animal. No obstante, LANDSTEINER reconoce que si se establece con certeza que las proteínas pueden recibir, hasta un cierto grado, por un procedimiento artificial, una determinada configuración, pudiera avanzarse mucho en la comprensión de la especificidad de los anticuerpos, así como en el estudio de la estructura de las proteínas e incluso llegar a enfocarse estas cuestiones desde puntos de vista nuevos.

Las conclusiones de PAULING y CAMPBELL fueron estudiadas en publicaciones europeas por R. DOERR (1944), brevemente, y en lo que respecta a su significación principal, y por P. JORDAN (1944), que las sometió a crítica. Este autor no combate la exactitud de los datos de PAULING, para lo que no estaría autorizado por carecer de experimentos propios; pero opina que "las valiosas pruebas con molde" de los autores americanos no pueden esclarecer por completo las condiciones en que se forman los anticuerpos en el organismo. Según PAULING, sobre el patrón de una molécula de antígeno no puede formarse sino una sola molécula de anticuerpo; por consiguiente, la enorme desproporción entre el número de moléculas de antígenos y anticuerpos sólo podría explicarse suponiendo que la misma molécula de antígeno se recubre un gran número de veces que han de sucederse con una gran velocidad (calcula JORDAN que a un ritmo máximo de 10^3 por segundo); por otra parte, también combate P. JORDAN la opinión de que puedan obtenerse formaciones esféricas ("esferoproteínas") por el apelotonamiento de cadenas de polipéptidos, con lo que impugna, por consiguiente, el fundamento mismo de la interpretación que da PAULING a los resultados de sus experimentos (véase pág. 10). Sin embargo, no sólo PAULING, sino otros autores competentes (R. SIGNER, W. KUHN), consideran muy probable que las moléculas filiformes y ante todo las de proteínas, puedan apelotonarse y desovillarse.

β) *Los contra-antígenos de J. Loiseleur.*

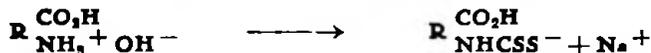
LOISELEUR (1938 a) obtiene sus *contra-antígenos* (*contre-antigènes*) cambiando los signos de las cargas electrostáticas de ciertas agrupaciones atómicas, existentes en las moléculas de proteínas (ovalbúmina,

veneno de cobra). Para transformar las cargas negativas en positivas se trataron las proteínas con Cu, como se expresa en el siguiente esquema:



El resultado deseado se obtiene, como puede verse, por la saturación de la carga negativa del ácido por una de las dos cargas positivas del ión Cu^{++} , mientras que la otra se neutraliza por OH^- , Cl^- , etc.

Para cambiar en negativa la carga de los grupos electropositivos se utilizó CS_2 , que transforma el grupo amino en tiosulfocarbamida negativa:



Por una combinación adecuada de ambos procedimientos obtuvo LOISELEUR contra-proteínas, que difieren poco, en cuanto a su estructura química, de las proteínas de partida, pero cuyos grupos atómicos poseen cargas opuestas. Si se mezclan con las proteínas de que proceden, se fijarán a ellas por la atracción de todas las cargas contrarias, y la neutralización mutua de éstas cargas provocará la precipitación del complejo. El resultado correspondió a la previsión teórica, y si se mezcla una disolución de ovalbúmina con una disolución de contra-ovalbúmina, crece la viscosidad, a consecuencia del aumento de tamaño de las partículas, y a continuación se produce una floculación (LOISELEUR, 1938 b).

La reacción resulta específica. El contra-antígeno de la ovalbúmina actúa sólo sobre ésta, pero no provoca el aumento de viscosidad ni la precipitación si se mezcla con disoluciones de caseína, edestina o gelatina. También se observa una estricta especificidad, análoga a la de las reacciones con los anticuerpos propiamente dichos, en otros pares de antígenos y contra-antígenos [J. LOISELEUR (1938 b, 1938 d), LOISELEUR y Th. CAILLOT, LOISELEUR y C. CROVISIER]. El contra-antígeno de un antígeno tóxico resulta ser como la antitoxina, inocuo, y puede neutralizar la pareja tóxica (tal sucede con el veneno de cobra o de víbora); la especificidad presenta los mismos límites que se observan en la neutralización de los venenos de serpientes mencionados por sueros antiserpiente [J. LOISELEUR (1938 c, 1938 d, 1939)]. Resulta de gran interés el hecho de que el contra-antígeno no posea ya las propiedades inmunológicas del antígeno de que procede. Por ejemplo, es

imposible inmunizar animales (ratones) de modo activo contra el veneno de cobra por tratamiento con dosis crecientes de un contra-antígeno obtenido a partir del veneno de cobra [P. LÉPINE (1932), J. LOISELEUR (1942 a)]. La especificidad inmunológica de un antígeno desaparece si se transforma en el contra-antígeno correspondiente; las comunicaciones aparecidas no esclarecen si la especificidad desaparecida se sustituye por una nueva [P. LÉPINE (1942), J. LOISELEUR (1942 a)].

J. LOISELEUR (1939) ha dado a conocer otro método para obtener contra-antígenos a partir de antígenos proteicos, en el que la transformación de los grupos negativos en positivos y la de los positivos en negativos se efectúan simultáneamente. El autor ilustra su técnica por el esquema siguiente:

Cu O ₄ 10 % (Anodo)	Jugo de embrión	Ovalbúmina	Jugo de embrión	Cu SO ₄ 10 % (Cátodo)
--------------------------------------	-----------------	------------	-----------------	--

Los trazos verticales representan membranas de celofán que separan células de electrodiálisis. Los iones Cu⁺⁺ que llegan al jugo de embrión consignado a la izquierda del esquema se ligan a él liberando una cantidad equivalente de iones que se transportan a la ovalbúmina, donde quedan fijados en parte; a partir de la derecha (del cátodo) se efectúa un proceso análogo, pero inverso, con los iones negativos SO₄⁻. Como resultado de este doble transporte de iones se obtiene el contra-antígeno de la ovalbúmina, el cual, según los datos de LOISELEUR, posee las mismas propiedades del preparado obtenido mediante su técnica en dos fases. En lugar de jugo de embrión puede utilizarse también, según LOISELEUR (1939), extracto de órganos (timo, glándulas linfáticas o suero de caballo calentado una hora a 70°).

Los resultados de LOISELEUR tampoco han sido confirmados hasta la fecha.

γ) Antitoxina diftérica y hemaglutinina.

En este caso no se trata de la obtención de un anticuerpo en tubo de ensayo, sino de la transformación de un anticuerpo en otro de especificidad y manera de actuar heterólogas. Existen puntos de contacto entre estas investigaciones y las de PAULING y LOISELEUR que justifican su inclusión en este lugar.

HANS SEEMÜLLER (1943) inmunizó conejos con hematies de cobayo y toxina diftérica. Debido a su contenido en hemotoxina, el suero de tales conejos, inyectado subcutáneamente en dosis suficiente, mataba en tres días al cobayo. Pero si se añadía al suero una determinada cantidad de toxina diftérica, la muerte de los cobayos se retrasaba o se impedía.

Por variaciones de esta prueba fundamental llegó a la conclusión de que la toxina funciona como un "elemento de enlace" (es decir, como un "amboceptor", según la terminología de EHRlich), que se combina, por una parte, con la antitoxina, y por la otra, con la hemaglutinina. El enlace mencionado en segundo lugar está en manifiesta contradicción, no aclarada por el autor, con las reglas hasta ahora conocidas sobre la especificidad de las reacciones entre antígeno y anticuerpo. Experimentos análogos efectuados con la toxina tetánica dieron un resultado rotundamente negativo, lo que pone de manifiesto que existe "una diferencia fundamental entre el mecanismo de inmunidad de la difteria y el del tétanos, debido a que la capacidad de combinación de las toxinas es de un orden diferente". La hemaglutinina no solamente se combina y neutraliza por el complejo toxina + antitoxina, sino también por el toxoide diftérico solo; la combinación con el toxoide, incluso después de abandonar largo tiempo la mezcla de la reacción, puede disociarse por adición de antitoxina y con ello aparece de nuevo el efecto patógeno de la hemaglutinina [H. SEEMÜLLER (1945)]. Por el contrario, la hemaglutinina, después de haberse combinado con la toxina, no puede regenerarse por adición de antitoxina; tampoco es posible inactivar la hemaglutinina si se la añade a una mezcla neutra y consolidada de antitoxina diftérica y toxina (o toxoide). H. SEEMÜLLER (1945) interpreta este resultado suponiendo que la avidéz de la toxina (o del toxoide) para la antitoxina diftérica es mayor que para la hemaglutinina. Partiendo de la suposición de la afinidad bivalente de la toxina diftérica plantea SEEMÜLLER otros experimentos en los que, según sus datos, "mediante hemaglutininas y precipitinas de estructura semejante consigue anticuerpos, preparados sin emplear el antígeno específico (la toxina diftérica), que se comportan funcionalmente como los anticuerpos diftéricos; es decir, que neutralizan la toxina diftérica". El medio para transformar las proteínas específicas en anticuerpos capaces de neutralizar la toxina diftérica consiste, según la expresión de H. SEEMÜLLER (1944), en "un pase por un organismo de otra especie". Por ejemplo: se inmunizan conejos con suero de cobayo o suero humano, y los antisueros con precipitinas que así se obtienen se inyectan a cobayos normales

de 300 g. en dosis subcutáneas de 1-2 ml.; a los dos o tres días de haber sufrido este tratamiento, los cobayos pueden soportar una dosis de toxina diftérica necesariamente letal. Y análogos resultados se obtuvieron inyectando suero de conejo con aglutininas para la sangre humana, aunque en este caso los resultados de la "vacunación" no eran tan constantes como en los experimentos con precipitinas.

H. SEEMÜLLER (1944) interpreta estos experimentos, como se señaló antes, suponiendo que las precipitinas y hemaglutininas se transforman en el cuerpo del cobayo en antitoxina diftérica. Como la protección contra la toxina diftérica sólo aparece tras una incubación de cuarenta y ocho horas, parece ser que dicha transformación requiere determinado tiempo. Sin embargo, sorprende, y especialmente si se considera la hipótesis del autor, que sea limitada la duración de la protección, ya que los cobayos, a los cuatro-siete días de recibir los antisueros, vuelven a quedar tan sensibles a la toxina como los animales normales. Por otra parte, aun manteniéndose dentro del intervalo conveniente, el efecto protector es escaso, ya que sólo alcanza a defender de una dosis letal; debe ser, según esto, muy pequeña la cantidad de antitoxina producida por la transformación de 1-2 ml. de antisuero precipitante o hemaglutinante de título elevado (1 : 1000). Por último, puede neutralizarse *in vitro* el efecto mortal de un antisuero de conejo capaz de aglutinar eritrocitos de cobayo, por la simple mezcla con toxoide diftérico; la hemaglutinina, en un experimento conducido de este modo, se comporta como la antitoxina diftérica y no resulta claro por qué motivo requiere una incubación de dos a tres días en aquellos experimentos en los que se busca por la misma hemaglutinina una protección contra la toxina diftérica. No es muy convincente la explicación de SEEMÜLLER (1944); opina que la prueba de la mezcla *in vitro* únicamente establece la capacidad reaccional de combinación, pero que las distintas capacidades de neutralización (para la toxina diftérica) tan sólo se consiguen mediante una transformación *in vivo*. En definitiva, lo que se deduce de los experimentos es simplemente: 1. La hemaglutinina antihemáticas del cobayo resulta inocua para los cobayos si se la administra mezclada con toxoide diftérico. 2. Dicha hemaglutinina no puede neutralizar *in vitro* a la toxina diftérica, pero protege débilmente contra ésta si se la inyecta en condiciones muy determinadas dos días antes de administrar la toxina. Todo lo demás es hipotético.

Se debe aguardar a nuevos experimentos antes de tomar posición frente a los resultados experimentales de estas investigaciones y a su interpretación por H. SEEMÜLLER, T. REH, M. ARMANGUÉ, E. NOVEL

y O. DEDIE discuten la posibilidad de que los venenos de caldos designados como "toxina diftérica" y "toxoides diftérico", y sus derivados formolados (anatoxinas), pudieran contener como "impurezas" o "lastre" sustancias del tipo del antígeno de FORSSMAN y que estos antígenos accidentales sean los que se combinen con las aglutininas de cobayo, neutralizando los efectos perniciosos de éstas para estos animales. La cuestión hasta ahora no aparece clara [véase SEEMÜLLER (1945) y las observaciones polémicas de ARMANGUÉ].

δ) *Resumen.*

En una revisión del conjunto de las pruebas citadas, en las que pudiera apoyarse la posibilidad del origen humoral de los anticuerpos, lo primero que salta a la vista es que no existe entre ellas ninguna unidad íntima. La idea fundamental, o la observación, que ha llevado a obtener "anticuerpos artificiales" es tan distinta de un trabajo a otro como difieren entre sí los métodos. PAULING y CAMPBELL utilizan como productos de partida haptenos y proteínas del suero normal, sobre las que aquéllos actúan físicamente; LOISELEUR no necesita sino antígenos proteicos, y consigue su transformación en contra-antígenos por sustituciones químicas; por último, SEEMÜLLER utiliza anticuerpos heterólogos, a los que transforma en otros anticuerpos por pases por un organismo.

Para la discusión del origen humoral de los anticuerpos prescindiremos, ante todo, de los datos de SEEMÜLLER porque sólo se refieren a un único anticuerpo, la antitoxina diftérica. Aunque no sea imposible, resulta sumamente improbable que dicha antitoxina difiera en este respecto de todos los restantes anticuerpos y de todas las otras antitoxinas. No es de esperar, por consiguiente, que las comunicaciones de SEEMÜLLER trastornen nuestra concepción acerca de la formación de los anticuerpos.

Los resultados obtenidos por PAULING y CAMPBELL, así como los de LOISELEUR, pudieran poseer validez general; pero estos autores obtienen sus preparados en condiciones distintas de las orgánicas. Contra PAULING y CAMPBELL pudiera objetarse especialmente que la inyección intravenosa de un hapteno no conduce, como es sabido, a la formación de anticuerpos, y que los anticuerpos producidos en el organismo son siempre globulinas inmunes, pero jamás albúminas inmunes (véase pág. 40). A LOISELEUR podría hacersele la objeción

de que en el organismo los anticuerpos no se producen a partir del antígeno, ya que demuestran lo contrario los experimentos efectuados con antígenos marcados químicamente. :

Por todo ello conservan su validez los argumentos expuestos en las páginas 4 a 9, que abogan por el origen celular de los anticuerpos.

CAPÍTULO IV

LA FORMACION DE ANTICUERPOS CONSIDERADA COMO UNA REACCION DE DETERMINADAS CELULAS FRENTE AL ESTIMULO DEL ANTIGENO

Aunque, como consecuencia de la situación descrita, parece afirmarse que los anticuerpos se producen en células vivas que los ceden al medio circundante (linfa de los tejidos, plasma sanguíneo), no por ello queda resuelto el problema de la relación genética entre el antígeno y el anticuerpo. La hipótesis de EHRLICH de que el anticuerpo está ya préformado en las células y que es, por consiguiente, un producto normal del metabolismo celular, resulta insostenible después de que E. P. PICK y OBERMAYER, así como K. LANDSTEINER, han demostrado que pueden obtenerse antígenos artificiales de especificidad química, en número prácticamente ilimitado y con determinantes inmunológicos que no poseen ninguna relación con la vida sana. Sería absurdo pensar que las células estuvieran abastecidas contra sustancias desconocidas para ellas y en tan enorme número.

Por ello ha ocupado el lugar de la de EHRLICH una nueva concepción, a saber: *la del estímulo y la respuesta al estímulo*. El estímulo se produce cuando el antígeno se pone en contacto con células productoras de anticuerpos, y la respuesta al estímulo sería la *producción de anticuerpos*, en una especie de secreción interna (R. PFEIFFER, BIELING, H. SAHLI y otros). Pero como el anticuerpo producido se relaciona específicamente con el antígeno, al que debe su producción, hay que atribuir a la especificidad química de la sustancia estimuladora, y no a las peculiaridades funcionales de las células secretoras, las características del producto de la secreción en lo que respecta a la especificidad. A primera vista esto parece estar en contradicción con toda la experiencia fisiológica. En el fondo, la dificultad es la misma que en la teoría de EHRLICH: radica en la innumerable cantidad de antígenos y anticuerpos que a menudo se han comparado con el cúmulo

de combinaciones orgánicas. Pueden seguirse dos caminos para orillar este obstáculo. El primero consiste *en investigar las propiedades de los productos de secreción considerados, es decir, en establecer la naturaleza de los anticuerpos*; el segundo, *en determinar el lugar dónde pudieran producirse tales sustancias*. Sobre estos fundamentos habrían de apoyarse las ulteriores investigaciones sobre la transformación de los antígenos en sus anticuerpos.

CAPÍTULO V

LOS ANTICUERPOS COMO PROTEINAS DEL SUERO

I. INTRODUCCIÓN

Se conocen dos formas de anticuerpos: los de la primera son componentes del plasma sanguíneo (del suero sanguíneo) o de diferentes líquidos orgánicos (leche, linfa, líquido cerebrospinal, etc.); los de la segunda se acusan por modos de actividad que poseen la misma especificidad reaccional que los anticuerpos de la primera clase; pero, en oposición a éstos, quedan anclados en ciertos órganos de los animales de experimentación que se encuentran en estado de anafilaxia activa o pasiva. Sólo la primera forma, llamada "humoral", puede investigarse química y físicamente, y, por consiguiente, todo lo que en este respecto se diga sobre la naturaleza de los anticuerpos se refiere a dicha primera forma.

Los anticuerpos de la segunda forma, que suelen denominarse "sésiles" o "celulares", no pueden separarse de los tejidos en que existen (1). Su presencia se descubre simplemente porque los órganos o tejidos que los contienen reaccionan con el antígeno específico al ponerse en contacto con éste, en oposición a lo que hacen los órganos-testigo normales. Como no pueden aislarse, se ignora en qué difieren de los de la primera forma en cuanto respecta a sus propiedades físico-químicas. Ahora bien: en lo que concierne a sus relacio-

(1) Los datos de K. MATSUMOTO deben comprobarse y completarse cuidadosamente; este autor comunica que en los órganos (bazo, hígado, riñón) de cobayos sensibilizados por vía activa con suero de caballo, ha podido demostrar una precipitina muy activa cuando este anticuerpo ya había desaparecido de la circulación, y que en este período el estado anafiláctico había alcanzado su máxima intensidad. Los órganos mencionados no pertenecen, sin embargo, a los "órganos del choque" del cobayo, a los que habría de atribuirse un contenido máximo de anticuerpos "sésiles".

nes inmunológicas, ambas formas son siempre idénticas, ya que su formación se debe al mismo antígeno y reaccionan con éste o con haptenos de igual especificidad (J. TOMCSIK y KUROTCHKIN). Como, por otra parte, la segunda forma puede obtenerse por vía pasiva incorporando a un animal normal un antisuero que contenga la primera forma, puede suponerse, con gran probabilidad, que entre ambas formas no deben existir diferencias considerables.

Investigaciones muy diversas sobre sueros inmunes que contienen anticuerpos han puesto de manifiesto que las proteínas de tales sueros se comportan frente a diferentes agentes (calor, digestión péptica o tripsica, sustancias que precipitan proteínas) como los anticuerpos demostrables por sus funciones inmunológicas. Aquí no tiene objeto recoger la numerosa literatura y los innumerables datos pertinentes a este punto; en las obras especiales [K. LANDSTEINER (1933, 1936, 1945), H. G. WELLS (1929), J. R. MARRACK (1938), J. BORDET (1939)] se encuentra la prueba de este paralelismo, que en la actualidad se acepta universalmente. Estas aseveraciones podrían interpretarse en el sentido de que los anticuerpos están tan íntimamente combinados con las proteínas del suero que también sufren ellos mismos los ataques que desnaturalizan o destruyen tales proteínas; o bien admitirse que los anticuerpos son sustancias que poseen igual estructura que las proteínas del suero. La tercera posibilidad, a saber: que poseyeran casualmente la misma resistencia que las proteínas del suero, resulta improbable porque su comportamiento concuerda con el de ellas frente a un gran número de agentes muy diversos. Procedimientos nuevos permitirán decidir cuál de estas opiniones encierra la verdad.

En primer lugar interesa recordar que han fracasado todos los esfuerzos para separar las proteínas de los sueros inmunes y los anticuerpos; es decir, para obtener *anticuerpos exentos de proteínas*. Al enjuiciar datos que contradigan lo anterior (por ejemplo, los comunicados por F. M. HUNTON y colaboradores), hay que considerar que la sensibilidad de las reacciones serológicas es mucho mayor que las de ninguna reacción química de proteínas. Si, por ejemplo, al desdoblarse complejos de antígeno y anticuerpo se obtienen disoluciones diluídas de anticuerpo en las que no puede demostrarse ninguna proteína, esto no aporta una prueba decisiva para la existencia de anticuerpos exentos de proteínas. En la mayoría de estos ensayos se perseguía, y de hecho se lograba, elevar la concentración del anticuerpo, resultando finalmente preparados enriquecidos en el factor necesario para la reacción de inmunidad, por lo que se conseguía un

resultado positivo con sólo unas γ , e incluso unas décimas y hasta centésimas de γ de sustancia [L. F. FELTON (1932), H. v. EULER y E. BRUNJUS].

Ya en 1903, E. v. DUNGERN observó que el examen de la *precipitación inmune encierra singulares posibilidades para fundamentar hipótesis sobre antígenos y anticuerpos*.

VON DUNGERN inmunizó conejos con plasma de "octopus" y obtuvo precipitinas que reaccionaban con el antígeno formando un precipitado. El plasma de octopus contiene un solo albuminoide, "marcado químicamente", la hemocianina, que contiene cobre. Para investigar si esta sustancia intervenía en la formación del precipitado y existía en el producto de la reacción antígeno-anticuerpo, se investigó el contenido de cobre en éste; el resultado fué positivo. Si v. DUNGERN no dice explícitamente que participen en el precipitado las proteínas del antisuero es porque lo da ya por sentado. En efecto, E. P. PICK había demostrado en 1901-1902 que, a partir de cultivos de tifus, pueden obtenerse disoluciones que no dan reacciones de proteína, pero que con un suero inmune con precipitinas originan un precipitado proteico; por consiguiente, la proteína del precipitado sólo puede proceder del suero inmune.

El descubrimiento de un polisacárido del neumococo, específico de tipo, que si bien carece de la función antigénica en cuanto a la producción de anticuerpos, puede, no obstante, precipitar *in vitro* con el suero inmune correspondiente, permite repetir los experimentos de E. P. PICK en una forma químicamente impecable y por ello mucho más demostrativa; los polisacáridos que actúan *in vitro* como antígenos (haptenos) están exentos de proteína, y, por tanto, las proteínas que aparecen en el precipitado específico tienen que proceder de las proteínas del suero inmune [L. D. FELTON y G. H. BAILEY (1926 a), M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1929 b)]. Además, puede demostrarse que la proteína del antisuero pasa al precipitado por haber reaccionado con el antígeno y no por haber sido adsorbida por éste de modo inespecífico; en efecto, si se adicionan proteínas coloreadas a las mezclas de un antígeno y de su antisuero, se observa que el precipitado inmune no arrastra con él a dicha proteína; por ejemplo, el precipitado procedente de reaccionar la seroglobulina de caballo con el antisuero correspondiente en una disolución, a la que se añade arsanilalbúmina de vaca, resulta de color blanco puro sin que se aprecie en él el color rojo de dicha proteína y sólo indicios mínimos de arsénico [M. HEIDELBERGER y K. LANDSTEINER (1923), F. HAURWITZ y F. BREINL (1933), J. MARRACK y F. C. SMITH]; en cambio,

dicha arsanilalbúmina roja da con su propio antisuero un precipitado rojo con fuerte contenido de arsénico.

II. COMPORTAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS EN EL FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LOS ANTISUEROS

Por precipitación con su volumen de disolución de sulfato amónico saturado, por diálisis, electrolisis, por dilución con agua destilada, por acidulación, etc., las proteínas totales de cualquier suero normal o inmune pueden fraccionarse en dos porciones: las *globulinas* y las *albúminas*. Si se investiga un antisuero por cualquiera de los procedimientos nombrados, los anticuerpos aparecen, *sin excepción, en la fracción de las globulinas*, cualquiera que sea la naturaleza de ellos (antitoxinas, aglutininas, precipitinas, anticuerpos anafilácticos, etcétera). En conclusión, si se relaciona esto con los resultados experimentales antes mencionados, hay que admitir que los anticuerpos circulantes ("libres") pertenecen a las *globulinas del suero*.

III. MOTIVOS DEL INTERÉS ESPECIAL QUE OFRECEN LAS GLOBULINAS INMUNES

Las globulinas del suero (prescindimos del fraccionamiento, también posible, de las seroalbúminas) pueden fraccionarse a su vez en dos porciones designadas con los nombres de *euglobulinas* y *seudoglobulinas*. No se ha encontrado ninguna ley general concerniente a si los anticuerpos pertenecen en su totalidad a una de las dos fracciones o si están repartidos en una determinada proporción entre ambas; la distribución parece depender de diversos factores, por ejemplo, de la especie del animal que suministra el suero, del tipo del anticuerpo y, *en todo caso, del método de fraccionamiento utilizado*. Si la masa principal de los anticuerpos está contenida en una de las fracciones citadas de las globulinas, resultará muy ventajoso para purificar los sueros curativos, separar la otra fracción y, desde luego, la albúmina, que siempre está exenta de anticuerpos. Teóricamente, en lo que respecta a la cuestión de la naturaleza de los anticuerpos, no tiene, por consiguiente, ningún fundamento la diferenciación entre eu y seudoglobulinas, tanto más cuanto que J. MARRACK y D. A. DUFF dudan que estas fracciones, si se obtienen por los métodos de fraccionamiento primitivos, correspondan a proteínas puras, y que

además preexistan en el plasma o en el suero sanguíneos. Se duda que las "euglobulinas y "seudoglobulinas" deban considerarse como proteínas especiales con existencia independiente en el plasma, creyéndose probable que, al aplicar la técnica de fraccionamiento, se altere su composición [THE SVEDBERG y R. S. SIÖGREN (1930), THE SVEDBERG (1930) y A. TISELIUS (véase a continuación)].

Los resultados obtenidos con los métodos de fraccionamiento empleados hasta la fecha no excluyen, naturalmente, que, aplicando una técnica más depurada (por ejemplo, la electroforesis o la ultracentrifugación analítica), lleguen a aislarse componentes de las globulinas que se comporten como especies, desde el punto de vista físico-químico, y que puedan, además, considerarse como proteínas preexistentes en el suero (A. TISELIUS). *Entretanto, no se plantea "a priori" la identificación de los anticuerpos con una globulina especial determinada, sino en qué se distinguen las globulinas-anticuerpos (globulinas inmunes) de las otras globulinas de los sueros normales e inmunes.* A continuación se considera este problema fundamental.

IV. FRACCIONAMIENTO POR ELECTROFORESIS DE LAS PROTEÍNAS TOTALES DEL SUERO SANGUÍNEO NORMAL (A. TISELIUS)

En 1937, A. TISELIUS pudo demostrar, con la ayuda de un aparato de electroforesis perfeccionado (1), que de un suero normal pueden aislarse cuatro proteínas bien caracterizadas que difieren entre sí por el punto isoelectrico y por la velocidad de desplazamiento en un campo eléctrico; se trata de una albúmina y de las tres globulinas α , β y γ . Como ejemplo se reproduce en forma esquemática el resultado de un experimento [A. TISELIUS (1936 a, pág. 1472)]:

(1). La descripción del aparato y las instrucciones necesarias para su manejo se encuentran en las publicaciones de A. TISELIUS (1938 b, 1937 c, 1939-40). El método fué perfeccionado por L. G. LONGWORTH y D. A. MACINNES, por J. ST. B. PHILPOT, así como por H. SVENSSON. Existen publicaciones nuevas con esquemas instructivos que describen con claridad los fundamentos y el estado actual de la técnica electroforética y particularmente de la investigación electroforética del plasma y del suero sanguíneos y de la traducción cuantitativa de la velocidad de desplazamiento y de la proporción entre los diversos componentes proteicos. Se recomiendan especialmente las publicaciones siguientes: E. WIEDEMANN (1944, 1945, 1946), D. A. MACINNES y L. G. LONGWORTH (1944), H. A. ABRAMSON, L. S. MOYER y M. H. GORIN (1942).

TABLA 1.^a

Velocidad de desplazamiento de los cuatro componentes proteicos de un suero normal con los puntos isoelectrónicos respectivos.

Amortiguador	pH	Velocidad de desplazamiento en $\text{cm}^2\text{v}^{-1}\text{seg}^{-1} \times 10^5$			
		Albúmina:	Globulina α_1	Globulina β :	Globulina γ :
Fosfato.....	6,02	- 4,50	- 3,34	- 2,55	+ 0,01
Fosfato.....	8,03	- 7,15	- 6,16	- 4,20	- 1,51
Punto isoelectrónico.		pH = 4,64	pH = 5,06	pH = 5,12	pH = 6,0

Como puede observarse en la tabla, las diferencias en las velocidades de desplazamiento se acusan especialmente cuando se opera en medio alcalino. Los valores obtenidos con los sueros de diferentes especies animales son aproximadamente iguales, punto éste sobre el que hemos de volver. Si se analizan en el aparato de electroforesis las eu y pseudoglobulinas obtenidas por precipitación con sulfato amónico, aparecen como mezclas, en proporciones variables, de las globulinas α , β y γ , que contienen además albúmina, lo que confirma las opiniones recogidas sobre el carácter de estos preparados.

Sin embargo, tampoco pueden considerarse como homogéneas las globulinas α , β y γ obtenidas por el procedimiento ordinario de electroforesis. Basta afinar el mismo análisis electroforético para demostrar que el suero de la sangre humana normal contiene, al menos, seis componentes proteicos, a saber: dos α -globulinas (designadas como α_1 y α_2), dos β -globulinas (β_1 y β_2), una γ -globulina y, por último, la albúmina; además, en el plasma se encuentra el fibrinógeno [H. SVENSON (1939, 1940, 1941, 1943), E. J. COHN, E. J. COHN y colaboradores; H. T. TREFFERS (1944 a, 1944 b), W. C. BOYD (1943)]. Tampoco es unitaria la globulina γ , ya que J. W. WILLIAMS, PETERMANN, COLOVOS, GOODLOE, ONCLEY y ARMSTRONG pudieron separar de la fracción de la γ -globulina un 20 por 100 constituido por un producto que se sedimenta más rápidamente que el resto, aunque se comporta en todos los otros aspectos, como γ -globulina. En el diagrama siguiente (tomado de una publicación de E. J. COHN, ONCLEY, STRONG, HUGUES y ARMSTRONG) se representan estos resultados.

Todavía aparece mayor número de componentes proteicos del plasma o del suero cuando, para aislar y caracterizar las fracciones del suero, se aplica, además de la electroforesis, la ultracentrifugación, los métodos de fraccionamiento por precipitación selectiva y las reacciones serológicas.

Por ejemplo, R. KEKWICK pudo separar del suero de caballo una fracción de albúmina que, aunque parecía homogénea en las pruebas de sedimentación y de electroforesis, al ser investigada con sueros precipitantes, resultó una mezcla [KEKWICK, GELL y YUILL].

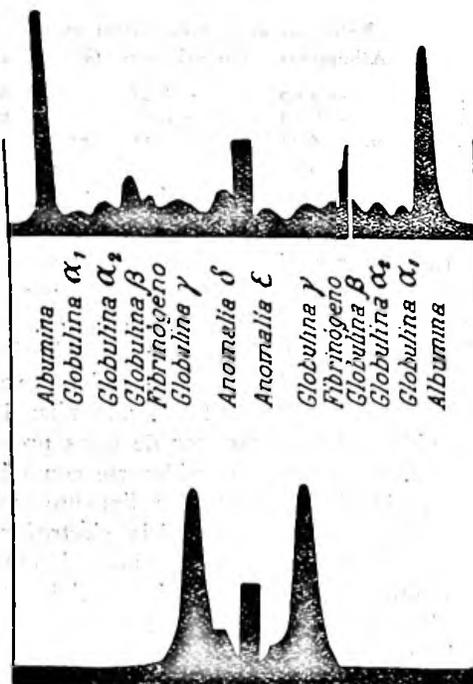


FIG. 3.^o El diagrama superior muestra la diferenciación electroforética de los componentes del plasma sanguíneo humano normal, hacia la izquierda en el brazo ascendente y a la derecha en el descendente de la célula de electroforesis en forma de "U"; la anomalía α - δ y la anomalía α - ϵ no corresponden a ninguna fracción especial de proteínas, sino que proceden de la mezcla de la disolución amortiguadora empleada y del plasma sanguíneo que se investiga. El diagrama inferior corresponde a la imagen electroforética de una fracción aislada de γ -globulina, en la que pueden observarse, por un lado, la pureza de la fracción (por la carencia de albúmina, de α y β -globulinas y de fibrinogeno), y, por otra parte, la heterogeneidad de la γ -globulina. Esta fracción se designa con un II en el esquema de E. J. COHN (1945), que se reproduce en la pág. 27.

Ahora bien: cuando se insiste en el fraccionamiento de las proteínas del suero siempre hay que preguntarse si las porciones conseguidas corresponden a proteínas especiales preexistentes en el suero, o si se trata de productos originados por el proceso de fraccionamiento.

J. ROCHF e Y. DERRIEN, que, limitándose a un solo criterio (las diferencias de solubilidad), pretenden distinguir al menos 13 componentes del suero, dudan, sin embargo, de si esta diferenciación corresponde a la realidad. E. J. COHN y colaboradores proceden, pues, de modo

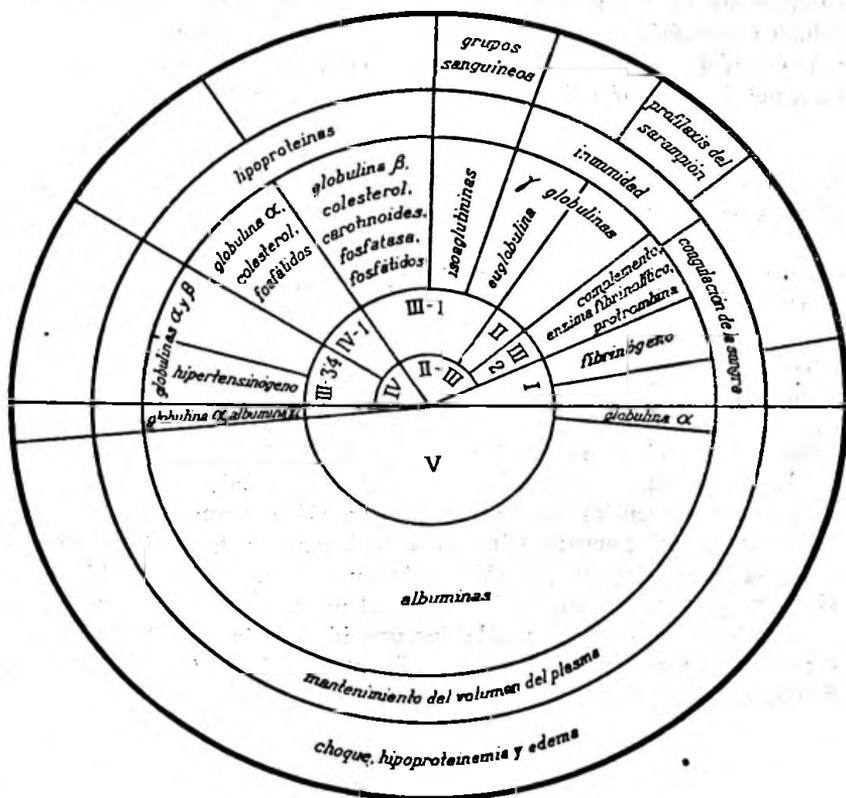


FIG. 4.ª Explicación en el texto.

resolutivo y prudente al someter todas las fracciones del suero que van obteniendo a pruebas de homogeneidad por la aplicación de los restantes métodos; cuidan especialmente de que las fracciones correspondan con las diversas funciones fisiológicas. Por encargo del Blood Substitutes Subcommittee of the National Research Council americano, COHN ha emprendido, con la colaboración de un equipo de es-

pecialistas, el fraccionamiento del plasma sanguíneo de adultos normales, que le ha conducido a resultados de mucho valor, tanto teórico como práctico. Como su trabajo está en estrecha relación con las cuestiones que aquí se plantean (naturaleza de las proteínas, resistencia de los anticuerpos), se expone a continuación un breve extracto del fundamento de los métodos que emplean estos autores y de los resultados numéricos obtenidos; puede conseguirse una información más completa en E. J. COHN (1945) y en el cuaderno especial número 4 del *Journal of Clinical Investigations*, 23, 1944.

V. RESULTADO DE LOS NUEVOS MÉTODOS DE FRACCIONAMIENTO DEL PLASMA SANGUÍNEO DE HOMBRES ADULTOS Y NORMALES (E. J. COHN)

Como puede observarse en el esquema publicado por E. J. COHN (1945) (véase figura 4), se separan primeramente cuatro fracciones principales, a saber: I (fibrinógeno), II + III (γ -globulina y una parte de la β -globulina), IV (α -globulina y un componente de la β -globulina) y V (albúmina). Como se demostró que este fraccionamiento era insuficiente, se obtuvieron subfracciones de las porciones principales I, II + III y IV; en especial, la II + III se desdobló en la II (sustancia protectora contra el sarampión), en la III-1 (en la que se incluyen las isoaglutininas) y la III-2 (protrombina, enzima fibrinolítico, componente C'1 del complemento); también se subdividió la fracción principal IV, en la que se encerraban el hipertensinógeno y el componente C'2 del complemento.

El siguiente esquema puede dar una idea de la medida en que se consiguió separar unas fracciones de otras (E. J. COHN, ONCLEY, STRONG, HUGHES y ARMSTRONG).

TABLA 2.^a

Número de la fracción (véase esquema.)	Sustancias fisiológicamente activas.	% de las proteínas del plasma.	Distribución de los componentes electroforéticos					Concentración de la sustancia fisiológicamente activa con respecto al plasma original.
			Albúmina ..	α Globulina.	β Globulina.	γ Globulina.	Fibrinógeno.	
V	Albúmina	48	100	0	0	0	0	1,3 X
IV	Hipertensinógeno.	10	15	56	28	2	0	8 X
	Complemento C'2.							8 X
III-2	Complemento C'1.	3	0	10	75	15	0	15 X
	Trombina							15 X
III-1	Isohemaglutinina.	8	0	4	35	61	0	12 X
II	Inmunoglobulina..	10	1	0	1	98	0	8 X
I	Fibrinógeno.....	6	5	4	19	11	61	—

En la última columna de la tabla puede observarse en qué medida la proteína activa se ha concentrado, por el fraccionamiento, con respecto al plasma original. Cuanto más fuerte sea en una fracción la concentración de la proteína activa, tanto menor es, naturalmente, la dosis que hay que aplicar para conseguir un determinado efecto. Las aplicaciones de las globulinas inmunes requieren una concentración mayor que la que se consigue por su mero aislamiento; se insistió, por consiguiente, en su purificación de un modo especial hasta que se obtuvieron concentrados de γ -globulina, que no sólo aparecían casi completamente exentos de otras proteínas del suero y constituidos en un 98 por 100 por γ -globulina (véase la tabla), sino que estaban tan condensados que con muy pequeñas dosis protegían perfectamente del sarampión [véase pág. 54; obsérvese también el diagrama electroforético inferior de la figura 3 y la publicación de J. W. WILLIAMS y colaboradores (1944)]. También resultó singularmente útil la separación de la isohemaglutinina (fracción III-1) de las globulinas inmunes (fracción II), ya que permitió la inyección intravenosa de grandes cantidades de anticuerpos protectores, sin que fueran de temer las perturbaciones que ocasionaba la inyección intravenosa de la misma cantidad de anticuerpos en forma de suero en el caso de que las isohemaglutininas del donante reaccionaran con los eritrocitos del receptor. Con respecto a las aplicaciones terapéuticas de la fracción V (albúmina) (que, por otra parte, se consignan en el esquema) y de la

fracción I (como hemostático en las quemaduras, etc.), no podemos extendernos aquí porque no pertenecen al tema; pueden consultarse los trabajos que se citan en el texto de E. J. COHN y colaboradores.

Los datos de la tabla 2.^a se refieren a una mezcla de plasma procedente de humanos adultos y normales; hay que tener en cuenta que el fraccionamiento se efectuó por la adición graduada de disoluciones salinas (sulfato amónico) y que la ulterior subdivisión y purificación de las fracciones tiene que ocasionar pérdidas; para comprobar la pureza y composición de las fracciones, se aplicó principalmente la electroforesis. La composición y caracteres electroforéticos de los componentes del plasma de las distintas especies de mamíferos varía entre ciertos límites; por ejemplo, el plasma de ganado vacuno contiene, por término medio (calculado con respecto al total de proteínas), 18 por 100 de fibrinógeno, 18 por 100 de γ -globulina, 8 por 100 de β -globulina, 16 por 100 de α -globulina y 40 por 100 de albúmina, mientras que los valores correspondientes para el plasma sanguíneo humano son 6, 12, 13, 7 y 62 por 100, según el promedio de determinaciones efectuadas por análisis electroforético directo. El suero de caballo normal (24 por 100 de γ , 21 por 100 de β , 13 por 100 de α -globulina y 42 por 100 de albúmina) difiere manifiestamente del suero humano normal, que contiene 13 por 100 de γ , 14 por 100 de β , 7 por 100 de α -globulina y 66 por 100 de albúmina. Incluso pueden producirse desviaciones en animales normales de la misma especie, como observaron en conejos mediante mediciones precisas D. G. SHARP, A. R. TAYLOR, D. BEARD y J. W. BEARD (1942). Acerca del comportamiento individual del plasma y del suero humano en condiciones normales y patológicas véanse págs. 43 y ss.

VI. EL FRACCIONAMIENTO POR ELECTROFORESIS DE LAS PROTEÍNAS TOTALES DE SUEROS INMUNES CON ANTICUERPOS, SEGÚN TISELIUS

La proporción de los anticuerpos contenidos en las diversas fracciones de globulinas separadas en los sueros normales por el procedimiento electroforético de TISELIUS se completa con los datos obtenidos por la electroforesis de diferentes sueros inmunes y de anticuerpos purificados; de los resultados experimentales se deduce que hay que distinguir dos tipos generales de anticuerpos [A. TISELIUS y E. A. KABAT, A. M. PAPPENHEIMER, H. P. LUNDGREN y J. W. WILLIAMS (1940), N. FELL, K. G. STERN y R. T. COGHILL (1940), J. VAN DER SCHEER, BOHNEL, CRARKE y WYCKOFF (1942)]:

a) Los anticuerpos como γ -globulinas.

Los anticuerpos de este tipo presentan la misma velocidad de desplazamiento que la γ -globulina, pero no son idénticos a ella. La proporción entre la globulina inmune y la γ -globulina normal puede determinarse en este caso separando del suero inmune los anticuerpos por adsorción de éstos en el antígeno y comparando luego en el aparato de electroforesis las muestras adsorbidas con otras no sometidas a la adsorción; en la figura 5 se representa el diagrama electroforético

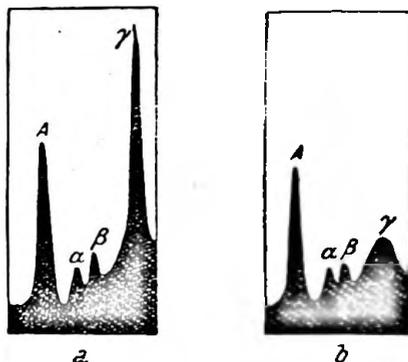


FIG. 5.ª Proteínas de un suero antineumocócico de caballo: a) antes de la adsorción; b) después de la adsorción por el polisacárido del neumococo. [A = albúmina; fracciones α , β , γ , de la globulina.]

obtenido por este procedimiento. Se observa que, en efecto, todos los anticuerpos se encuentran en la fracción γ , pero que ésta, además de ellos, contiene una cantidad mayor o menor de γ -globulina inespecífica. Cuanto más alto es el contenido en el suero de anticuerpos tanto más se altera, en favor de la globulina inmune, la proporción entre globulina inmune y γ -globulina inespecífica contenidas en la γ -globulina total (aislable electrofotéticamente) [A. TISELIUS y E. A. KABAT]. A este tipo pertenecen los anticuerpos del suero de conejo (y con pocas excepciones, los anticuerpos antibacterianos de los sueros inmunes de caballo).

b) Aislamiento por electroforesis de globulinas inmunes especiales.
El componente-T.

Estos anticuerpos se encuentran en una fracción de la globulina que se puede separar por electroforesis, fracción que no aparece en los sueros normales; se trata del llamado componente-T, que en los diagramas electroforéticos se encuentra entre las globulinas β y γ .

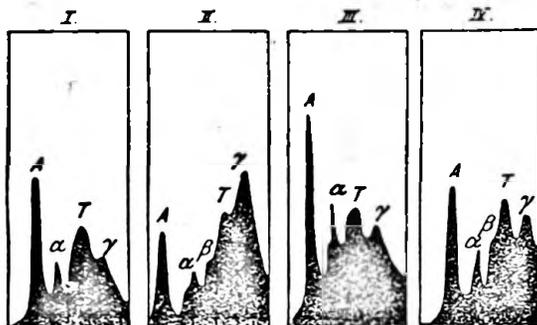


FIG. 6.* Diagramas electroforéticos de diferentes sueros antitóxicos de caballo [según VAN DER SCHEER, WYCKOFF y CLARCK (1940)]. I. Suero tetánico antitóxico. II. Suero diftérico antitóxico. III. Suero escarlatinoso antitóxico. IV. Suero antitóxico contra el Cl. Welchii.

El componente-T puede estar constituido exclusivamente por los anticuerpos, en cuyo caso desaparece por completo del diagrama cuando los antisueros se agitan con una cantidad apropiada de antígeno [A. TISELIUS y E. A. KABAT]. Tal es el caso en los *sueros inmunes antitóxicos de caballo*, sueros que contienen el componente-T [J. VAN DER SCHEER, R. W. G. WYCKOFF y F. H. CLARCK (1940)]; este componente, por el contrario, suele faltar en los sueros inmunes antibacterianos de caballo. No siempre se acusan claramente las cimas que señalan los componentes β , γ y T (véase los diagramas de la figura 5), y la causa pudiera ser que, para inmunizar los caballos, se hubieran utilizado substratos que contuviesen varios antígenos, debido a lo cual se hayan producido a la vez anticuerpos antibacterianos y antitóxicos, es decir, γ -globulina inmune y componente-T [VAN DER SCHEER, WYCKOFF y CLARCK]. Pero también es posible que la antitoxina no esté siempre contenida de modo exclusivo en el componente-T, sino que pueda aparecer distribuida entre varias fracciones de las globulinas; dicho de otro modo, las moléculas de antitoxina de un mismo

suero inmune de caballo tal vez no tengan todas igual velocidad de desplazamiento; ésta pudiera ser la causa de que la antitoxina no sólo se encuentre en el componente-T, sino también en la fracción γ .

Es de suponer que las diferencias en el comportamiento electroforético que se observan entre las moléculas de antitoxina, y que acaban de mencionarse, están combinadas con variaciones en otras propiedades, variaciones que incluso pueden ser causa o efecto de las primeras. Por ejemplo, R. A. KERWICK y B. R. RECORD (1941 a) encuentran en sueros diftéricos antitóxicos de caballo dos tipos de antitoxina que se desplazan, respectivamente, con las globulinas β y γ ; pueden separarse entre sí por electroforesis y muestran distinta velocidad de floculación *in vitro*, dando lugar a floculos de toxina-antitoxina de composición diferente, a saber: los floculos obtenidos con la γ -globulina contienen por unidad de floculación el doble de nitrógeno que los obtenidos con la β -globulina. Según las investigaciones de los autores citados, en los procesos de inmunización los caballos reaccionan, produciendo primero γ -globulina inmune y después, en proporción creciente, la β -globulina inmune; la concentración de la primera no se eleva entretanto al mismo ritmo, sino que se mantiene en un nivel relativamente bajo (50-100 unidades de floculación por ml.). Como la γ -globulina inmune se combina *in vitro* con la toxina más rápidamente que la β , parece ofrecer más ventajas que ésta para la aplicación terapéutica. A consecuencia del proceso descrito, el diagrama electroforético cambiará en el curso de la inmunización de los caballos con toxina o toxoide diftérico. Tales variaciones se han observado también en la inmunización con otros antígenos, y parecen corroborar la antigua concepción de que los anticuerpos circulantes por la sangre sufren, durante el proceso de inmunización, no sólo variaciones cuantitativas (elevación de la concentración), sino también modificaciones cualitativas (en especial extienden su capacidad de reaccionar hacia antígenos parecidos) (véase pág. 55). Sin embargo, este capítulo de la investigación de la inmunidad no está aún suficientemente explorado ni fenológicamente ni con respecto al análisis electroforético (véase la exposición de H. P. TREFFERS en *Handbook of Medical Physics*).

El componente-T de los sueros antitóxicos de caballo no es la única globulina caracterizada electroforéticamente que no existe en los sueros normales correspondientes y que por ello debe considerarse como un producto patológico. E. SANDERS, I. F. HUDDLESON y P. J. SCHAIBLE encuentran en el suero y plasma de gallinas que padecen diferentes formas de leucosis (linfomatosis, neurolinfomatosis, etc.)

una globulina anormal que designan como componente L. Supone el 10 por 100 de las proteínas totales, y no siempre posee en el diagrama electroforético una cumbre propia, ya que en ocasiones se desplaza con la globulina γ . En la sangre de gallinas, a las que se inyectó un producto tumoral activo, aparece el componente L a los tres días, y en la inmunización con producto inactivo, a los quince. Los autores citados consideran el componente L como un anticuerpo.

Hay que mencionar finalmente una breve comunicación de MACHERSON, MOORE y LONGWORTH, de la que se deduce que la composición electroforética de las proteínas puede variar con el tiempo. La albúmina cristalizada de huevos de gallina consta de dos componentes electroforéticos, A_1 y A_2 ; si se la conserva en forma de polvo o en disolución isoelectrica exenta de sales, cambia su diagrama electroforético, perdiendo paulatinamente componente A_1 y ganando en A_2 , hasta que al cabo de un año está constituida, en general, únicamente por este último. Aun no se ha investigado sistemáticamente la frecuencia con que se dan fenómenos de envejecimiento de este tipo ni los errores a que puedan haber dado lugar.

VII. EXAMEN ELECTROFORÉTICO DE LAS ALTERACIONES QUE EXPERIMENTAN LAS GLOBULINAS INMUNES POR DIFERENTES AGENTES

Los diagramas electroforéticos acusan algunas de las alteraciones que experimentan las fracciones de globulina de los sueros inmunes cuando éstos se someten a determinados tratamientos. Si paralelamente al diagrama se transformara también la manera de reaccionar de los sueros inmunes, podría conseguirse la demostración de que los anticuerpos poseen carácter de globulina; el examen de la transformación experimentada por el diagrama electroforético puede orientar (aunque en grado muy restringido) acerca de la causa inmediata que ha modificado la manera de reaccionar el suero inmune. A continuación se exponen con algún detalle los resultados de tales investigaciones.

a) *La digestión péptica de los sueros de caballo antitóxicos.*—El examen electroforético de los sueros de caballos inmunizados con toxinas demuestra la presencia de una fracción de globulina que no existe en los sueros normales; se conoce con el nombre de componente-T y contiene la antitoxina, en su totalidad o en parte (véase página 32). Si tales sueros inmunes se someten a una digestión parcial con pepsina, conservan su efecto antitóxico, pero se "desespe-

cian", es decir, pierden en parte su capacidad de funcionar como antígenos proteicos específicos (consúltese pág. 57). En el diagrama electroforético de los sueros digeridos no aparece ya el componente-T con una cima especial. Se ha desplazado hacia la globulina γ y al cabo de media hora de digestión ocupó totalmente el lugar de ésta [J. VAN DER SCHEER y R. W. G. WYCKOFF (1940)].

Simultáneamente se produce una simplificación del espectro electroforético por eliminarse, más o menos por entero, la albúmina y la globulina que posee mayor velocidad de desplazamiento (α -globulina) [VAN DER SCHEER y WYCKOFF (1940), N. FELL, K. G. STERN y R. D. COGHILL (1940)]. Estos descubrimientos que se presentan en la figura 7 pueden relacionarse con las propiedades de los sueros antitóxicos desespeciados.

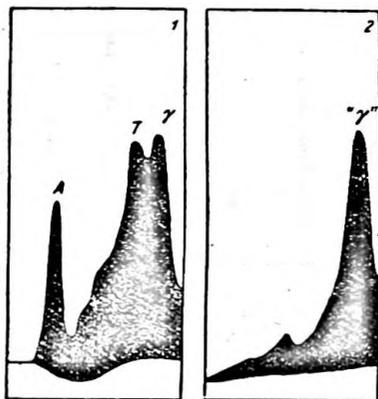


FIG. 7.º Diagrama electroforético de un suero diftérico antitóxico de caballo: 1, sin digerir; 2, después de digerido con pepsina durante cien horas [según J. van der SCHEER y R. W. G. WYCKOFF, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 45, 635 (1940)].

b) También se ha estudiado el efecto del calor sobre el diagrama electroforético de los sueros inmunes de caballo, especialmente por VAN DER SCHEER, WYCKOFF y CLARKE (1941 b). Para este fin parece necesario investigar primeramente el comportamiento de los sueros normales de la misma procedencia. Se observa que basta calentar durante quince minutos, a 65-70° (en amortiguador de fosfato 0,02 mol. a pH 7,6 y 0,15 mol. en NaCl) para dar lugar a la aparición de un nuevo componente-C a costa de la albúmina, cuya cima se rebaja, y de las globulinas más rápidas α y β ; acaban por no apa-

recer en el diagrama sino las cimas de la albúmina, de la γ -globulina y el alto pico del componente-C (véase figura 8), que aunque electroforéticamente se comporte como homogéneo, no lo es de hecho. En cambio, cuando el suero normal de caballo se calienta sólo a 50-60°, a los quince minutos sigue sin aparecer el componente-C, cuya débil iniciación no se observa sino a la media hora; se trata, probablemente, de un producto de agregación coloidal, que se produce por desnaturalización de las proteínas del suero.



FIG. 8.ª Diagrama electroforético de un suero de caballo normal: 1, sin calentar; 2, calentado durante quince minutos a 65° (según J. van der SCHEER, R. W. G. WYCKOFF y F. L. CLARKE, *Jour. of Immn.*, 40, 40, 1941).

Los sueros antitóxicos de caballo (antitoxina tetánica) se comportan de modo análogo a los sueros normales de caballo, y también forman un tipo de componente-C a costa de la cantidad de albúmina, globulina- γ y componente-T. El hecho de que ni el componente-T ni la globulina- γ desaparezcan por completo concuerda con el hecho de que la actividad antitóxica de tales sueros no sufra mucho por los métodos usuales de pasteurización [D. H. MOORE, VAN DER SCHEER y WYCKOFF (1940)]. La cima de la γ -globulina desaparece y nace la del componente-C, de lo que, sin embargo, no puede deducirse la identidad de ambas fracciones (MOORE, VAN DEL SCHEER y WYCKOFF).

Los anticuerpos bacterianos son más sensibles que las antitoxinas. En los antisueros neumocócicos de caballo desaparece casi por com-

pleto, al cabo de quince minutos de calefacción, la globulina- γ , que es el soporte de la función anticuerpo [VAN DEL SCHEER, WYCKOFF y CLARKE (1941 b), MOORE, VAN DER SCHEER y WYCKOFF (1940), L. E. KREJCI, L. DE SPAIN-SMITH y T. J. DIETZ (1941)].

c) *Los antisueros aglutinantes o precipitantes de conejo pierden por foto-oxidación* (conseguida por la adición de un colorante sensibilizador, por ejemplo eosina hidrosoluble, e irradiación ulterior) *el efecto floculante* al que deben su nombre, si bien conservan los anticuerpos con su capacidad de combinarse con el antígeno [A. TYLER (1945 a)]. Por el mismo procedimiento puede reducirse en mayor o menor grado, según la intensidad de la irradiación, la capacidad de los sueros antineumocócicos de conejo de volver anafiláctico, por vía pasiva, al cobayo [A. TYLER (1945 b)].

El diagrama electroforético de los sueros foto-oxidados (véase la figura 9) acusa una homogeneización, como en todos los tratamientos que desnaturalizan los sueros; el número de las cimas que corresponden a las distintas fracciones de globulinas se reduce a dos, a la vez que tales cimas experimentan un ensanchamiento; simultáneamente, las masas de globulina se corren hacia la albúmina por aumentar su velocidad de desplazamiento [H. SMETANA y D. SHEMIN (1941), A. TYLER y St. M. SWINGLE (1945)]. TYLER (1945 a) cree que de sus investigaciones puede sacarse la conclusión de que la foto-oxidación transforma los anticuerpos bi o plurivalentes en monovalentes, y que esta transformación es lo que origina la pérdida de la capacidad precipitante (floculante); de aquí puede sacarse un argumento en

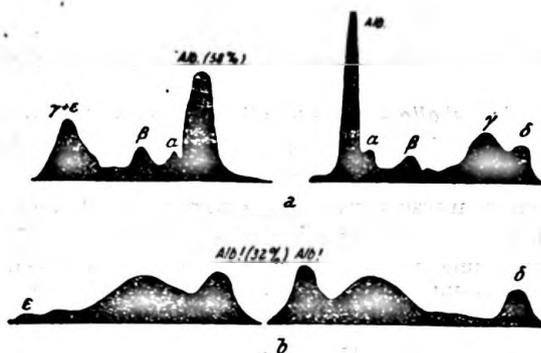


FIG. 9.º Diagrama electroforético que representa el efecto de la foto-oxidación (según A. TYLER y St. M. SWINGLE). A) Suero testigo: suero antineumocócico (contra el tífus I) de conejo. B) El mismo suero después de intensa foto-oxidación.

favor de la llamada teoría "reticular" — *Gittertheorie* — (hipótesis de la plurivalencia mutua entre antígenos y anticuerpos, véase pág. 223). W. C. BOYD (1946) comprueba que los sueros isoaglutinantes también pierden paulatinamente por foto-oxidación su capacidad de aglutinar, pero considera problemática la hipótesis de TYLER; este autor se apoya en experimentos propios, según los cuales, por foto-oxidación, pueden transformarse anticuerpos precipitantes en anticuerpos bioqueadores (inhibidores); pero BOYD no pudo reproducir este fenómeno en sus experimentos con isoaglutininas.

La *antitoxina diftérica de caballo* pierde, a consecuencia de la foto-oxidación, su efecto floculante, pero conserva en su mayor parte su capacidad de neutralización, incluso cuando se intensifica dicho tratamiento. TYLER y SWINGLE deducen de ello que para la neutralización de la toxina bastan anticuerpos "monovalentes". También habla en favor de que las antitoxinas sean más estables que otros anticuerpos su resistencia a otros agentes, que con mucha probabilidad actúan de forma completamente distinta que la foto-oxidación.

d) El suero normal de caballo se desespeciea por irradiación con luz ultravioleta, de modo cuantitativo, reduciéndose la actividad antigénica, según la intensidad de la radiación, hasta 1/50 — 1/20.000 del valor inicial: también se desespeciea en sentido cualitativo, ya que su especificidad se modifica [J. P. HENRY (1942)].

Con respecto al examen electroforético de sueros irradiados con luz ultravioleta consúltese W. D. DAVIS, A. HOLLÄNDER y J. P. GREENSTEIN (1942).

VIII. EL PESO MOLECULAR DE LAS GLOBULINAS INMUNES

a) *El tipo de caballo.*—La globulina inmune del suero inmune, antibacteriano, de caballo ofrece, una vez aislada electroforéticamente, un peso molecular extraordinariamente alto; asciende, según determinaciones en la ultracentrífuga, a 930.000 (A. TISELIUS y E. A. KABAT). Sería posible separar directamente, por centrifugación, de un suero inmune una proteína tan pesada, y, en efecto, diversos autores han emprendido su aislamiento por este método, que antes aplicó en parte TISELIUS [J. BISCOE, F. HERCIK y R. W. G. WYCKOFF, M. HEIDELBERGER y K. O. PEDERSEN, E. A. KABAT y PEERSEN, J. Van der SCHEER, J. B. LAGSDIN y R. W. G. WYCKOFF]. Los pesos moleculares de los preparados obtenidos por este procedimiento directo coinciden aproximadamente con los de la globulina

inmune aislada electroforéticamente. También se han obtenido de los sueros vacuno y porcino globulinas inmunes de un peso molecular tan alto como las de caballo [A. TISELIUS y KABAT, E. A. KABAT (1939)]. De la relación entre los pesos moleculares de las globulinas γ de caballo y de la globulina inmune del suero antineumocócico de la misma especie, H. P. TREFERS, D. H. MOORE y M. HEIDELBERGER deducen que la globulina inmune pesada pudiera ser un hexámero de la γ -globulina normal, opinión que apoya el hecho de que la γ -globulina normal sólo precipita una parte de los anticuerpos que se obtienen por la inmunización de cobayos con la inmundoglobulina pesada.

b) *El tipo de conejo.*—En un segundo grupo, al que pertenecen además de los conejos los monos y los hombres, se incluyen las proteínas serológicas portadoras de anticuerpo que se comportan como la γ -globulina normal no sólo electroforéticamente, sino también con respecto al peso molecular (157.000-160.000); es decir, que pertenecen a la fracción de globulinas del suero de menor velocidad de desplazamiento [A. TISELIUS y E. A. KABAT, E. A. KABAT (1939)].

Esta regla se extiende, probablemente, no sólo a los anticuerpos bacterianos en sentido estricto, sino a los anticuerpos contra antígenos de otra procedencia. Las globulinas inmunes pesadas se encontraron por primera vez en los sueros antineumocócicos de caballo, cuya comparación con las globulinas análogas de los sueros inmunes de conejo acusó la diferencia del peso molecular. Para el objeto que persiguen estas investigaciones convendría no inmunizar con antígenos arbitrarios los caballos que se dediquen a estos estudios teóricos; por no tenerse esto en cuenta apenas es posible enjuiciar con conocimiento de causa la *frecuencia con que se presentan las excepciones.*

Las hemolisinas de carnero pueden, por ejemplo, separarse en la ultracentrífuga de los sueros inmunes de conejo y su constante de sedimentación se aproxima mucho a la de la globulina inmune pesada del caballo [M. PAIC (1938), A. GRATIA y L. GORECZKY]; las reagentes sífilíticas del suero humano poseen también un peso molecular parecido [V. DEUTSCH y J. LOMINSKI, V. DEUTSCH, M. PAICK (1939)]. Por otra parte, la antitoxina diftérica de caballo sólo alcanza un peso molecular de 180.000 [M. L. PETERMANN y A. M. PAPPENHEIMER (1941 b), A. ROTHEN (1941-42)]. También se ha observado que un mismo anticuerpo, como el dirigido contra el neumococo en una misma especie animal (caballo), puede existir en formas de distinto peso molecular [PETERMANN y PAPPENHEIMER (1941 a), E. A. KABAT (1939), TISELIUS y KABAT (1939)], de modo que con globulinas inmunes pesadas pueden coexistir otras de peso molecular análogo al de las globulinas normales (véase pág. 55).

En este respecto sólo se conoce, hasta la fecha, una regla sin excepción: *los anticuerpos son siempre globulinas, nunca albúminas*. Esta regla se extiende también a sustancias del tipo de los anticuerpos, pero que no pueden identificarse en todas sus características con los anticuerpos genuinos, como, por ejemplo, las reactivinas del suero de los sífilíticos y las de los sueros de los individuos alérgicos, con auxilio de las cuales puede transmitirse la reactividad a la piel de hombres normales [J. M. NEWELL, A. STERLING, OXMAN, BURDEN y KREJCI].

IX. MODIFICACIONES EN LAS CANTIDADES DE LAS PROTEÍNAS DEL SUERO EN LA INMUNIZACIÓN CON ANTÍGENOS MUERTOS

Existe una vasta literatura sobre los desplazamientos cuantitativos que experimentan las proteínas del suero durante los procesos de inmunización. Como antígenos inmunizadores se han utilizado toxinas o bacterias muertas, y, después, principalmente "antígenos proteicos", sobre todo sueros de especies extrañas. El planteamiento de los experimentos, así como los métodos elegidos para la determinación cuantitativa de las proteínas y para el fraccionamiento de las proteínas del suero varían casi con cada autor, por lo que no es de extrañar que los resultados difieran en muchos aspectos. La suma de resultados puede resumirse en las siguientes conclusiones: 1, *aumenta la cantidad de proteínas totales, así como la de globulinas (hiperproteinemia e hiperglobulinemia), y la subida no se produce inmediatamente después de administrar por vía venosa el antígeno, sino tras un período de latencia de varios días*; 2, *el aumento de globulinas va acompañado de una disminución de albúminas; más tarde, cuando las globulinas vuelven a su nivel normal, puede, a su vez, subir el nivel de las albúminas* (W. BERGER), y 3, *si tras una primera inyección intravenosa de antígeno, y después de un cierto tiempo, se repite la inyección, la curva de globulinas alcanza valores más altos que los conseguidos por una única administración de antígeno*.

El hecho de que el aumento de globulinas transcurra simultáneamente con la disminución de albúminas pudiera significar que la albúmina del plasma sanguíneo se transformase en globulina, dentro de la sangre en circulación (hipótesis de MOLLE). De esta opinión se apartan, sin embargo, R. DOERR y W. BERGER (1922 a) [véase también BERGER], que apoyaron en investigaciones propias su conclusión de *que los cambios cuantitativos de las proteínas del suero y de sus fracciones deben concebirse como fenómenos celulares en los que los*

antígenos proteicos administrados parenteralmente funcionan como *estimulantes patológicos* que desencadenan reacciones celulares que se manifiestan en los componentes proteicos de la sangre; como lugar de actuación del estimulante se señalan las "células madres de las proteínas del suero". DOERR y BERGER apoyan su opinión en el hecho de que los cambios en los componentes proteicos del suero sólo se aprecien tras una larga incubación, lo que parece hablar en contra de una transformación de la albúmina en globulina, así como en la observación de que se puedan mantener durante meses las desviaciones de las proteínas del suero consecuentes a una sola inyección de antígeno; tal persistencia no puede atribuirse a una pura reacción humoral. En lo fundamental, este punto de vista concuerda con las teorías generales. Sin embargo, DOERR y BERGER no dedujeron que el aumento de globulinas fuera la expresión inmediata de la formación de anticuerpos. Por dos razones. En primer lugar, la tesis de que los anticuerpos fueran seroglobulinas no parecía de ningún modo probable *a priori*, por lo que debía exigirse una prueba convincente antes de reconocerla como la solución justa del problema de los anticuerpos; esta prueba no existía en aquel tiempo.

Por otra parte, se hacían objeciones a las que no contestaban las afirmaciones sobre la relación entre la hiperproteinemia o hiperglobulinemia y los anticuerpos encontrados en el suero sanguíneo. Tan pronto se observaba que el aumento de proteínas precedía a la aparición de los anticuerpos como daba resultado positivo la investigación de los anticuerpos antes de producirse la hiperproteinemia. En todo caso no parecía existir nunca un paralelismo cuantitativo. Y no podía resultar de otro modo porque, como sabemos ahora, ni las proteínas totales del suero, ni las globulinas totales, poseen actividad de anticuerpo sino sólo una parte de las globulinas, las "globulinas inmunes". Este hecho no podía precisarse con los métodos analíticos que se aplicaban entonces. Hasta la introducción de los nuevos métodos de fraccionamiento de A. TISELIUS, la marcha del proceso no se investigaba más que analizando en muestras sucesivas de suero por una parte el título en anticuerpos y por otra la concentración de las proteínas totales o de las globulinas, y todo lo más de las eu- y pseudoglobulinas por separado; lo que es insuficiente.

En los últimos años se ha tenido en cuenta esta objeción, como demuestran especialmente las publicaciones de M. BJORNEBOE (1939, 1943).

Este autor utiliza en sus experimentos solamente conejos, animal en el que las globulinas inmunes sólo se distinguen de las globulinas y del suero normal por su función de anticuerpo. Como antígenos utilizó neumococos muertos con formol o salmonelas muertas; en ambos casos, mezclas de diferentes tipos serológicos (en los neumococos mezcló los tipos 6, 9, 11, 13, 15, 17, 22 y 23, y en las salmonelas ocho tipos que diferían principalmente por sus antígenos O). Prefirió usar antígenos de esta complejidad porque se había observado que con ellos la producción de proteínas inmunes resulta mucho más intensa que cuando se emplea un único antígeno. Los antígenos se administraron intravenosamente cada dos días; a intervalos convenientes se sangró siempre un conejo en cuyo suero se determinó: 1, las proteínas totales; 2, las globulinas totales (método de V. HENRIQUES y U. KLAUSEN); 3, la albúmina (restando la

globulina total de la proteína total), y 4, las globulinas inmunes (según HEIDELBERGER y KABAT, por precipitación con un exceso de antígeno, centrifugación y determinación del nitrógeno en el sedimento, teniendo en cuenta el contenido en nitrógeno del antígeno).

Si bien la determinación de proteínas se efectuó por una determinación de N y multiplicación del resultado por el factor 6,25, los resultados fueron muy regulares y coincidieron, prescindiendo de pocas desviaciones, en los siguientes puntos:

1. El contenido de globulinas comienza a crecer, de pronto, a los ocho-nueve días y alcanza rápidamente una concentración 5-7 veces la normal, que se sostiene en este máximo, con pocas oscilaciones, durante toda la inmunización forzada que se mantuvo durante más de un mes.

2. Las proteínas con función de anticuerpo (globulinas inmunes) siguen las oscilaciones de la concentración de globulinas totales manteniendo una distancia casi constante. La proporción entre ambos valores podía expresarse por la fórmula: concentración de las globulinas $\div 1,3 =$ concentración de anticuerpos; y como el valor 1,3 corresponde a la concentración de globulinas en el suero normal de conejo, debe aceptarse que la producción de anticuerpos consiste en su totalidad la formación de una globulina "extra" (globulina inmune).

3. A la elevación del nivel de las globulinas corresponde una disminución de la concentración de la albúmina, y también, según BJORNEBOE, en una relación cuantitativa; para conejos jóvenes la fórmula es: $2,45 \times \text{albúmina} + \text{globulina} = 11,88$; y para los adultos: $3,11 \times \text{albúmina} + \text{globulina} = 16,23$. BJORNEBOE atribuye a este comportamiento de la albúmina el papel de un mecanismo regulador que mantiene en el valor conveniente la presión coloidosmótica del plasma; pero no puede localizar dónde radica este mecanismo de regulación. BJORNEBOE no afirma explícitamente la transformación humoral de la albúmina en globulina.

En unos experimentos en que se emplearon como antígeno mezclas de varios sueros de especies extrañas (caballo, oveja y vaca) sólo se consiguieron resultados en dos de diez conejos porque no pudo ponerse en claro, debido a la seroglobulina inyectada, la cantidad formada de globulinas nuevas. En esta serie de experimentos no se determinaron las proteínas con función de anticuerpo (globulinas inmunes).

No tuvo aceptación general el segundo punto de las conclusiones arriba expuestas, a saber: que el aumento de las globulinas totales del suero inmune debe referirse a la producción de globulina inmune; algu-

nos autores observaron que el incremento de globulinas es considerablemente más elevado que el aumento de la concentración de los anticuerpos reactivos [W. C. BOYD y H. BERNARD, J. R. MARRACK, J. van der SCHEER (1938), BOHNEL, CLARKE y WYCKOFF (1942)]. Se han expuesto diversas hipótesis para explicar esta diferencia; por ejemplo, que hay globulinas inmunes que, en cierto sentido, son "in-hábiles", es decir, que no poseen la capacidad de fijar el antígeno *in vitro* [A. M. PAPPENHEIMER, H. P. LUNDGREN y J. W. WILLIAMS; véase también la página 71], e incluso se ha llegado a afirmar que no hay ninguna globulina normal, sino que toda la proteína del suero que no es albúmina debe considerarse como anticuerpo [W. C. BOYD y H. BERNARD]. No son necesarias tales combinaciones, ya que después de una inyección de un antígeno se altera también la proporción de otros componentes de la sangre, tanto disueltos como celulares, como ya demostraron DOERR y W. BERGER (1929 a).

X. RELACIONES, DEDUCIDAS DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO, ENTRE LOS SUEROS INMUNES QUE CONTIENEN ANTICUERPO Y ALGUNOS SUEROS PATOLÓGICOS DE OTRA ETIOLOGÍA

El modo de concebir la producción de las globulinas inmunes como una reacción patológica de los tejidos ante el estímulo del antígeno, con formación de ciertas proteínas del plasma y compensación de la formación de éstas, había de sugerir forzosamente que estímulos de otro tipo podían ocasionar análogos efectos y que del examen de los diagramas electroforéticos sería posible sacar conclusiones de las alteraciones que los provocaron. Estas esperanzas se han cumplido en cierta medida, e incluso muchos autores se inclinan a opinar que "la introducción de la electroforesis en la medicina clínica tiene un valor equivalente al de la electrocardiografía" [F. WUHRMAN y Ch. WUNDERLY].

Como sucede en la investigación de los sueros inmunes que contienen anticuerpos, para apreciar los hallazgos electroforéticos que puedan hacerse en sueros patológicos de otra índole, hay que apoyarse en el conocimiento de los datos del suero normal con su desviación típica. Numerosos autores se han ocupado especialmente en establecer la imagen electroforética del plasma y del suero sanguíneos del hombre normal [L. G. LONWORTH, Th. SHEDLOVSKY y D. A. McINNES, R. A. KEKWICK, J. A. LUETSCHER, D. H. MOORE y J. LYNN, H. L. TAYLOR y A. KEYS, V. P. DOLE, E. J. COHN, J. L. ONCLEY, L. E. STRONG, V. L. HUGHES y S. H. ARMSTRONG, E. WIEDEMANN y otros], con el fin de establecer la base en que apoyar el enjuiciamiento de los resultados que

se encuentren en sueros patológicos. Sin entrar en aquellas particularidades que no estén en relación directa con las cuestiones aquí planteadas, debe hacerse notar que aunque en los sueros normales se observan desviaciones, éstas no son muy considerables; que se aprecian siempre bien las cimas de la albúmina y de las globulinas α , β y γ , y que el tanto por ciento de estas fracciones, calculadas según los diagramas, varía poco de unos individuos a otros. Dos muestras de suero de una misma persona tomadas con un intervalo de medio año dieron los siguientes valores, según datos de E. WIEDEMANN (1945):

I. 70,1 por 100 de albúmina, 5,9 por 100 de α -globulina, 9,1 por 100 de β -globulina, 14,8 por 100 de γ -globulina.

II. 70,1 por 100 de albúmina, 4,7 por 100 de α -globulina, 10,6 por 100 de β -globulina, 14,6 por 100 de γ -globulina.

Las *desviaciones patológicas* se caracterizan en general por un *aumento de las globulinas*, que implica, a su vez, una *reducción de las albúminas*. F. WUHRMANN y Ch. WUNDERLY (1945, 1946) conciben la reducción de las albúminas como un proceso regulador para mantener constante la presión coloidosmótica del plasma sanguíneo; por ello se explica que no pueda observarse, según los datos de los autores citados, un aumento absoluto de la albúmina. Haciendo abstracción de las consideraciones hipotéticas, hay que señalar fenómenos análogos a los implicados en la formación de anticuerpos que estudiaron primeramente DOERR y W. BERGER, W. BERGER y, con mejor técnica, M. BJORNEBOE (véase pág. 41). Además, la coincidencia no se limita sólo al aumento de la cantidad de globulinas combinado con la disminución de albúminas, sino que alcanza también, en parte, a la *localización del aumento de globulinas en el diagrama electroforético*. Vimos que los anticuerpos se comportan electroforéticamente como si fueran globulinas γ producidas en exceso; en muchos casos también como globulinas β o como el componente-T, que se intercala por su velocidad de desplazamiento entre las globulinas β y γ ; en cambio, la globulina α , durante el proceso de la inmunización, suele permanecer sin modificación apreciable, de modo que no manifiesta funciones de anticuerpo. *En los diagramas electroforéticos aparece, pues, como zona favorecida el espacio que abarcan las crestas de la β y de la γ -globulinas*. Dentro de este espacio, la localización puede estar mejor determinada, por ejemplo, en la γ -globulina; pero también un solo anticuerpo, en el mismo suero, puede estar más espaciado, como sucede, por ejemplo, con la antitoxina diftérica en los sueros inmunes de caballo (véase pág. 33). De modo análogo, aunque no absolutamente idéntico, se comportan algunos sueros patológicos de distinta procedencia. Ofrecen particular interés las desviaciones extremas que se han establecido en el *mieloma múltiple (plasmocitoma)*, enferme-

dad que se caracteriza por la aparición de tumores neoplásicos en la médula ósea, en los cuales pueden descubrirse, como elementos característicos, las células del mieloma. En el mieloma pueden aparecer extraordinariamente aumentadas las concentraciones de las globulinas β o γ (hasta el 70-80 por 100), mientras se reducen proporcionalmente las restantes fracciones de globulina y la albúmina [R. A. KERWICK, E. WIDEMANN (1945), F. WUHRMANN y Ch. WUNDERLY (1945), S. SHAPIRO, V. ROSS y H. D. MOORE]; en los casos investigados por SHAPIRO y colaboradores aparecía intercalada entre las globulinas α y γ una globulina extra.

¿Dónde encontrar un nexo que explique estas coincidencias? Las alteraciones expresadas se han encontrado en procesos patológicos tan diversos como son, por ejemplo, la cirrosis hepática de LAENNEC, el linfogranuloma inguinal, las nefrosis, las afecciones hepáticas por el *Echinococcus alveolaris*, los mielomas múltiples, las ictericias obstructivas, la acrodermitis atrófica y la formación natural, o inducida de un modo cualquiera, de un anticuerpo [L. G. LONGWORTH, Th. SHEDLOVSKY y McINNES, J. A. LUETSCHER, E. WIEDEMANN, F. WUHRMANN y Ch. WUNDERLY (1943, 1945, 1946)]; por consiguiente, puede llegarse a la conclusión de que el metabolismo proteico o, de modo más preciso, la fase de este metabolismo que aparece reflejada en el espectro proteico del plasma sanguíneo, puede desplazarse de su equilibrio por procesos muy diversos, todos los cuales, por razones fisiológicas, lo alteran en una misma dirección independientemente de la causa que los produce; tales alteraciones conciernen principalmente a las globulinas más lábiles, de mayor peso molecular y menos solubles.

Este punto de vista significaría que las globulinas especiales producidas en exceso, aunque pueden funcionar como anticuerpos, no lo son siempre forzosamente. En los sueros inmunes los anticuerpos pueden demostrarse fácilmente *in vitro* incluidos en las globulinas producidas en cantidad anormal, demostración que también se logrará probablemente en las leucosis de las gallinas (véase pág. 33). Las relaciones entre las leucosis de las gallinas y los mielomas múltiples justifican, en cierto sentido, la opinión de que en las enfermedades humanas señaladas se forman globulinas emparentadas con los anticuerpos, y, si se quiere, pudiera extenderse esta concepción a todos aquellos casos en que un proceso infeccioso ocasiona alteraciones en las proteínas de la sangre; sin embargo, faltan pruebas seguras en que basar tal generalización. Finalmente quedan una serie de procesos patológicos que actúan sobre las globulinas del plasma y en los

cuales ni la especulación más libre puede encontrar un punto de apoyo que permita atribuir naturaleza de anticuerpo a las globulinas especiales que en ellos se forman en exceso. Queda, por consiguiente, sin contestar el problema de por qué una inmunización actúa sobre las globulinas del plasma de modo análogo a como lo hace toda una serie de otros procesos patológicos, y por qué aquélla es el único que da lugar a globulinas con carácter de anticuerpo; y en este problema está incluido el de los anticuerpos, cuyo origen aun no resuelto debe considerarse, como se señaló en otro lugar, en relación con el metabolismo proteico.

Las globulinas α , β y γ , aisladas por electroforesis, están constituidas, como las otras proteínas, por aminoácidos. La globulina γ del suero humano contiene, según E. BRAND, B. KASSEL y L. J. SEIDEL, 4,80 por 100 de arginina, 2,5 por 100 de histidina, 6,7 por 100 de lisina, 0,70 por 100 de cisteína, 6,75 por 100 de cistina, 1,06 por 100 de metionina, 2,86 por 100 de triptófano, 6,75 por 100 de tirosina, 11,4 por 100 de serina, 8,36 por 100 de treonina y 9,32 por 100 de leucina; es decir, al menos cinco de los ocho aminoácidos que, según W. C. ROSE, son indispensables para el mantenimiento del equilibrio del N. Además de aminoácidos, G. BLIX, A. TISELIUS y H. SVENSSON encontraron colesterol y fosfolipoides, que abundan especialmente en las fracciones α y β y menos en las globulinas γ ; parece que están ligados a las proteínas por enlaces lábiles, pero que no pueden soltarse ni por una electroforesis repetida. Del examen de los resultados analíticos reunidos hasta la fecha no se deduce ninguna diferencia entre las globulinas normales, las globulinas formadas en exceso en condiciones patológicas y las globulinas inmunes; no hay más carácter distintivo que la actuación como anticuerpos de estas últimas y la velocidad de desplazamiento en el campo eléctrico anormal en algunas (componentes L y T y desdoblamiento de la cresta β). Por consiguiente, no puede hablarse, al menos corrientemente, de "seroglobulinas patológicas"; *lo que caracteriza la desviación patológica del suero es la alteración de las proporciones normales de las seroproteínas, que consiste en un desplazamiento en el sentido de la albúmina hacia la γ -globulina (1).*

(1) Para comprender el alcance de esta afirmación hay que considerar que no es posible, según experiencias efectuadas en perros por G. H. WHIPPLE, provocar una hiperproteinemia por la inyección intravenosa de grandes cantidades de plasma de la misma especie, es decir, por vía puramente mecánica [R. M. FINK, ENNS, KIMBALL, SILBERSTEIN, BALE, MADDEN y G. H. WHIPPLE].

En las nefrosis y en las ictericias por obstrucción se han descubierto, sin embargo, β -globulinas muy cargadas de lipoides. En el diagrama electroforético de tales sueros puede observarse una cima alta de globulina β , cima que se reduce considerablemente después de extraer el suero con éter [LONGWORTH, SHEDLOVSKY y McINNES, LONGWORTH y McINNES (1940 b)]. No puede demostrarse que en estos casos la capacidad de fijar cantidades extraordinariamente altas de lipoides sea una propiedad anormal de la globulina β (peculiar de estas enfermedades), y, por consiguiente, hay que mantenerse en la aseveración provisional de que faltan argumentos convincentes para afirmar que en condiciones patológicas o en la inmunización se producen globulinas especiales que difieren química o serológicamente (por ejemplo, por su carácter antigénico) (véase pág. 72 de las normales).

Con las cuestiones que acaban de tratarse está relacionado el problema del lugar donde se producen las proteínas del plasma. Si siempre se producen las mismas globulinas, aunque en cantidades normales, subnormales o hipernormales, debe admitirse que en todos los casos el lugar de producción es el mismo. En los mielomas se perturba la formación de globulinas por las células mielomáticas [véase, entre otros, WUHRMAN y WUNDERLY (1945)]; pero no es probable que esta función sea exclusiva de la médula ósea. Las investigaciones de W. W. C. TOPLEY (1930), según las cuales el tejido de bazo de conejos previamente inyectados con bacterias da lugar a la formación de aglutininas en animales normales, indican la participación de dicho órgano; S. C. MADDEN y G. H. WHIPPLE atribuyen el papel principal al hígado (véase pág. 65) y de los experimentos de McMASTER

La causa radica en que el plasma excedente se elimina rápidamente del torrente circulatorio; en efecto, si a los perros se les inyecta, en lugar de plasma normal, plasma también de perro, pero que contiene proteínas marcadas (para lo cual se alimentan los donantes con un aminoácido, por ejemplo, lisina, cuyo nitrógeno sea N^{15}), puede observarse que la proteína así marcada desaparece rápidamente de la circulación del animal receptor (R. M. FINK y colaboradores). Si, por sustracción exhaustiva de plasma (plasmateresis) (véase pág. 7) se cambia la proporción normal de albúmina: globulina (2:1) en el valor recíproco, al cabo de una semana de alimentación adecuada se vuelve a la proporción original [R. L. HOLMAN, E. B. MAHONEY y G. H. WHIPPLE]. Según esto, si en el curso de la inmunización o por otro proceso patológico se observa una hiperproteinemia y un aumento de las globulinas a expensas de las albúminas, han debido de fallar, evidentemente, estos mecanismos reguladores normales y a la vez haberse alterado las proporciones en que se producen las distintas proteínas del suero.

y HUDAK, W. E. EHRICH y T. N. HARRIS, F. M. BURNER (1941) parece deducirse que también pueden producir anticuerpos los ganglios linfáticos (véase pág. 62); se han recogido numerosos datos sobre la formación local de anticuerpos, y, por consiguiente, de globulinas inmunes [OERSKOV y ANDERSEN, W. W. C. TOPLEY (1933), P. SÉDALLIAM, JOURDAN y CLAVEL, P. R. CANNON (1932) y otros], y, por tanto, parece evidente que no puede circunscribirse a un determinado órgano la formación de proteínas del suero y, en particular, de las globulinas, sino que esta función deben cumplirla determinadas células o tejidos muy extendidos en el organismo. Por último, no se ha demostrado que el desplazamiento de las cantidades de seroglobulinas que se observa en el mieloma múltiple deba atribuirse a la exaltación de la actividad de las células mielomáticas neoplásicas; dado que en los restantes casos en que no existen células tumorales, hay que atribuir a células normales tanto la formación de las proteínas normales del plasma como las desviaciones patológicas del mismo, parece probable que las alteraciones en el mieloma múltiple no dependan directamente de la función proteinógena de las células mielomáticas, sino que el tumor de la medula ósea influya sobre la actividad del tejido normal de la misma medula o sobre la de centros de producción alejados.

Los diagramas electroforéticos demuestran que en el mieloma múltiple se produce un fuerte incremento de la β o de la γ globulinas. ¿Se trata de un solo tipo de células o de diferentes tipos que en una única forma patológica (al menos en apariencia) reaccionan unas veces en un sentido y otras en otro? También en los sueros antitóxicos de caballo se tropezó con el fenómeno de que un mismo estímulo dé lugar en el mismo organismo, tan pronto, al reforzamiento de la globulina β , como al de la globulina γ , o a la aparición de globulinas con una velocidad de desplazamiento intermedia (véase pág. 32), de modo que también aquí se plantea el problema de si existen uno o múltiples puntos que reciban el estímulo del antígeno. También es problemático cómo el aumento de una determinada clase de globulinas se coordina con la reducción de las restantes globulinas y de la albúmina. Si la reducción de la albúmina se considera como un proceso de compensación que mantiene el equilibrio de la presión coloidesmótica del plasma [WUHRMANN y WUNDERLY (1945, 1946)], no se aclara, por ello, su relación fisiológica con el aumento de globulinas. Además, no sólo se reduce la cantidad de albúminas, sino también las de las restantes globulinas que no han experimentado aumento, especialmente cuando otra de ellas ha crecido de modo extraordinario, como

sucede en el mieloma múltiple. Pudiera pensarse que en estos casos la producción de las proteínas del plasma se polariza, es decir, que a consecuencia de las circunstancias patológicas se agota casi en la formación de una única globulina. No obstante, no se trata sino de una opinión, y queda en pie el hecho de que el análisis electroforético del suero no ha simplificado el problema del metabolismo proteico, sino que lo ha complicado, aunque enriqueciéndolo a la vez.

XI. OBJECIONES CONTRA LA TEORÍA DE QUE LOS ANTICUERPOS SON SEROGLOBULINAS MODIFICADAS

K. LANDSTEINER (1936), J. R. MARRACK (1942), P. R. CANNON (1944) y con ellos casi todos los científicos que dirigen la investigación en este campo, consideran incontestable la afirmación de que los anticuerpos son seroglobulinas modificadas. Para CANNON (1944, 1945), la producción de anticuerpos no es sino una fase del metabolismo proteico, y en trabajos recientes que funda en este punto de vista, deduce la consecuencia práctica de que la administración de proteínas de alto valor biológico o de mezclas convenientes de aminoácidos, en los casos de empobrecimiento de proteínas, se traducen no sólo en un rápido aumento de la concentración de las proteínas del plasma, sino también en la elevación de la producción de anticuerpos, cuando las reservas proteicas de los tejidos sean ya insuficientes para cumplir este fin; recíprocamente, una prolongada inanición o la pérdida progresiva de proteínas a consecuencia de una nefrosis crónica, influye considerablemente sobre la síntesis de anticuerpos, debilitando la resistencia contra las infecciones [P. R. CANNON (1944, 1945), W. M. COX y A. J. MUELLER, P. R. CANNON y colaboradores (1943, 1944 a, 1944 b)].

Pero, a pesar de todos los argumentos, siempre encuentra defensores el antiguo modo de concebir los anticuerpos como sustancias desconocidas ancladas en seroglobulinas que actuarían como soportes de ellas. A esta opinión se adhieren M. MACHEBOEUF y E. M. FAURE, después de haber examinado clara y objetivamente todos los argumentos que abonaban, hasta la fecha (1942), la naturaleza de globulina de los anticuerpos. Estos autores arguyen que muchos enzimas fueron tenidos por proteínas hasta que pudieron desdoblarse en dos componentes, el apoenzima proteico y el coenzima que no posee naturaleza proteica; ambos son inactivos, pero al unirse dan lugar a sustancias de elevada actividad funcional. Porque hasta la fecha no

se haya conseguido una separación análoga con los anticuerpos, no queda demostrado que el hecho sea imposible. Existen, por lo demás, ciertas observaciones que justifican la hipótesis de MACHEBOEUF y FAURE sin necesidad de apoyarla en la referencia a la naturaleza de los enzimas.

a) *Los anticuerpos fijos (ligados a los tejidos).*

Los órganos (cuernos del útero, pulmones), privados de sangre y enjuagados, de cobayos anafilactizados por vía activa o pasiva, reaccionan en contacto con el antígeno como si contuvieran los anticuerpos correspondientes. Aunque no sepamos todavía en qué forma se encuentran los anticuerpos en tales órganos, el hecho de que después de lavarlos perfectamente, para eliminar toda la sangre, continúen reaccionando con el antígeno sin más que poner éste en contacto con su superficie, como se efectúa al aplicar la técnica de DALE, parece indicar que los anticuerpos se encuentran en forma de una película de globulina que no se arrastra al lavar (véase pág. 20). Considerando exclusivamente el experimento anafiláctico *activo*, puede explicarse que el anticuerpo racionante esté "sésil", es decir, ligado a los tejidos, admitiendo que se produce en las células del órgano sensibilizado donde se encuentra antes de verter en la circulación (véase página 3). Ahora bien: el experimento anafiláctico por vía pasiva contradice esta explicación; en este caso la "sesilidad" de los anticuerpos no puede explicarse sino por haberse anclado los libres administrados en el experimento; ahora bien: los anticuerpos deben ser globulinas inmunes que no se diferencian de las normales sino por su afinidad a un determinado antígeno; antígeno que, naturalmente, no existe en los tejidos del cobayo. Queda una última explicación: que la fijación dependa del carácter de globulina común a todos los anticuerpos; según ello, cualquier seroglobulina normal debe fijarse a los tejidos como las globulinas inmunes. Conclusión extraña que pudiera esconder un fondo de verdad, como parece indicar la denominada *enfermedad del suero pasiva inversa*, primeramente descrita por E. A. VOS y por VOS y HUNDT, y después por S. KARELITZ y S. STEMPIEN. Cuando un hombre recibe subcutáneamente suero de caballo y, después de transcurridas entre ocho horas y varios días, se le administra por vía intravenosa suero de convaleciente de la enfermedad del suero, reacciona solamente el lugar donde se inyectó el suero de caballo (o antes y de modo más intenso). En 1926, L. E. OPIE y J. FURTH describieron un efecto análogo como anafilaxia

local pasiva e inversa del conejo. Ahora bien: estos fenómenos deben estudiarse con mayor profundidad y de modo especial su conexión con las pruebas de transmisión de las reagentes alérgicas de PRAUSNITZ-KÜSTNER, en las que el orden de la aplicación de los componentes de la reacción puede también invertirse.

b) *El fenómeno de la anafilaxia "hereditaria".*

Si hembras de cobayo preñadas dentro de los dos tercios primeros del período de gestación se inmunizan con suero de caballo, alumbran crías anafilácticas. Este resultado se consigue con la mayor regularidad. El hecho de que las crías estén anafilactizadas de modo pasivo demuestra el paso de los anticuerpos a través de la placenta; pero el hecho de que este anticuerpo sea una sustancia que se comporta en el sentido físico como una seroglobulina, es decir, como una proteína de alto peso molecular, está en contradicción con su paso por la placenta, que posee una relativa impermeabilidad, y este paso se produce, como se ha señalado, no excepcionalmente, sino en todos los casos. Por otra parte, si corto tiempo después del parto se investiga el contenido de anticuerpos anafilácticos en la sangre de la madre (intentando transmitir la anafilaxia), se obtienen siempre resultados negativos [R. DOERR y S. SEIDENBERG (1931)]. ¿De qué forma, por consiguiente, pasan los anticuerpos de la madre al feto? Este problema resulta aún más notable cuando la sensibilización de la madre no tuvo lugar durante el embarazo, sino que se efectuó antes de ser fecundada, de modo que, según datos seguros, tanto el antígeno como los anticuerpos circulantes en la sangre debían haber desaparecido del organismo de la madre en el tiempo de la concepción; sin embargo, también en este caso, nacen crías anafilactizadas de modo pasivo (R. DOERR y S. SEIDENBERG). Lo que sucede se puede examinar fácilmente en el siguiente esquema:

Día primero: Sensibilización, mediante la inyección subcutánea de 0,002 ml. de suero de caballo.

Día catorce: Se ha eliminado el suero de caballo.

Días sesenta-noventa: No pueden descubrirse los anticuerpos anafilácticos aunque se utilice gran cantidad de sangre.

Día doscientos treinta: Concepción.

Día trescientos: Alumbramiento de crías con anafilaxia pasiva.

Por tanto, se observó la contradicción siguiente: los anticuerpos tenían que circular por la sangre de la madre para que pudieran ocasionar la sensibilización pasiva del feto en el útero, y, sin embargo,

no pueden descubrirse en la sangre porque han desaparecido de la circulación ya a los sesenta-noventa días de la sensibilización. Es cierto que los cobayos preparados por vía activa reaccionan de modo anafiláctico mucho después de los sesenta-noventa días siguientes a la inyección del antígeno, y, por consiguiente, después de esta época deben poseer anticuerpos; pero como no aparecen en la sangre tienen que estar fijados en los tejidos, y en este estado parece evidente que no deberían ser capaces de sensibilizar al feto por vía de la placenta, es decir, mediante la sangre; por consiguiente, sólo resta la posibilidad de que el feto se haya sensibilizado mediante anticuerpos fijados a la placenta o la pared del útero.

c) *La persistencia de los anticuerpos.*

Los anticuerpos que se administran por vía pasiva, aunque sean homólogos, es decir, procedentes de animales de la misma especie, se comportan como sustancias extrañas al organismo [R. DOERR (1929 b)] y se destruyen en un tiempo relativamente corto. *De modo muy distinto se comportan los anticuerpos producidos por vía activa.*

Cuando un cobayo se prepara de modo activo por la inyección subcutánea de pequeñas cantidades de antígeno (por ejemplo, de 10^{-3} - 10^{-5} ml. de suero de caballo) debe transcurrir un período de incubación, que a veces dura cuatro-seis semanas o más, antes de que aparezca el estado anafiláctico (R. DOERR y V. RUSS, ROSENAU y ANDERSON); este período dura lo necesario para que se produzcan anticuerpos en suficiente cantidad. Sin embargo, el antígeno inyectado, en este caso una proteína extraña, se destruye a las dos semanas. Como la producción de anticuerpos persiste durante muchos meses (véase luego), *resulta evidente que, una vez que el estímulo del antígeno pone en marcha dicha producción, ésta se hace independiente del antígeno y sigue funcionando autónomamente, dirigido por condiciones que no dependen ya del estímulo, sino que hay que buscar en las células estimuladas* [R. DOERR (1929 a)]. También puede observarse en otros fenómenos que las consecuencias de un estímulo se vuelven en ocasiones independientes de éste, como, por ejemplo, cuando se estimula la piel por los rayos Roentgen o en la producción experimental de carcinomas por estimulantes químicos.

Unos cobayos sensibilizados por vía activa mediante la inyección subcutánea de pequeñas dosis de suero de caballo (por ejemplo, 0,005-0,1 ml. = 0,0005-0,01 g. de antígeno proteico, aproximadamente), siguen reaccionando a los trescientos treinta y cinco días de la

inyección sensibilizante con un choque agudo letal, y después de mil ciento veintiún días acusan aún síntomas leves (O. THOMSEN). Ahora bien: los anticuerpos producidos a consecuencia de la preparación activa se destruyen en el organismo lo mismo que los incorporados por vía pasiva. Esto se sabe, aunque no con completa certeza, por los trabajos de THOMSEN, quien observó que el estado anafiláctico activo experimenta al cabo de unos treinta-cincuenta días una disminución que se pone de manifiesto porque para conseguir una respuesta letal se necesita una dosis de antígeno más alta. Modernamente se ha calculado en unas cuatro semanas la duración de las moléculas de anticuerpo [R. SCHÖNHEIMER, S. RATNER, D. RITTENBERG y M. HEIDELBERGER (1942 b)] (véase pág. 67). Pero si los anticuerpos producidos se destruyen constantemente, en cambio persiste el estado anafiláctico que demuestra la existencia de tales anticuerpos; *por lo tanto, parece indudable que interfieren entre sí la destrucción y la formación de los anticuerpos, de tal modo que, durante un determinado período, predomina la producción, hasta que finalmente (en el caso considerado al cabo de unos tres años) cesa por completo.*

Pero también es posible que *la producción de anticuerpos, una vez que se desencadena, no cese nunca, sino que se mantenga de modo algo amortiguado en tanto que el individuo viva.* Una de las observaciones más convincentes a este respecto es la siguiente: desde 1781 a 1846 el sarampión fué una enfermedad completamente desconocida para la población de las islas Färöer. Por contaminación con un carpintero enfermo se originó una epidemia en la que enfermaron más de 6.000 de los 8.000 habitantes, sufriendo la enfermedad tanto los adultos como los niños, con la excepción de los ancianos que habían enfermado antes de 1781 (PANUM); estos individuos seguían, por consiguiente, en posesión de sus anticuerpos, conservando la inmunidad específica. Coincide con esto el hecho de que, como es sabido, la vacunación contra el sarampión se consigue no sólo con suero de convaleciente, sino con suero de adultos sin más que elevar la dosis aproximadamente al doble. Por un fraccionamiento adecuado de las mezclas de sueros de adulto y por la concentración subsiguiente de una determinada fracción de la globulina y se ha llegado, incluso, a obtener preparados que, a dosis de 0,2 ml. por kg. de peso del paciente (inyectadas intramuscularmente), protegen por completo la mayor parte de los niños inyectados (el 71 por 100) hasta cinco días después de recibida la inyección, y con una cuarta parte de dicha dosis el proceso de la enfermedad resulta mucho más benigno [J. STOKES, E. P. MARRIS y S. S. GELLIS, C. W. ORDMAN, C. G. JENNINGS y C. A. JANEWAY].

Dado el contenido de anticuerpos en el suero de los adultos se ha querido deducir que el hombre, en las comarcas donde el sarampión es endémico, está expuesto a repetidas infecciones, que en el caso de haber sufrido la enfermedad en la infancia transcurren de modo latente, pero que dan nuevo impulso a la formación de anticuerpos. Sin embargo, esta explicación no sólo es arbitraria, sino que está en contradicción con las observaciones de las islas Färöer. Con la teoría de la "epidemia latente" o la "contaminación oculta" se ha introducido un gran desorden en las hipótesis.

El sarampión no es el único ejemplo de este tipo. W. A. SAWYER observó, en 1931, que en el suero de personas que habían sufrido treinta-setenta y ocho años antes una infección de fiebre amarilla y que hacía mucho tiempo que no habían vivido en comarcas donde la enfermedad fuera endémica seguían en posesión de anticuerpos neutralizadores del virus; estos datos se han atestiguado en muchos lugares [J. BAUER y N. HUTSON, L. SOPER y A. DE ANDRADE]. Tampoco aquí puede explicarse la larga persistencia del anticuerpo por la suposición de reiteradas infecciones que pasaran inadvertidas (1). Por otra parte, A. PACKCHANIAR y NYLAH TOM, en corroboración de observaciones anteriores, establecieron que las aglutininas para el *Leptospira icterohaemorrhagiae* puede persistir en la sangre del hombre hasta veinte años después de haber sufrido la enfermedad de Weil, aunque en este caso los resultados no son tan constantes.

(1) La persistencia de los anticuerpos en el suero de los individuos que sufrieron sarampión o fiebre amarilla no puede, evidentemente, explicarse suponiendo que los anticuerpos se almacenan en un determinado órgano o tejido que permanentemente los pone en circulación, ya que tal depósito debería agotarse muy rápidamente. Además se demuestra la destrucción del anticuerpo comoólogo, tanto del administrado por vía pasiva como del producido de modo activo por el organismo mismo (véase pág. 67). Nos apartamos aquí explícitamente de la explicación de la persistencia de los anticuerpos por el mero almacenamiento de éstos, teniendo en cuenta los trabajos de CH. F. MCKHANN y colaboradores, que atribuyen a la placenta la capacidad de almacenar anticuerpos y de cederlos. Estas comunicaciones incluso han conducido a la aplicación de extractos de placenta para la vacunación contra el sarampión. Esto se consigue hoy mucho más fácilmente y mejor por la obtención de concentrados de globulina y a partir de suero de adultos [E. J. COHN y colaboradores]. El papel transmisor de la placenta, hablando con precisión, no es más que un intento de hacer comprensible la creación de un estado de inmunidad pasiva en los recién nacidos cuya sangre materna no posee anticuerpos apreciables [véase punto b); consúltese también T. HALLAUER (1939, pág. 1.186); con la presencia durante toda la vida de anticuerpos contra el sarampión o la fiebre amarilla, lo anterior no tiene ninguna relación estricta.

El haber sufrido el sarampión o la fiebre amarilla da lugar a una inmunización específica contra la reiteración, que casi siempre dura toda la vida. Pudiera, pues, opinarse que también en otras enfermedades que dan lugar a una inmunidad postinfecciosa de mucha duración pudiera observarse durante todo dicho período la persistencia de los anticuerpos en el suero. Sin embargo, no es esto lo que sucede; o al menos no parece serlo; es decir, expresándose correctamente, no existe ningún paralelismo persistente entre la inmunidad postinfecciosa y la presencia de los anticuerpos en el suero, demostrable analíticamente; pudiera opinarse, sin embargo, que los anticuerpos existen, pero no en forma libre, circulando por la sangre, sino anclados en los tejidos, como lo están en el último estadio de la anafilaxia activa (véase apartado *a*) de este capítulo). Entretanto parecen justificados los esfuerzos de E. J. COHN (1945) de obtener concentrados de globulina γ (véase pág. 29) de adultos normales e investigar su actividad terapéutica en todos aquellos casos en que exista una fuerte inmunidad postinfecciosa y convenga reservar el suero de convalecientes. Efectivamente, J. ENDERS demostró en tales concentrados anticuerpos contra las toxinas diftérica y estreptocócica contra el virus A de la gripe, contra el virus de la parotitis epidémica y contra el antígeno H del bacilo tífico; concentrando el suero normal 25 veces, el título de algunos de estos anticuerpos iguala o sobrepasa el suero de convalecientes. Según E. J. COHN, así como según STOKES y NEEFE y otros, con los concentrados a dosis de 0,15 ml. se consigue retrasar la aparición de la ictericia en la hepatitis epidémica. Se ha sostenido la teoría de que los anticuerpos no son sino seroglobulinas que no pueden distinguirse de las normales más que por su afinidad específica por el correspondiente antígeno, y que esta propiedad la adquieren porque la globulina inmune se forma *in status nascendi* sobre la matriz del antígeno (véase pág. 73). Sin embargo, no se comprende por qué este proceso no cesa con la desaparición del antígeno, sino que se conserva como una función permanente del organismo, que continúa ininterrumpidamente en ausencia del antígeno.

d) *Alteraciones de los anticuerpos en el transcurso de la inmunización.*

Después de proseguir la inmunización durante largo tiempo, las globulinas inmunes pesadas del suero de caballo muestran tendencia a desdoblarse en partículas menores [E. A. KABAT y K. O. PEDERSEN, PETERMANN y PAPPENHEIMER (1941 a), E. A. KABAT, A. TISE-

LIUS y KABAT]. Se ha supuesto que el organismo del caballo, cuando lleva mucho tiempo produciendo grandes cantidades de globulinas inmunes pesadas, intenta descargarse de estas sustancias, en cierto sentido "extrañas a la sangre", y cuando estas globulinas se están formando continuamente, su fragmentación representa un mecanismo adecuado para conseguir este fin. Pero la demolición, o como quiera llamarse a este proceso, no parece ir acompañada de disminución de la actividad de los anticuerpos específicos; por el contrario, en el suero de los caballos inmunizados desde hace tiempo se demuestra que existen, en lugar de una globulina inmune pesada, varios componentes proteicos de distinto peso molecular y diferente velocidad de desplazamiento, todos provistos de actividad de anticuerpos [M. HEIDELBERGER y K. O. PEDERSEN, KABAT, TISELIUS y KABAT]. Estos datos recuerdan completamente una observación análoga que se ha hecho o se ha creído hacer con proteínas de virus de alto peso molecular, según la cual puede fragmentarse su gigantesca molécula sin que desaparezca su capacidad específica de infectar. [R. DOERR (1944, páginas 15 y 45)]. Pero tanto en este caso como en el de las globulinas inmunes, no resulta claro en qué proporción se encuentran la molécula activa entera y los fragmentos activos. Cuando se suponía que todos los anticuerpos del suero de caballo eran siempre una globulina pesada con un peso molecular de 930.000, aproximadamente, parecía sin duda mejor fundada la opinión de que "todos los anticuerpos son globulinas especiales".

Además, desde hace mucho tiempo se sabe que la especificidad de los sueros inmunes disminuye con el curso del proceso de inmunización. La reactividad de los sueros inmunes al comienzo de dicho proceso se limita más o menos estrictamente al antígeno utilizado; pero más tarde aparecen, en cantidad creciente, *reacciones cruzadas*, es decir, que los sueros inmunes llegan a dar resultado positivo frente a antígenos con los que no reaccionaban al comienzo de la inmunización. Si para inmunizar se utilizó como antígeno no una sustancia pura, sino la mezcla de varios antígenos, pudiera opinarse que inicialmente actuaría el antígeno con mayor actividad, que inhibiría por su concurrencia al menos activo, y que éste, sólo después de una inmunización reiterada, conseguiría introducirse en el campo de reactividad del antisuero. Pero parece ser que también si se "hiperinmuniza" con un antígeno unitario, se observa una pérdida parcial de la especificidad. Hasta la fecha no se ha analizado bien el estado efectivo del asunto; pero si, como es probable, los antígenos homogéneos

obedecen también esta regla, tendríamos otra observación que no podría armonizarse sin más con la teoría generalmente aceptada.

F. M. BURNET (1941) intenta poner de acuerdo con la teoría general los fenómenos de la persistencia de los anticuerpos y de su transformación en el curso del proceso de inmunización. Supone que las globulinas son sintetizadas por proteasas intracelulares, cuya acción se modifica en presencia de un antígeno, por lo que originan globulinas inmunes en lugar de globulinas ordinarias. Cuando el antígeno ha desaparecido, las proteasas conservan la alteración sufrida; pero ésta va modificándose algo después paulatinamente, y a esto se debe el aumento del campo de especificidad. Aparte de que faltan pruebas en apoyo de esta hipótesis, la aclaración que se consigue no desvanece todas las objeciones planteadas.

a) *Los sueros inmunes "desespeciados".*

Los sueros inmunes antitóxicos (de caballo) por la acción persistente de fermentos pueden perder o transformar su capacidad de actuar como antígenos (como proteínas extrañas) y conservar en tanto su capacidad para neutralizar la toxina correspondiente. La globulina asociada con tal antitoxina forzosamente debe desnaturalizarse por este procedimiento, como puede demostrarse directamente (véase también pág. 35), ya que se destruye, al menos parcialmente, y, no obstante, *no se daña la capacidad del anticuerpo de reaccionar con su antígeno*. De esto debe deducirse que la función específica de la antitoxina no está ligada a la intangibilidad del soporte globulínico. Como los resultados de las investigaciones que conciernen al caso se han expuesto en otro lugar (véase pág. 34), nos contentamos aquí con señalar este fenómeno notable.

f) *El fenómeno de la extinción.*

Los cobayos sensibilizados por vía activa o pasiva no reaccionan o reaccionan muy débilmente frente a la inyección desencadenante cuando poco antes de ésta se les inyectó intravenosamente 1 a 3 ml. de suero normal de la misma o de distinta especie [R. DOERR (1929 a, página 738)]. Lo observado podría atribuirse a una inhibición de cualquier tipo de la reacción anafiláctica y no se opondría a la tesis de que los anticuerpos son inmunoglobulinas; pero C. H. KELLAWAY y J. S. COWELL (1922) determinaron el título de precipitinas y de anticuerpos anafilácticos en el suero de cobayos sensibilizados activamente

frente a suero de caballo e inyectaron a los animales, por vía intravenosa, 3 ml. de suero de cobayo normal. A los quince minutos de esta inyección de suero de la misma especie se observó que el contenido de anticuerpos en la sangre de los animales había disminuido de modo considerable, y sólo al cabo de veinte horas volvió a subir de modo paulatino. También se observó que simultáneamente se reduce la sensibilidad de la musculatura lisa del útero frente al contacto del antígeno, hasta el extremo de que, aunque éste se emplee en una concentración diez veces superior a la positiva frente a úteros de cobayos sensibilizados testigos, no se consigue provocar ninguna contracción en úteros extirpados después de transcurridas una o dos horas de la inyección de suero homólogo normal (técnica de SCHULTZ-DALE); sólo al cabo de cuatro horas se regenera la capacidad de contraer los cuernos del útero. Los cobayos tratados de modo análogo se comportan frente a una inyección desencadenante intravenosa de un modo que se corresponde en todos los aspectos con las modificaciones de la sensibilidad para el antígeno que se observan en el músculo liso aislado, pero no con las modificaciones del contenido de anticuerpos libres en la sangre de los animales de experimentación, lo que coincide completamente con la concepción generalmente aceptada de que los anticuerpos ligados a los tejidos ("celulares" o "sésiles") son los anticuerpos propios de la reacción anafiláctica. ¿Cómo explicarse que estos anticuerpos fijos, que pueden ser también globulinas inmunes, desaparezcan o se inactiven temporalmente para reactivarse de nuevo o regenerarse espontáneamente? Esta pregunta no puede contestarse actualmente, ni se ha insistido sobre estas observaciones, aunque DOERR (obra citada, pág. 715) haya llamado posteriormente la atención sobre ellas.

XII. UN ANTICUERPO CRISTALIZADO

J. H. NORTHROP (1941-1942) consiguió obtener cristalizada la antitoxina diftérica. Como material de partida utilizó la combinación de la toxina y de la antitoxina, que primero dirigió con pepsina y después fraccionó con sulfato amónico. Examinado en la ultracentrífuga, en el aparato de electroforesis y frente a distintos disolventes, el producto se comportó como una proteína homogénea que, no obstante, llevaba indicios de un hidrato de carbono, ya que, en general, es muy difícil obtener cristales proteicos completamente exentos de impurezas orgánicas. Los cristales tienen tendencia a pasar al estado

líquido. El 92 por 100 del nitrógeno que la antitoxina cristalizada contiene puede precipitarse por la toxina. El peso molecular parece ser de 90.500, es decir, aproximadamente la mitad del que posee la pseudoglobulina antitóxica aislada (184.000); tiene una constante de sedimentación de $5,5 \times 10^{13}$ (frente a $7,2 \times 10^{13}$ de la antitoxina sin fraccionar) y una constante de difusión de $5,8 \times 10^7$ (frente a $3,9 \times 10^7$); estas propiedades físicas fueron establecidas por A. ROTHEN (1941-42). Se combina con la toxina purificada en proporciones mucho más variadas que la antitoxina no fraccionada. Esta sustancia es hasta ahora el único anticuerpo que se ha podido obtener en estado cristalizado; sin embargo, K. LANDSTEINER (1945) estima lo conseguido por NORTHROP como *an impressive result*.

Entretanto debe recordarse que se manipulaba un concentrado de antitoxina que podía llevarse al estado cristalizado. Fundándose en las investigaciones de J. VAN DER SCHEER, WYCKOFF y CLARKE (1941 b) y especialmente las de KERWICK (véase pág. 26), debe aceptarse que la antitoxina diftérica, al menos en lo que respecta a su comportamiento químico-físico, no es un cuerpo único, sino que puede presentarse en distintas formas, que se distinguen también por sus reacciones con la toxina diftérica. Por ello no podría hablarse sin más ni más de la cristalización de la antitoxina diftérica, sino en el caso de que siempre, incluso a partir de sueros antitóxicos de diferentes especies animales, se obtuvieran los mismos cristales. En conexión con esto habría que mencionar que el virus necrosante del tabaco puede suministrar, por fraccionamiento de sus disoluciones con sulfato amónico, precipitados amorfos o cristales de distintas formas (laminillas romboidales, prismas hexagonales, pirámides dobles, rombododecaedros), si bien todos estos productos pueden ocasionar la necrosis [F. C. BAWDEN y N. W. PIRIE (1942)].

Sin embargo, tal como actualmente se plantean las cosas, y a pesar de posibles objeciones, no parece razonable apartarse de la opinión de que los anticuerpos son globulinas inmunes modificadas, sin caer en la persecución de lo puramente hipotético, despreciando la base de opiniones fundamentadas. Actualmente pueden plantearse dos problemas en conexión con dicha teoría generalmente admitida; en primer lugar, el modo de producirse estas globulinas, con lo que se orientará necesariamente la debatida cuestión del lugar de formación; y en segundo lugar, de qué forma actúan las globulinas como anticuerpos específicos.

XIII. LA TENTATIVA DE F. R. SABIN DE OBSERVAR ÓPTICAMENTE EL PROCESO DE LA FORMACIÓN DE LAS GLOBULINAS INMUNES

Evidentemente podríamos aproximarnos, teórica y experimentalmente, al *modo de formarse* las globulinas inmunes si supiéramos con mayor exactitud cómo se originan las globulinas normales.

Guiado por esta idea, F. R. SABIN reanuda experimentos concernientes a la formación de los vasos sanguíneos en el blastodermo del embrión de pollo al final del segundo día de incubación. Según las observaciones de E. KLEIN proseguidas después por SABIN, los capilares comienzan siendo cordones macizos constituidos por angioblastos, y sólo después se transforman en canales por la fluidificación de la parte central, mientras, simultáneamente, las células periféricas se aplanan transformándose en un endotelio. El líquido formado por la fluidificación de la sustancia del angioblasto representa al plasma sanguíneo. SABIN supone que las proteínas del suero, al menos las globulinas, se forman durante toda la vida por la fluidificación de una parte del citoplasma de células vivas, principalmente de las células hepáticas de KUPFER. El proceso no puede considerarse como una "secreción" porque en la secreción se eliminan productos formados en la célula, pero completamente distintos de su plasma sin pérdida de la sustancia que integra el soma celular.

Para investigar la formación de las globulinas inmunes, SABIN inyectó a conejos, por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea e intraperitoneal, un precipitado rojo obtenido con alumbre y una proteína coloreada. Procuró buscar microscópicamente el antígeno marcado con color a distintos intervalos; por otra parte vigiló la aparición de los anticuerpos en el suero de los animales. Las partículas rojas se encontraron fagocitadas en los endotelios: en las células hepáticas de KUPFER, en los macrófagos del bazo y de la médula ósea, en los macrófagos del cutis, en los endotelios de los vasos y en las glándulas linfáticas regionales; en una palabra, en todas las células fagocitarias, influyendo, naturalmente, en la distribución el modo de incorporar el antígeno coloreado; sin embargo, siempre se observaba en ciertos endotelios y macrófagos libres. Las partículas primeramente aparecían en vacuolas digestivas, donde se decoloraban, y finalmente desaparecían; este momento final coincidía con la aparición de los anticuerpos en el suero de los conejos. Por último, SABIN también observó una especie de circulación a través de la superficie limitante de los monocitos o macrófagos, que suele también apreciarse cuando han fagocitado sustancias no antigénicas, pero que después de la captación de un antígeno es más acusada.

Hasta aquí los resultados de F. SABIN no son sino la ratificación de lo observado anteriormente en experimentos efectuados con antígenos, tanto naturales como marcados químicamente (véase pág. 8). Como otros autores, SABIN deduce de la distribución de los antígenos en el organismo los lugares de formación de los anticuerpos. Lo original en este autor es el medio encontrado para vigilar visualmente esta distribución, que consiste en poner una proteína coloreada en forma de partículas visibles al microscopio, precipitándola por alumbres; tales partículas, como les sucede a otras de tamaño análogo (bacterias, micelas de tinta china, óxido férrico, etc.), sólo son captadas por las células fagocitarias, de modo que había algún motivo para hacer radicar en ellas el origen de los anticuerpos.

En la interpretación teórica de sus descubrimientos, SABIN sigue, no obstante, un camino propio. Opina que las partículas, inicialmente rojas y después decoloradas, se fluidifican en las vacuolas, y que el producto de la digestión intravacuolar pasa al citoplasma de las células fagocitarias, lugar de las síntesis intracelulares. En el citoplasma estimulan, de modo desconocido, la síntesis de las globulinas, que además se modifican por su presencia, por lo que se originan no sólo globulinas normales, sino además globulinas modificadas (inmunes). Las globulinas inmunes y las normales alcanzan el plasma sanguíneo a consecuencia de la demolición de las capas celulares periféricas (véase luego), ya que los macrófagos sintetizan las globulinas precisamente en dichas capas. SABIN señala, por último, que las células que han formado en algún momento globulinas inmunes quedan sensibilizadas, es decir, que reaccionan frente a un nuevo estímulo del mismo antígeno de modo distinto (más fuerte) que las células normales.

Si se analizan detenidamente estas consideraciones hipotéticas vuelve a tropezarse con lo conocido de antiguo. P. EHRLICH relacionó la formación de anticuerpos con la alimentación de las células, que también toma SABIN en consideración; este autor atribuye un importante papel al desprendimiento de los anticuerpos a partir de las células productoras de globulina, desprendimiento que incluso hace visible y no considera a los anticuerpos como componentes preformados en las células (receptores), sino como productos normales de la síntesis proteica fisiológica, modificados *in loco nascendi* por la interferencia de los antígenos. Con la segunda cuestión, es decir, con la manera de considerar la actividad de una globulina inmune como anticuerpo, no se ha enfrentado SABIN.

Contra la teoría que sitúa en los reticulocitos (micro y macrófagos)

el lugar de formación de los anticuerpos se objeta que por el hecho de que estas células sean capaces de captar antígenos formes (bacterias, eritrocitos) y de que los digieran en su citoplasma, no puede afirmarse que los productos de tal degradación sean anticuerpos. Mediante las técnicas de SABIN puede seguirse la fagocitosis y sus secuelas inmediatas, pero de ningún modo la formación de las globulinas inmunes, lo que ciertamente tampoco ha afirmado SABIN; lo que este autor ha pretendido observar es sólo la eliminación de las inmunoglobulinas ya formadas. Lo que sucede entre la fagocitosis y la digestión fagocitaria, por una parte, y la liberación de las globulinas inmunes, por otra, es, como SABIN dice, simple hipótesis.

Modernamente, W. E. EHRLICH y colaboradores han señalado las debilidades de las investigaciones de SABIN y la imposibilidad de deducir de ellas que los anticuerpos se produzcan en los reticulocitos [véase W. E. EHRLICH y T. N. HARRIS y T. N. HARRIS, GRIMM, MERTENS y EHRLICH]; esta conclusión permite señalar como posible lugar de formación de los anticuerpos a los linfocitos [C. H. BUNTING, L. HEKTOEN (1915), J. B. MURPHY y E. STURM, R. RICH, LEWIS y WINTROBE, McMASTER y HUDACK, F. M. BURNER (1941)]. En apoyo de esta hipótesis se entró en una complicada interpretación, que no expondremos, de experiencias conocidas que consisten en bloquear el tejido reticuloendotelial con óxido férrico, tinta china, azul tripán y colargol, con el fin de rebajar la producción de anticuerpos. En segundo lugar, también se demostró que la liberación de citoplasma no sólo se observa en los macrófagos, sino también en los linfocitos, mieloblastos y en otras células, señalándose que tales procesos eran conocidos con el nombre de trombocitopoyesis (M. WATZKA). Finalmente se aducen argumentos experimentales con los que pretenden demostrar directamente que los anticuerpos se producen en los linfocitos o en los ganglios linfáticos regionales; por ejemplo, se señala que los anticuerpos se encuentran en menor concentración en los vasos linfáticos que conducen a los ganglios linfáticos que en los eferentes, que los linfocitos en las vías linfáticas eferentes también contienen más anticuerpos que la linfa líquida que los rodea y, por que último, que después de inyectar un antígeno en el codo (McMASTER y HUDACK) y en una extremidad [F. M. BURNET (1941), W. E. EHRLICH y T. N. HARRIS (1942)] se observa que los anticuerpos desaparecen más rápidamente en los ganglios linfáticos regionales que en el suero, y que cuando el antígeno no se inyecta sino en un lado, también aparece en mayor cantidad que en los ganglios linfáticos del lado contrario. Pero como los linfocitos no fagocitan, resulta incomprensible que en ellos puedan formarse los anticuerpos cuando el antígeno se inyecta en forma celular, por lo que EHRLICH y T. N. HARRIS piensan de nuevo en los reticulocitos (macrófagos), pero atribuyéndoles sólo el papel previo de desmenuzar y diseminar los antígenos formes; una vez que los reticulocitos liberan los productos antigénicos así preparados son, finalmente, los linfocitos los encargados de transformarlos en anticuerpos. Sin embargo, no ha podido demostrarse que los linfocitos puedan captar proteínas *disueltas*; EHRLICH y colaboradores han mostrado más bien, sin pretenderlo, que no son capaces de tal función; según sus experimentos,

los linfocitos no pueden captar (absorber) anticuerpos del líquido que los rodea, y los anticuerpos, dado su carácter de globulinas inmunes, son antígenos disueltos (véase pág. 71).

Con esta cuestión del lugar en que se forman los anticuerpos están relacionados también, hasta cierto punto, los resultados de las investigaciones de K. LANDSTEINER y R. C. PARKER (1940). Células de tejido conjuntivo desarrolladas a partir de fragmentos de músculo de embriones de pollo cultivados en plasma de conejo y en extractos de tejidos de conejo, ceden al medio de cultivo sustancias que reaccionan de modo específico con una precipitina para el suero de pollo, de modo que, según todos los aspectos, serían proteínas del suero de pollo. Pero como esta sustancia, a pesar de un cultivo de ocho meses y después de 35 pases no disminuye en concentración, no parece probable que se trate de una impureza arrastrada por el material de partida. Los autores opinan que debían planearse experimentos para intentar identificar esta sustancia, empleando precipitinas contra globulinas, albúminas y otras proteínas del suero de pollo. No tengo noticia de que se haya efectuado este trabajo. Incluso si se demostrara que en los cultivos de tejidos los fibroblastos del embrión de pollo producen efectivamente de modo permanente proteínas de suero de pollo, no se demuestra por ello su capacidad de formar anticuerpos específicos (véase pág. 45). También sería, naturalmente, importante que el cultivo sólo constara de fibroblastos; por la imagen microscópica del tejido cultivado parece ser homogéneo el cúmulo de células desarrolladas.

XIV. INVESTIGACIÓN EN EL METABOLISMO PROTÉICO DE LAS SERO- GLOBULINAS NORMALES E INMUNES CON AYUDA DE AMINOÁCIDOS ISÓTOPOS

Las proteínas del organismo proceden de las proteínas de la alimentación. En el intestino ciertos fermentos las desdoblan en sus componentes, los aminoácidos, antes de ser absorbidas, y a partir de estos aminoácidos se sintetizan las proteínas propias del organismo al otro lado de la barrera intestinal. Por el desdoblamiento que se efectúa en el intestino se impide que invadan la sangre y los tejidos proteínas extrañas a la sangre, y se consigue conservar los productos proteicos propios del organismo con sus propiedades particulares. Como ha señalado E. ABDERHALDEN, se puede efectuar *in vitro* la primera parte de este proceso (el desdoblamiento en aminoácidos de las proteínas extrañas al organismo) y transformar por una hidrólisis fermentativa las proteínas de la alimentación en una mezcla de aminoácidos; con una mezcla de aminoácidos así conseguida se pueden alimentar animales durante largo tiempo sin que se observe

ningún efecto pernicioso. Por la investigación físicoquímica no puede conocerse de qué proteína procede un determinado aminoácido; lo que distingue las proteínas extrañas al organismo de las propias no es sino la combinación particular de aminoácidos que constituye cada molécula proteica. También se comprende fácilmente que el estudio del desdoblamiento de las proteínas proporciona una imagen de su constitución, pero no puede ofrecer indicaciones respecto al proceso de la síntesis de las proteínas en el organismo, ni de la velocidad de esta síntesis, ni de la relación entre esta velocidad y la naturaleza de los distintos órganos y tejidos.

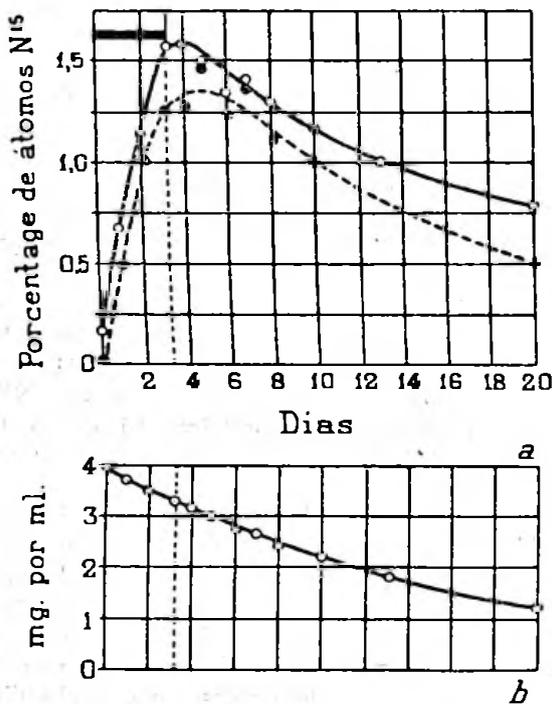
Pueden marcarse, sin embargo, determinados aminoácidos (dl-tirosina, l-leucina, r-leucina, glicina, lisina), sustituyendo en ellas el nitrógeno ordinario por su isótopo N^{15} . R. SCHÖNHEIMER observó en una serie de experimentos que este isótopo N^{15} aparece en las proteínas de los tejidos de las ratas poco después de haber añadido a la alimentación de los animales un aminoácido marcado con él; también demostró que el N^{15} que presentaban las proteínas tisulares no sólo aparecía sustituyendo al N ordinario de los aminoácidos homólogos al marcado que se administró, sino al N de otros aminoácidos; resultaba, pues, evidente el transporte del N de unos aminoácidos a otros durante la liberación temporal de los grupos amino; la velocidad con que el N^{15} aparece en una proteína del cuerpo después de la alimentación con un aminoácido isótopo debe, pues, estar condicionada, por una parte, por los procesos de desdoblamiento y de reconstrucción de los enlaces peptídicos, y por la otra, por todas las reacciones de metabolismo que determinan el intercambio del N entre los aminoácidos [R. SCHÖNHEIMER, S. RATNER y D. RITTENBERG (1939 a, 1939 b), RATNER, SCHÖNHEIMER y RITTENBERG, RATNER, RITTENBERG, A. S. KESTON y SCHÖNHEIMER]. Prosiguiendo durante algún tiempo las determinaciones del N^{15} pueden sacarse conclusiones sobre la "actividad química" o la "velocidad de regeneración" de las proteínas de diferentes tejidos; por ejemplo, se ha observado que las proteínas de los músculos y de la piel tienen menor actividad química que las de los órganos internos, y que entre éstas las del hígado son las que reaccionan más rápidamente. No obstante, hay que tener en cuenta que los órganos están compuestos de diferentes tejidos, que, en los pequeños animales de experimentación, no pueden separarse entre sí con facilidad y de modo perfecto. En este respecto, las proteínas de la sangre constituyen un producto muy ventajoso para aplicar las técnicas experimentales, y, además, nos interesan de modo especial. Sin las anteriores palabras de introducción, lo que sigue resultaría difícil de entender para parte de los lectores.

Antes de entrar en la materia digamos que los autores refieren el contenido de N^{15} que determinan en los substratos investigados al contenido de N^{15} en los aminoácidos isótopos administrados en la alimentación (al que consideran con 100 átomos por 100); por ejemplo, si de una determinada fracción de proteínas del suero se dice que contiene un 2,00 por 100 de átomos de N^{15} , significa que el 2 por 100 del nitrógeno que contienen procede del aminoácido marcado administrado con el alimento. El primer hecho importante observado es que las proteínas del plasma participan en los procesos de metabolismo, que conducen a edificar las proteínas propias del organismo a partir de las proteínas del alimento, y que la velocidad de los procesos sea aproximadamente la misma que en las proteínas de los órganos internos. También es notable que en estos procesos participen aproximadamente con la misma intensidad todas las fracciones del plasma, fibrinógeno, euglobulina, pseudoglobulina y albúmina [SCHÖNHEIMER, RATNER, RITTENBERG y M. HEIDELBERGER (1942 a)]. En cambio, los experimentos no ofrecieron ningún indicio del lugar donde se forman las proteínas del plasma. Una opinión generalizada sitúa este lugar en el hígado (S. C. MADDEN y G. H. WHIPPLE), por lo que cabía esperar que los valores en N^{15} del hígado resultaran más elevados que en las proteínas del plasma. De los datos de SCHÖNHEIMER, RATNER, RITTENBERG y HEIDELBERGER se deduce más bien lo contrario; esto, sin embargo, pudiera estar motivado por no haberse investigado células hepáticas aisladas, sino la mezcla de tejidos obtenida por desmenuzamiento de la glándula.

En estas pruebas los aminoácidos isótopos suelen administrarse mezclándolos durante tres días consecutivos a una dieta básica que contiene caseína. El fraccionamiento de las proteínas del plasma sanguíneo se consigue por la adición de cantidades crecientes de sulfato amónico; las fracciones designadas como euglobulina y pseudoglobulina (véase luego) no corresponden a ninguna de las obtenidas por electroforesis (consúltense las páginas 23 y siguientes).

Si los anticuerpos son globulinas inmunes deben comportarse, en lo que respecta a la captación del nitrógeno de la alimentación (en los experimentos señalados a la captación del N^{15}), como las seroproteínas normales. Para demostrar la exactitud de esta deducción, R. SCHÖNHEIMER, RATNER, RITTENBERG y HEIDELBERGER (1942 b), procedieron a la inmunización activa de ratas con hemocianina y de conejos con neumococos del tipo III. Cuando la concentración en anticuerpos alcanza su máximo valor, e incluso inicia el descenso, se comienza la alimentación con aminoácidos isótopos que se prosigue

durante tres días. La prueba con conejos ofrece un interés particular porque permite tomar en un mismo día muchas muestras de sangre, en las que se puede seguir de cerca la marcha del proceso; el antígeno elegido permite además precipitar el anticuerpo con polisacáridos del neumococo exentos de N, de modo que el del precipitado sólo puede



Figs. 10 a y 10 b. La 10 a muestra el aumento y la disminución del isótopo N¹⁵ en los anticuerpos (trazo continuo) y en las proteínas del suero (trazo punteado). Los círculos llenos de negro marcan la concentración de N¹⁵ en los anticuerpos, y los círculos blancos, la concentración de N¹⁵ en las restantes proteínas del suero. El trazo horizontal negro que se ve en la esquina izquierda y superior de la figura señala el periodo de alimentación con glicina isótopa (con N¹⁵).

La fig. 10 b señala el contenido total de N en los anticuerpos; se observa que el contenido de anticuerpos en la sangre disminuye durante la prueba (según SCHÖNHSIMMER, RATNER, RITTENBERG y HEIDELBERGER).

proceder del anticuerpo. La figura 10 muestra el resultado de uno de estos experimentos, en el que se emprendió la alimentación con el aminoácido isótopo diez días después de administrada la última

inyección del antígeno del pneumococo. Las sangrías comenzaron tres horas después de alimentar con el aminoácido isótopo (glicina con N^{15}) y se prosiguieron, a intervalos relativamente cortos, durante unas doscientas horas.

Como puede observarse, tanto en las proteínas del suero como en los anticuerpos aumenta rápidamente el contenido de N^{15} inmediatamente después de comenzar la alimentación con la glicina isótopa y antes de interrumpir esta administración el 1,5 por 100 del N de ambas proteínas se había sustituido por nitrógeno marcado procedente del alimento. Después de interrumpir la alimentación con el aminoácido isótopo baja el contenido de N^{15} en los anticuerpos y en las restantes proteínas del suero. Como del contenido total en N^{15} no puede deducirse ninguna conclusión sobre su distribución en la molécula proteica, se determinó el contenido de N^{15} en cada aminoácido, y resultó que la glicina (es decir, el aminoácido correspondiente al aminoácido isótopo que se mezcló a la dieta) era el aminoácido que presentaba un contenido de N^{15} máximo.

Vida media de las moléculas de anticuerpo.

Por la velocidad con que desaparece el N pesado de la proteína del anticuerpo y se sustituye por N normal (véase la fig. 10 a) [SCHÖNHEIMER, RATNER, RITTENBERG y HEIDELBERGER (1942 b)], calculan la "vida media" de una molécula de anticuerpo en unas cuatro semanas; esta apreciación descansa en la suposición previa de que la desaparición del nitrógeno pesado del anticuerpo puede tomarse como índice de la destrucción de éste; es decir, que el N pesado no puede sustituirse por N normal en las moléculas de anticuerpo intactas. Si esto fuera posible, el anticuerpo conservaría, después de efectuado el cambio, sus funciones inmunológicas, del mismo modo que la introducción de N pesado no influyó sobre las propiedades características del anticuerpo; resulta evidente que el N normal y el pesado son, biológicamente, equivalentes.

El período de cuatro semanas constituye un valor medio que sólo vale para los anticuerpos propios del conejo (producidos en él por vía activa). En el hombre y en otras especies animales pueden resultar valores muy distintos, según las particularidades del metabolismo proteico de cada especie. Por ejemplo, el estado anafláctico pasivo en cobayos, conseguido por la administración de suero homólogo (de la misma especie), dura sesenta-setenta y siete días [R. OTTO (1907), BR. RATNER, JACKSON y GRUEHL (1926)]. Los anticuerpos de otra

especie desaparecen mucho más rápidamente. Los cobayos sensibilizados pasivamente por la administración de suero inmune de conejo reaccionan, sin pérdida de intensidad, tan sólo hasta el sexto día; a partir de éste disminuye rápidamente la intensidad de la reacción, que desaparece, lo más tarde, hacia los catorce días (R. WEIL, A. COCA y KOSAKAI).

Comportamiento de los anticuerpos administrados por vía pasiva frente a la alimentación de aminoácidos marcados con isótopos.

M. HEIDELBERGER, H. P. TREFFERS, R. SCHÖNHEIMER, S. RATNER y D. RITTENBERG han comprobado, mediante diversos experimentos, que los anticuerpos homólogos administrados por vía pasiva no captan el N^{15} administrado con los alimentos en un aminoácido "marcado". Este comportamiento, opuesto al que ofrecen los anticuerpos producidos por vía activa, destaca más en el siguiente experimento: se inmuniza un conejo por vía activa con un antígeno (neumococo III, por ejemplo) y se le administran después intravenosamente anticuerpos contra otro antígeno (neumococo I); al alimentar el animal así preparado con glicina isótopa se observa que aumenta el contenido de N^{15} en los anticuerpos producidos por vía activa, pero no aumenta en los anticuerpos administrados pasivamente.

Lo anteriormente expuesto revela la incapacidad del anticuerpo administrado por vía pasiva para captar el N de la alimentación e incorporarlo a su molécula, lo que no significa más que se trata de un producto terminado del organismo que puede desdoblarse pero no regenerarse, lo que, por otra parte, ya se sabía. El anticuerpo producido por vía activa que no se distingue ni desde el punto de vista físico-químico, ni serológico, de los anticuerpos homólogos administrados por vía pasiva, se destruye igualmente, aunque no siempre en el tiempo que suponen HEIDELBERGER, TREFFERS y colaboradores (véase antes), y desaparecería si no fuera porque se renueva mientras persista la influencia del antígeno sobre los lugares de producción de las proteínas del plasma. HEIDELBERGER y colaboradores suponen que en los primeros estadios de la inmunización activa predomina la producción de anticuerpos sobre su demolición, y que después (al empezar a descender la concentración de los anticuerpos en la sangre) se inicia el predominio de la demolición; sin embargo, continúa la producción de anticuerpos, aunque en cantidad restringida, mientras se mantenga el estado de inmunidad. Estas afirmaciones no son nuevas, ya que fueron expuestas de modo preciso en 1929 por R. DOERR

(1929 a), apoyándose en el análisis de los fenómenos anafilácticos (véase pág. 53). Los resultados de los experimentos con N pesado, anteriormente expuestos, ofrecen en todo caso un nuevo argumento en favor del origen celular de los anticuerpos y de su naturaleza de globulinas inmunes, y aportan una ratificación significativa del antiguo postulado de EHRLICH, según el cual debe relacionarse la producción de los anticuerpos con el metabolismo de las células.

La aplicación de isótopos debe incluirse en el grupo de procedimientos experimentales a que pertenecen el empleo de sustancias radioactivas en la investigación de los virus [véase R. DOERR (1944)], o de hierro radioactivo para estudiar los procesos del consumo y renovación del hierro en los hematies (P. F. HAHN, W. F. BALE, E. O. LAWRENCE y G. H. WHIPPLE, W. B. HAWKINS y HAHN). Mediante dicho procedimiento se pretende investigar la procedencia y destino de las proteínas del suero normal, y explicar sus relaciones con las proteínas de los tejidos. G. H. WHIPPLE ha defendido la tesis de que las proteínas del plasma y de los tejidos mantienen un estrecho intercambio que designa como *equilibrio dinámico* [R. L. HOLMAN, E. B. MAHONEY y G. H. WHIPPLE (1934 a)]. Si se alimentan "perros" sólo con azúcar, se puede mantener su equilibrio nitrogenado sin más que inyectarles por vía intravenosa plasma sanguíneo homólogo; por otra parte, si se extraen a perros grandes cantidades de proteínas del plasma (plasmaferesis) y se les deja en ayunas, aparecen rápidamente nuevas proteínas del plasma y el nivel proteico del torrente circulatorio vuelve lentamente a su valor normal [W. J. KERR, S. A. HURWITZ y G. H. WHIPPLE, HOLMAN, MAHONEY y WHIPPLE (1934 a), S. C. MADDEN y WHIPPLE, MADDEN y colaboradores (1940 a, 1940 b)]. En el primer caso, el organismo animal ha tenido que sustraer proteínas del plasma circulatorio y transformarlas en proteínas de los tejidos, y recíprocamente; en el segundo caso, las pérdidas en proteínas del plasma han tenido que cubrirse por proteínas tisulares; el hecho de que esta sustitución se efectúe rápidamente, al menos en su primera fase, parece demostrar que en los tejidos existen reservas de productos que se movilizan fácilmente para la formación de proteínas del plasma. Para poder investigar más directamente ese intercambio entre las proteínas del plasma y las de los tejidos, ese "dar y tomar". FINK, ENNS y colaboradores inyectaron a perros normales plasma marcado con N pesado (véase nota al pie de la pág. 46) y examinaron durante algún tiempo la concentración de las proteínas marcadas en el plasma. Observaron que a las veinticuatro horas había desaparecido el 50 por 100 de las proteínas marcadas, y a los seis días el 75 por 100. Los autores reconocen que M. HEIDELBERGER, TREFFERS, SCHÖNHEIMER, RATNER y RITTENBERG habían obtenido con anticuerpos homólogos marcados unos porcentajes análogos en función del tiempo, que también se observan (W. W. C. TOPLEY y WILSON, pág. 883) cuando se administra un anticuerpo heterólogo o una proteína extraña, aunque, según su propia experiencia, cuando se inyectan intravenosamente no pueden utilizarse en el metabolismo (W. POMMERENKE, SLAVIN, KARIHER y WHIPPLE).

Finalmente, las proteínas no son las únicas sustancias que después de administradas intravenosamente desaparecen de este modo de la sangre, sino que el agua, el azúcar, se comportan de igual forma. Por ello, de los experimentos

citados no puede deducirse que las proteínas marcadas abandonen la circulación para transformarse en proteínas tisulares o para ser almacenadas en los tejidos. Se desconocen otros puntos importantes, a saber: dónde se encuentra el depósito supuesto por la teoría del equilibrio dinámico, del cual se consiguen en caso necesario las proteínas del plasma, y en qué forma se almacena el producto mismo. El agua o las sustancias fácilmente difusibles pueden conservarse en los espacios intersticiales del tejido conjuntivo (en los intersticios entre las paredes de los capilares y las células de los tejidos) para ser rápidamente reabsorbidas de éstos (ROLLER, J. P. PETERS, R. C. MELLORS y colaboradores, etc.). No se explica, en cambio, tan fácilmente el almacenamiento en los tejidos de las sustancias coloidales ni su retroceso de los tejidos a la sangre. Las paredes de los capilares no son permeables para tales sustancias; si se alimentan perros con plasma homólogo administrado intravenosamente, no segregan por la orina sino indicios de proteínas [HOLMAN, MAHONEY y WHIPPLE (1934 a)]. Por otra parte, no puede suponerse que las proteínas del plasma de la misma especie que se inyectan por vía intravenosa se destruyan a medida que se separan del torrente circulatorio al menos en la proporción que implica una alimentación normal; la inmunidad pasiva conseguida por inyección intravenosa de suero inmune homólogo, así como la anafilaxia pasiva homóloga, no desaparecen en un tiempo crítico de este tipo, no siguen la rápida caída de la concentración de los anticuerpos en el torrente circulatorio. Los problemas de las proteínas del plasma relacionados con la investigación de anticuerpos necesitan un esclarecimiento ulterior.

XV. DIFERENCIAS ENTRE GLOBULINAS INMUNES Y GLOBULINAS NORMALES

Crítica del estado actual del problema.

Cuando se estableció definitivamente que los anticuerpos son seroglobulinas, se planteó inmediatamente la cuestión de las diferencias que los distinguen de las normales (véase pág. 24). No se ha encontrado en ellos ninguna particularidad química ni en lo que respecta a los aminoácidos que los componen, ni a la presencia de sustancias o grupos que no poseyeran las globulinas normales [B. F. CHOW y W. F. GOEBEL, L. F. HEWITT (1934), L. VELLUZ (1933, 34 y 37), F. BREINL y F. HAUROWITZ (1930)]. Es cierto que se pueden apreciar ciertas diferencias físico-químicas, como, por ejemplo, un peso molecular muy alto en las globulinas inmunes de suero de caballo (véase pág. 38), un comportamiento electroforético anómalo (componente T de los sueros de caballo antitóxicos, componente L de las gallinas enfermas de leucosis), una viscosidad especial que no presenta ninguna proteína de los sueros normales correspondientes (A. A. GREEN, CH. F. MCKHANN, I. KAPNICK y K. R. FAHEY), puntos isoeléctricos espe-

ciales (A. A. GREEN y colaboradores), etc. Alguno de los métodos de investigación, especialmente los utilizados para aislar anticuerpos puros, son lo bastante precisos para dejar definitivamente sentada la conclusión de que, en los casos investigados, la función de soporte de los anticuerpos se desempeña no por globulinas normales, sino por globulinas modificadas. Este resultado, sin embargo, por diversas razones no posee ninguna significación especial.

Primeramente, porque existen globulinas inmunes (e incluso puede decirse que constituyen mayoría) que no pueden distinguirse por las propiedades dichas de las globulinas normales de los sueros de la misma especie. En la página 31 ya se discutió la observación de que los diagramas electroforéticos de los sueros inmunes pueden presentar una alta cima γ ; pero si se la absorbe con el antígeno se desdobra en globulina inmune y en globulina normal. Significación análoga tienen los resultados conseguidos por A. M. PAPPENHEIMER, LUNDGREN y WILLIAMS, quienes aislaron de un suero diftérico antitóxico de caballo una pseudoglobulina que parecía homogénea examinada en la ultracentrífuga, en el aparato de electroforesis y sometida a pruebas de difusión, pero que contenía sólo un 43.5 por 100 de antitoxina precipitable con la toxina específica; la pseudoglobulina que restaba sin precipitar no reaccionaba con la toxina y tenía, no obstante, las mismas propiedades químicas y físicas que la pseudoglobulina antitóxica.

En segundo lugar, tales globulinas modificadas (diferentes de las normales) no sólo aparecen al formarse anticuerpos, sino en muchos otros procesos patológicos; por ello no es legítimo, en modo alguno, enlazar al concepto de globulina "modificada" la función anticuerpo. Esto sólo sería admisible si esta función estuviera ligada a una modificación *sui generis* de las globulinas, lo que de ningún modo sucede. Además, el exceso de globulina que se observa en la producción de anticuerpos no corresponde, según datos de algunos autores (véase pág. 43), a la cantidad de globulina inmune demostrable, sino que la sobrepasa considerablemente; además, no sólo se observa un aumento de globulinas, sino una disminución de albúmina, de modo que parece lógico concebir todos estos procesos como la expresión inespecífica de un trastorno del equilibrio del metabolismo proteico (R. DOERR y W. BERGER). De los productos de este proceso sólo uno es "específico", a saber: la globulina inmune, e incluso *esta especificidad que se manifiesta como la capacidad de reaccionar con un determinado antígeno no ha podido hasta ahora relacionarse con ninguna propiedad física o química común a todos los anticuerpos.*

Tampoco poseen una característica serológica; en efecto, cuando a unos animales de experimentación se les administra por vía parenteral anticuerpos purificados, tales anticuerpos (en este experimento en función de antígenos) se comportan de igual modo que las globulinas normales y originan precipitinas con especificidad de especie [K. ANDO, K. MANAKO y S. TAKATA, J. MARRACK y D. A. DUFF, H. P. TREFFERS y M. HEIDELBERGER (1941 a, b), H. P. TREFFERS, D. H. MOORE y M. HEIDELBERGER]. Lo que se produce en la inmunización con anticuerpos purificados no son, por consiguiente, "anticuerpos", sino antiseroglobulinas. Tales antiseroglobulinas reaccionan con las globulinas normales y con los más diversos anticuerpos, siempre que procedan de la misma especie que los anticuerpos utilizados para inmunizar, pero no con anticuerpos producidos en otra especie animal aunque se dirijan contra un antígeno idéntico, es decir, aunque se hayan obtenido con el mismo antígeno.

Algunas excepciones aparentes a esta regla se deben a que, como es sabido, las proteínas contenidas en un mismo suero no son serológicamente idénticas, diferenciándose incluso también por su especificidad las globulinas del mismo suero. Como los anticuerpos pueden estar ligados a distintas fracciones de globulina, es naturalmente posible que un "anti-antisuero" obtenido con un anticuerpo purificado de caballo no reaccione con otros anticuerpos de caballos. Precisamente en el caballo los anticuerpos antibacterianos están ligados a globulinas insolubles en agua ("euglobulinas"), y, en cambio, la antitoxina diftérica y los anticuerpos contra la ovalbúmina, a "seudoglobulinas" hidrosolubles. Por consiguiente, lo que se observa en las reacciones serológicas de los "anti-antisueros" no son las reacciones serológicas de los anticuerpos, sino las de su soporte globulínico [ANDO y sus colaboradores, H. P. TREFFERS y HEIDELBERGER (1941 a, 1941 b), TREFFERS, MOORE y HEIDELBERGER].

Al llegar a este punto hay que plantearse si es lógico inquirir más propiedades comunes a los anticuerpos, una vez que se ha llegado a la conclusión de que todos los circulantes en la sangre son seroglobulinas. De este modo se ha establecido ya una propiedad común; prescindiendo de ella, falta por saber si no diferirán entre sí los anticuerpos (dando lugar a ilimitadas variantes) tanto en lo que respecta a la forma en que se originan por efecto del antígeno, como en cuanto a su capacidad de reaccionar con éste. Sin duda debe de existir un principio general que regule la correspondencia genética y reactiva entre un anticuerpo y su antígeno. Pero este principio tiene carácter abstracto y no se entiende que se investiguen sus aplicaciones individuales, es decir, los anticuerpos *particulares*, con el propósito de establecer sus propiedades concretas, físicas o químicas, y generales.

Esto constituye una *contradictio in adjecto*. Los esfuerzos para encontrar diferencias generales entre las globulinas inmunes y las normales desde este punto de vista parecen condenados *a priori* a un resultado negativo, como efectivamente ha resultado. Por consiguiente, el objeto de la investigación experimental pudiera consistir sólo en las *diferencias* entre los anticuerpos en que radica la capacidad reaccional específica de los mismos con sus antígenos. Si se prescinde de algunas hipótesis carentes de suficiente base, este problema central, enfocado desde el punto de vista del análisis de los anticuerpos, ha resultado hasta la fecha insoluble; por ello la investigación de la inmunidad desde su primera época se ha esforzado en proseguir por el segundo camino, que consiste en deducir la especificidad del anticuerpo de la especificidad del antígeno.

XVI. RELACIONES GENÉTICAS ENTRE ANTÍGENO Y ANTICUERPO

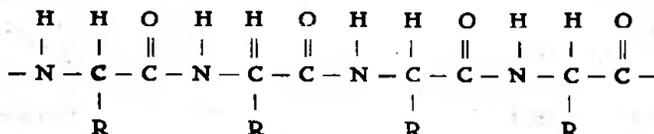
Se ha desechado la hipótesis más sencilla, la que admitía que los antígenos, o una porción de ellos, intervienen en la formación del anticuerpo, participando en la combinación sustancias coloidales. Por lo demás, como K. LANDSTEINER (1933, pág. 70) hace notar, este origen hubiera hecho más comprensible la especificidad de los anticuerpos, pero no la afinidad de tales "antígenos modificados", con las sustancias de que proceden.

De no constituirse el anticuerpo a partir del antígeno podría formarse con un material extraño, pero tomando al antígeno como molde; de ser así habría que suponer que la sustancia de que se forman los anticuerpos posee cierta plasticidad, a la que corresponde la limitada variedad de especificidades de los antígenos. Esta sustancia debería ser una globulina existente en la sangre normal.

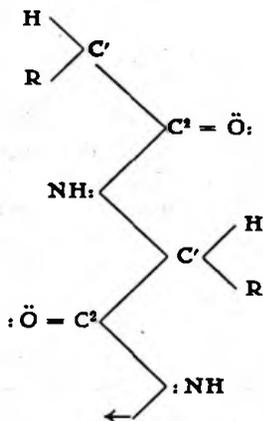
Esta cuestión no puede decidirse por la comparación entre las globulinas inmunes y otras seroglobulinas. De ningún modo puede explicarse por qué el soporte de la actividad de anticuerpo en todas las especies animales investigadas resulta ser las globulinas y en ningún caso la albúmina; tampoco hay ninguna razón para que, entre las globulinas, una determinada, con una determinada velocidad electroforética y con un determinado punto isoelectrónico, resulte más idónea para ejercer esta función.

El peso molecular de las seroglobulinas alcanza, por lo menos, a 150.000 (THE SVEDBERG y K. O. PEDERSEN, pág. 370). Como el promedio de los pesos moleculares de los aminoácidos, en que se des-

doblan las proteínas, alcanza a 120, una molécula de seroglobulina del peso molecular dicho deberá constar de 1.300 de tales componentes y constituir, si los aminoácidos se enlazaran linealmente por enlaces peptídicos, una cadena de aproximadamente una μ de longitud (F. HAUROWITZ), según el siguiente esquema:



o, perpendicularmente, y considerando las estructuras de los electrones:



El caucho, la celulosa, la peptina y otras sustancias se dispersan en disolventes adecuados efectivamente en forma de tales *moléculas lineales* (Fadenmoleküle), que, con un espesor de pocas unidades Å , alcanzan una longitud 100 ó 1.000 veces mayor. Pero las partículas de las proteínas de alto peso molecular, y en particular las de las seroglobulinas, se comportan en la ultracentrífuga, en el aparato de electroforesis y en los ensayos de difusión, no como lo harían tales cadenas peptídicas, sino como elementos homogéneos esféricos o débilmente elípticos, es decir, *poseen propiedades físicas de esferoproteínas*. La hipótesis de las cadenas de polipéptidos se ha defendido contra esta objeción suponiendo que las partículas elementales esféricas están formadas por un apretado apelonamiento de las cadenas peptídicas. El apelonamiento

miento para constituir agregados esféricos que contengan muy pequeña cantidad de disolvente (agua) exige, como condición previa, que las fuerzas de atracción que los miembros de la molécula lineal ejercen entre sí sean manifiestamente más fuertes que las existentes entre el agua y los componentes de la cadena. Además es indispensable, para pasar de la forma lineal a la forma esférica, que la cadena pueda girar libremente alrededor de los enlaces vecinos C-C o C-N. La figura 11, tomada de un artículo de W. KUHN, explica cómo se concibe esta libertad de giro; la figura esclarece un caso de máxima sencillez.

Figura 11. Según W. KUHN, l. c. (pág. 6), x , y , z representan tres ejes de coordenadas perpendiculares. Los puntos designados con 1, 2, 3 y 4, y en otra posición con 3', 4', señalan las posiciones de cuatro átomos de carbono, enlazados entre sí, pertenecientes a un hidrocarburo. Se conoce la distancia entre cada dos átomos de carbono ($1,45 \cdot 10^{-8}$ cm.) y el ángulo entre las líneas de combinación 1-2 y 2-3, ángulo que se designa con el nombre de ángulo de valencia (109°); por último, se sabe que toda la molécula puede girar libremente, o casi libremente, alrededor de cada línea de combinación C-C. El átomo de carbono 3 puede estar, por consiguiente, también en el punto 3', y el átomo 4 en el 4' o en cualquier otro punto de la periferia del círculo que ambos determinan. Las distintas formas moleculares que resultan de estas posibilidades reciben el nombre de isómeros de constelación.

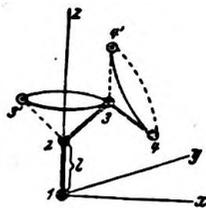


FIG. 11.

Las formas esféricas o elípticas de la molécula apelonada se conservan merced a enlaces de asociación entre sus grupos positivos o negativos [F. HAUROWITZ (1938)]. En la figura 12 se presenta un esquema que intenta representar el modo hipotético de plegarse la cadena peptídica; los pliegues, es decir, el apelonamiento de las cadenas peptídicas, se estabilizan mediante enlaces por valencias secundarias entre los átomos de H de los grupos NH y los átomos de O de los carbonilos. También existe la posibilidad de otros enlaces dentro de las cadenas peptídicas, como ha demostrado, entre otros, K. FELIX.

Por otra parte, se ha discutido que sea indudable la teoría de HOFMISTER y de E. FISCHER, según la cual los aminoácidos se enlazan dentro de la molécula proteica formando cadenas de polipéptidos. Se objetaba principalmente que la hidrólisis por ácidos, aplicada por E. FISCHER para desdoblar las proteínas en aminoácidos, es un procedimiento demasiado violento. I. LANGMUIR y D. BRINS consideran este método, y otros análogos utilizados por los químicos de proteí-

nas, como inadecuado para la investigación de la estructura de estas sustancias, ya que destruyen el objeto mismo que se pretende investigar. Sin embargo, no han alcanzado un reconocimiento universal ni prolongado los intentos de sustituir la representación de la molécula proteica esférica como el apelotonamiento de cadenas peptídicas por

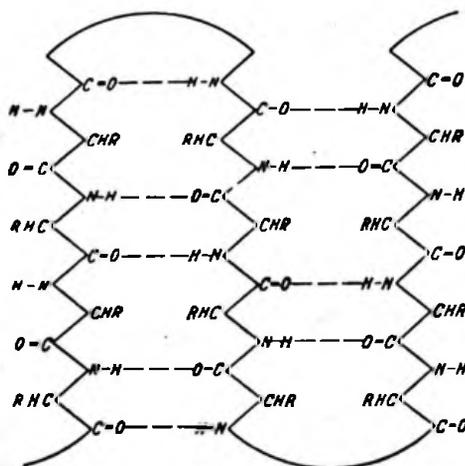


FIG. 12. Pliegues de la cadena peptídica conservados por enlaces entre imino-carbonylo-hidrógeno [según L. PAULING (1940, pág. 265)].

otras representaciones en las que dominan como *leitmotiv* diversas estructuras en anillo (teoría de los ciclos de D. M. WRINCH, que supone la existencia de anillos de dicetopiperacina, o, como pretendía N. TROENSEGAARD, de pirroles). El estudio de las proteínas mediante los nuevos medios físicos y químicos ha ratificado la hipótesis de los enlaces peptídicos, que actualmente se acepta por la mayoría de los científicos.

El concepto actual acerca de los virus que admite que se encuentran en estado de dispersión molecular, tampoco ha modificado en nada el estado del problema. Por el contrario, si los químicos y físicos orientados de modo abiológico o antibiológico pretendían no ver en las partículas elementales de los virus sino una molécula proteica, los problemas que planteaba la estructura proteica se hacían más intrincados a consecuencia de la diversidad de las formas exteriores de los virus. El microscopio electrónico los revela de formas muy diversas: varitas rígidas de longitud variable (virus del mosaico del tabaco),

filamentos alargados como las especies de virus de la poliomielitis humana y del ratón (A. TISELIUS y SVEN GARD, SVEN GARD) o dados con aristas y vértices redondeados (forma de adoquines de los virus de la vacuna variólica, según H. RUSKA, R. H. GREEN, T. F. ANDERSON y J. E. SMADEL); en otras ocasiones la falta de anisotropía en líquido circulante parece hablar de formas redondeadas (virus *Bushy-stunt* de los tomates, virus necrosante del tabaco). Si todo lo que se ha observado para los virus fuera valedero para toda proteína de alto peso molecular habría que contar con la posibilidad, para las moléculas proteicas, de gran número de formas y no de la obediencia a un único prototipo. También se relaciona con esto la cuestión *del crecimiento de las partículas elementales de los virus*, que se produce de distinto modo en las formas bacilares y filamentosas [R. DOERR (1944)], problema que sin duda no puede resolverse por una solución única, sino que deben existir modos diversos, según sea la forma de la partícula. Ahora bien: los resultados de la investigación sobre los virus se han manejado por muchos físicos y químicos de modo ecléctico, es decir, eligiéndolos de la forma que estiman conveniente para fundamentar una determinada teoría sobre proteínas, estructura proteica y síntesis proteica.

No parece indicado en estas circunstancias manifestarse en forma apodíctica frente a todas las hipótesis que intentan explicar la estructura de las proteínas y rechazar de forma decidida y sin condiciones una u otra concepción porque no satisfaga todos los puntos en debate; así se pronuncia P. JORDÁN (1944), en forma especialmente acusada. *A priori* no puede establecerse con seguridad, ni en un solo punto, cuál es la teoría que se aproxima más a lo que sucede realmente. Con seguridad sólo puede afirmarse que las proteínas de alto peso molecular están constituidas por *unidades de orden inferior*, como se deduce de que el peso molecular de las proteínas sea, con pocas excepciones, múltiplo de un determinado número fundamental (17.000) (ley de los múltiplos de THE SVEDBERG), y que las proteínas de alto peso molecular, como, por ejemplo, la hemocianina, pueden desdoblarse mediante distintos agentes (modificación del pH o de la concentración salina de sus disoluciones, vibraciones ultrasónicas) en partes cuyo peso molecular corresponde al $1/2$, $1/4$, $1/8$ ó $1/16$ del valor original, desdoblamiento en muchos casos reversible [S. BROHULT (1937), BROHULT y S. CLAEßON (1939)]. Puede suponerse con gran probabilidad que estas unidades de orden inferior (que de modo equivoco se han denominado también "cuerpos elementales") son iguales entre sí, con lo que se llega automáticamente a la *concepción de la periodicidad, es decir, de la repetición regular de estructuras parciales idénticas dentro de la gran molécula proteica*. Se trata del pensamiento fundamental que HOFFMEISTER y EMIL FISCHER tuvieron presente al formular la teoría de los polipéptidos y que vuelve en todas las hipótesis posteriores referentes a la estructura de las proteínas de alto peso molecular (W. T. ASTBURY, M. BERGMANN y T. NIEMANN, M. D. WRINCH y otros); ahora bien:

las hipótesis difieren entre sí tanto en lo referente al tamaño de las unidades de orden inferior como al modo de concebir su enlace.

Las distintas teorías sobre la estructura de proteínas se refieren, sin excepción, a todas ellas; por consiguiente, no podemos deducir de tales teorías ninguna solución acerca de por qué unas seroglobulinas aparecen como soportes de la función de anticuerpos, mientras que otras seroproteínas nunca ejercen este papel.

Pero hay que decir, con la circunspección que exige el caso, que la transformación de una proteína terminada y dotada de una cierta estabilidad, en una proteína inmune, no parece muy probable; a priori resulta mucho más plausible la opinión de que las globulinas se transforman en estado naciente, en globulinas inmunes (es decir, en anticuerpos específicos) cuando influye su síntesis un determinado antígeno; se comprende fácilmente que la segunda concepción también se adapta mejor a la teoría del origen celular de los anticuerpos. Ya en 1930, F. BREINL y F. HAUROWITZ expusieron la opinión de que las globulinas inmunes se originan en el lugar de la generación fisiológica de las globulinas, actuando el antígeno como un elemento perturbador en las primeras fases del proceso, "en las cuales se agrupan los elementos inespecíficos para constituir la molécula específica de la globulina". Hacia la misma época llegaron a una concepción análoga S. MUND (1932) y J. ALEXANDER (1931). Por último, se ha logrado una prueba concluyente en favor de que los anticuerpos se producen en el lugar y durante la síntesis de las globulinas al observar que los anticuerpos administrados por vía pasiva no captan el N pesado suministrado con la alimentación, pero que, en cambio, este N aparece en los anticuerpos originados por vía activa, y precisamente como sustituto del N normal de los aminoácidos de su molécula (véanse págs. 63 y ss).

Resulta todavía problemático cómo influye la presencia del antígeno en la síntesis de las globulinas para que, en lugar de la normal, resulte una globulina específica (globulina inmune). HAUROWITZ (1934) se inclina a atribuir la influencia perturbadora del antígeno a las acciones de campo de sus grupos determinantes. Cuando HAUROWITZ, al precisar más su afirmación, opina que la estructura y la carga de las globulinas producidas en tales condiciones están adaptadas a la estructura y carga de los grupos antigénicos determinantes como "una galvanoplastia a un electrodo de forma complicada"; expresión que no es sino una versión modernizada de la comparación de E. FISCHER con la "llave que se adapta a la cerradura".

Para MACHEBOEUF (M. MACHEBOEUF y M. FAURE), el antígeno

es un cuerpo extraño que penetra en las células productoras de globulinas. Las proteínas, que las células sintetizan a partir de aminoácidos, deben, según MACHEBOEUF, sus propiedades particulares, que varían de una especie animal a otra, a la arquitectura de las células, y son una complicada función de esta arquitectura. Cuando penetran en las células grandes moléculas extrañas, o cuando estas células las captan, se altera considerablemente la arquitectura del plasma celular en lo que tiene de soporte de numerosas acciones químicas; la ordenación de los aminoácidos no permanece normal, sino que sufre las influencias polares procedentes del cuerpo extraño. Si se considera la síntesis de las globulinas, los aminoácidos se elegirán y ordenarán como se encuentren agrupados en torno al cuerpo extraño, en virtud de sus afinidades con éste; una globulina así formada está, por decirlo así, "conformada según el cuerpo extraño", o al menos según una parte de éste especialmente rico en afinidades para determinados aminoácidos. Una tal globulina se combinará con el cuerpo extraño con más facilidad que cualquier otra en cuya síntesis no haya interferido esta influencia. Su hipótesis, en opinión de MACHEBOEUF, podría explicar tanto la diversidad como la especificidad de los anticuerpos, ya que cada antígeno representa el molde sobre el que se forma cada anticuerpo; pero la hipótesis no explica por qué mínimas cantidades de antígeno dan lugar a la producción de grandes cantidades de anticuerpos (véase pág. 5). Además, a esta teoría, como a cuantas admiten que los anticuerpos se forman en el interior de la célula y en presencia del antígeno, les resulta difícil explicar cómo se produce la cesión de anticuerpos libres al torrente sanguíneo sin que queden combinados con el antígeno, al que deben su conformación, en el lugar donde se originaron. Aunque, como MACHEBOEUF y FAURE subrayan, es cierto que el complejo antígeno-anticuerpo se disocia fácilmente *in vitro*, no deja de resultar una traba molesta para las débiles hipótesis citadas la necesidad de admitir como hipótesis auxiliar que esta disociación ha de producirse en la célula y eliminarse solamente el anticuerpo. El pensamiento de que cada uno de los innumerables antígenos debe ser capaz de transformar una globulina normal en inmune por la alteración del orden de los aminoácidos, es indudable que no posee en sí mismo el carácter de probabilidad interior.

La hipótesis de Pauling.

Contra las objeciones expuestas se defiende L. PAULING, apartándose de la idea de que los anticuerpos difieran de las globulinas normales por su estructura. PAULING defiende más bien el punto de vista de que los anticuerpos poseen las mismas cadenas de polipéptidos que las globulinas normales, y que la diferencia entre ambas sustancias sólo depende de la configuración de las cadenas, mejor dicho, del modo como la cadena se apelonona en la molécula.

PAULING ilustró mediante dibujos esquemáticos el proceso de la formación de anticuerpos tal como él lo concibe. Estos esquemas son muy necesarios para comprender el pensamiento del autor, y por ello se reproducen en la fig. 13.

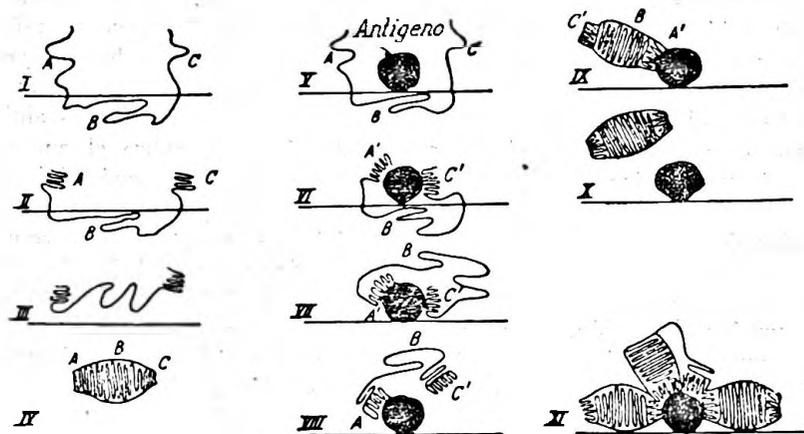


FIG. 13.

Las figuras I-IV representan la formación de una molécula de globulina normal. Se supone que los restos de aminoácidos están ordenados de modo relativamente estable en la parte central (B) de una cadena de polipéptidos larga y en fase de síntesis, mientras que ambos extremos sueltos (A y C), con una configuración relativamente inestable, tienden a pasar a otra más estable. Esta tendencia se realiza enrollándose o plegándose dichos extremos libres, para lo que entran en acción enlaces de hidrógeno y otros enlaces débiles. Finalmente queda en libertad también la parte central de la cadena (III), y sufre a su vez el proceso de plegamientos que representa para el estado libre el óptimo de estabilidad, y con ello queda terminada la molécula de globulina

en su forma definitiva (IV). Cuando en el lugar de liberación de los extremos terminales de la cadena se encuentra una molécula de antígeno, al principio, según PAULING, se produce un proceso análogo (V y VI); en este caso también se pliegan los extremos, pero no del mismo modo que si no existiera ninguna molécula de antígeno, pues los átomos y grupos de la superficie de esta molécula atraen porciones complementarias de la cadena peptídica y repelen otras, y de este modo resulta una configuración estable en presencia del antígeno, por lo que éste, a causa de su estructura complementaria, la atraerá luego. Cuando, por último, en el lugar donde se sintetizó queda en libertad la parte central de la cadena peptídica, supone PAULING que pueden producirse dos casos: cuando las fuerzas de atracción entre el antígeno y el extremo de la cadena peptídica son muy fuertes permanecen ambos reunidos y quedan, en tanto permanezcan en este estado, sin influir en la ulterior producción de anticuerpos; si son más débiles puede liberarse un extremo del antígeno (VIII), plegarse la parte central normalmente (IX) y, finalmente, quedar en libertad toda la molécula del anticuerpo (X). La figura XI muestra una molécula de antígeno totalmente saturada por anticuerpo, de modo que ha cesado su capacidad de producir anticuerpo.

Hay, por consiguiente, todo un cúmulo de hipótesis hechas plausibles por el gráfico de EHRLICH. PAULING se esfuerza en mostrar que una serie de observaciones serológicas e inmunológicas están de acuerdo con su hipótesis, que casi no necesita ninguna hipótesis auxiliar ulterior. Sin embargo, él mismo hace notar que su teoría exige la posibilidad de un número ilimitado de configuraciones para los extremos de la cadena peptídica, lo que no es concebible nada más que si todas esas configuraciones poseen el mismo contenido energético, ya que en caso contrario no sería posible la adaptación a un número ilimitado de antígenos. Para esto también tiene PAULING a mano una hipótesis auxiliar, a saber: que los extremos de las cadenas deben ser muy ricos en restos de prolina y oxiprolina, que deben impedir o dificultar la producción de configuraciones estables. Según lo imaginado por este autor (véase figura), las cadenas peptídicas que, después de terminadas y de desprenderse de los antígenos, representan los anticuerpos terminados y libres, deben ser *divalentes*, ya que poseen *dos* extremos activos, dotados de afinidad, específicos para el antígeno. En este punto difieren mucho las opiniones de los distintos autores; F. HAUROWITZ, por ejemplo, opina que los anticuerpos sólo pueden ser monovalentes, mientras que otros autores admiten que pueden poseer más de dos valencias (o grupos enlazadores), al menos en determinados casos. PAULING, que ha aceptado el punto de vista de este segundo grupo, permanece fiel a su esquema al considerar que los anticuerpos son al menos divalentes.

Podiera pensarse que la obtención de anticuerpos *in vitro*, mencionada en la página 10, que efectuó L. PAULING en colaboración con D. H. CAMPBELL, demuestra la justeza de su teoría. Esta idea no corresponde a la realidad. En la teoría juega un papel muy importante la circunstancia de que las cadenas de polipéptidos experimentan la transformación de globulinas normales en globulinas inmunes (anticuerpos) durante la síntesis de las globulinas; suponen que únicamente en esta fase los extremos de la cadena poseen labilidad plástica. En cambio, en la obtención de los anticuerpos *in vitro* lo que se transforma en globulina inmune es una globulina normal ya terminada; es decir, que se emplea la globulina en fase estabilizada, de modo que el experimento, en realidad, está en oposición con la teoría. Podiera suponerse que las moléculas esféricas de las globulinas normales se desovillan por el desnaturante empleado y que luego vuelven a apolotonarse (plegarse) *in vitro*, bajo la influencia del antígeno, por lo que adquieren afinidad específica para éste. Incluso haciendo esta suposición, muy poco probable, los anticuerpos se originan no de una globulina en estado naciente, sino de una globulina normal desnaturada que se regenera, en cierto modo, de una manera "extrañada". Fundándose en el conjunto de los argumentos que hablan en contra de la existencia de esferoproteínas formadas por cadenas peptídicas apolotonadas, T. JORDAN (1944) llega a la conclusión de "que jamás se produce la transformación de una cadena de polipéptidos en una molécula de esferoproteína grande", y "que la transformación recíproca de una molécula de esferoproteína en una cadena es un proceso de desnaturación siempre irreversible". Sin embargo, el problema no admite una solución tan sencilla. Del comportamiento de las disoluciones de proteínas hidrosolubles de alto peso molecular en la ultracentrífuga y en el aparato de electroforesis se deduce que la molécula de una proteína determinada siempre posee un tamaño y peso constantes (disoluciones monodispersas) y, probablemente, una configuración esférica o ligeramente elipsoidal. En segundo lugar, se ha conseguido extenderlas (véase el capítulo siguiente) en capas tan finas que, considerando su alto peso molecular, debe producirse una considerable deformación de la molécula, y esta deformación se produce sin que las propiedades serológicas (la función antigénica, y en las globulinas inmunes su actividad de anticuerpos) sufran por ello. En tercer lugar, A. ROTHEN y K. LANDSTEINER (1942) han observado que ciertas proteínas, después de desnaturadas por el calor, conservan, aunque menos acusada, su especificidad antigénica, lo que resulta muy importante con respecto a las experiencias de PAULING y CAMPBELL, quienes desnaturaron la globulina y calentándola a 57° durante varios días. Por último, se ha comunicado que de la seroalbúmina de caballo desnaturada por urea puede regenerarse como antígeno específico hasta el 10 por 100 del producto de partida [J. O. ERICKSON y H. NEURATH (1943 a)]. Por consiguiente, la hipótesis de PAULING y CAMPBELL sobre el mecanismo de transformación de las globulinas normales en anticuerpos no está tan en el aire como pudiera pensarse de las aseveraciones de JORDAN; la hipótesis no puede darse por demostrada, pero tampoco refutarse de modo indudable.

Resulta problemático que los plegamientos de las cadenas de polipéptidos en las moléculas de las globulinas inmunes consigan explicar, aunque no sea más que en hipótesis, todos los casos de especificidad

de los anticuerpos, es decir, la casi ilimitada variedad de estos productos. K. LANDSTEINER (1945, pág. 150) señala que la influencia de las distintas ordenaciones de los aminoácidos, influencia que, entre otros, admiten J. O. ERICKSON y H. NEURATH (1943 b), junto con dichos plegamientos, ampliaría en la medida necesaria el campo de variación.

La idea de que las moléculas esféricas de las proteínas de alto peso molecular están constituidas por cadenas de polipéptidos, cuya disposición en el espacio se fija mediante enlaces secundarios, de ser cierta *debe valer no sólo para las globulinas inmunes, sino también para las proteínas que actúan como antígeno*. Esta consecuencia lógica fué señalada ya por HSIEN WU (1931), por A. E. MIRSKY y L. PAULING (1936), por A. C. CHIBNALL (1942) y por L. PAULING (1940). Se ha demostrado, sin embargo, que distintos antígenos proteicos naturales difieren entre sí por su composición en aminoácidos (véase pág. 122); por ello se plantea en qué relación se encuentran la especificidad de las proteínas, condicionada químicamente con su pretendida "especificidad por plegamientos". A esto responden inmediatamente dos afirmaciones comprobadas experimentalmente:

1. La especificidad de los antígenos proteicos se puede transformar por distintos agentes cualitativamente; esta transformación no puede conseguirse en los anticuerpos (globulinas inmunes), si se entiende por ella sustituir la afinidad de los anticuerpos por su antígeno por la afinidad con un antígeno diferente; 2. Por el contrario, los antígenos proteicos y las globulinas inmunes muestran el mismo comportamiento cuando se les extiende en películas monomoleculares; precisamente se trata del proceso que provoca una deformación ("descvillamiento") de la molécula proteica.

Teóricamente tropezamos aún con la siguiente dificultad. Podría pensarse que la especificidad de un antígeno proteico natural de alto peso molecular que está condicionada por "plegamiento" (para hablar brevemente) debe provocar un plegamiento complementario en la globulina inmune (anticuerpo), originada bajo el influjo de tal antígeno. Sin embargo, de acuerdo con lo anterior, al inmunizar con una azoproteína habría que admitir que los plegamientos de la globulina inmune correspondiente se han moldeado simultáneamente por el componente proteico del antígeno y por la combinación química copulada con él (por ejemplo, el ácido arsánico diazotado o el ácido paraaminobenzoico), puesto que el suero inmune obtenido puede reaccionar específicamente con los dos componentes del antígeno conjugado. Pero, además, la globulina inmune, cuando funciona como antígeno, demuestra una configuración específica condicionada por su proce-

dencia (es decir, posee su especificidad de especie). Según lo anterior, el plegamiento de las cadenas peptídicas de una molécula de globulina inmune dirigida contra una azoproteína debe ser tal, que le confiera reactividad específica, tanto con el derivado azoico como con las proteínas del antígeno; pero, además, tal anticuerpo debe conservar los plegamientos debidos a su procedencia de una determinada especie animal productora de anticuerpos. No es necesario subrayar que de este modo se llegan a complicaciones en las que naufraga nuestra capacidad de concepción.

Comportamiento de las proteínas, extendidas en películas, en cuanto a sus funciones como antígeno y anticuerpo.

Una determinada sustancia situada en una superficie limitante entre agua y aire o entre agua y aceite (parafina) puede extenderse hasta un grado tal que las moléculas se dispongan unas junto a otras en dicha superficie. Para conseguir una película monomolecular de este tipo, estable, en una superficie limitante de agua con aire o aceite, es necesario, en general, que la adhesión entre la sustancia que se extiende y el líquido sea mayor que su cohesión interna. La estructura de tales películas monomoleculares difiere con la naturaleza de la sustancia. Los derivados de celulosa y las proteínas se depositan de modo plano sobre (o más bien en) la superficie limitante del agua, desplegándose más o menos completamente de modo que aparece la formación de una capa fina. Las películas más finas que pueden obtenerse con distintas proteínas (ovalbúmina, seroalbúmina, seroglobulina, etc.) poseen un espesor de sólo 6-8 A_gm. [W. LEE y H. WU, A. H. HUGHES y E. K. RIDEAL, A. ROTHEN y K. LANDSTEINER (1939, 1942)]; en tales películas las proteínas de alto peso molecular no pueden, pues, conservar la forma esférica o elipsoidal de sus moléculas, ya que, por ejemplo, el diámetro menor de la molécula de la ovalbúmina alcanza 32 A_gm., y el mayor, 91 A_gm.; y aun son mayores las dimensiones de las seroproteínas (34 : 145 A_gm., las de la seroalbúmina de caballo, y 37 : 280 A_gm. las de la seroglobulina de conejo) (H. NEURATH) (1).

El "desplegamiento" que sufren las proteínas y otras sustancias cuando forman películas se explica admitiendo que las moléculas pueden deformarse considerablemente por la acción de fuerzas intermoleculares (polares) con el resultado de situar en la superficie del

(1) Sobre el crédito que ofrecen estas cifras (véanse págs. 212 y siguiente).

agua la mayor parte de los grupos polares de la sustancia que forma la película. Si las moléculas se encuentran muy apretadas, lo que puede conseguirse por condensación, es decir, por compresión bidimensional de la película, esta tendencia no podría satisfacerse si se encontraran en la superficie del agua, indistintamente, grupos polares (que contienen oxígeno y afines al agua) y grupos no polares e hidró-

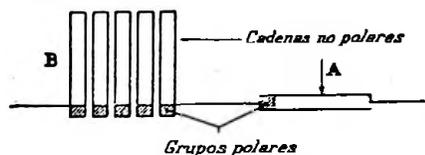
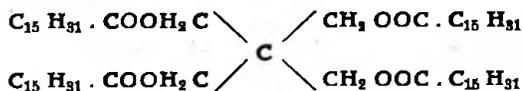


FIG. 14. Disposición de las moléculas con una parte polar y otra no polar en y sobre la superficie del agua. A. Disposición cuando las moléculas no se encuentran muy amontonadas. B. Disposición con moléculas apretadas densamente.

fobos (restos de hidrocarburos); en este caso resulta imposible la ordenación A de la figura 14. Lo probable, en definitiva, es que en las películas condensadas no se localicen sobre la superficie del agua sino los grupos polares, y que los no polares emerjan de dicha superficie verticalmente; de este modo aparece la ordenación B que se produce mediante una torsión de las moléculas.

Por las razones expuestas en una película "condensada" de tetrapalmitato de pentaeritrita, por ejemplo, la molécula no puede conservar la estructura simétrica expresada en la fórmula química



porque los grupos polares no podrían penetrar en la superficie; debido a esto las cuatro cadenas de hidrocarburo se disponen perpendicularmente a la superficie, como se representa en el esquema B de la figura 14 (N. K. ADAM).

Se puede determinar el espesor de tales películas. Debe experimentarse un aumento cuando una película constituida por un antígeno fija anticuerpos o, recíprocamente, cuando una película formada por una globulina inmune fija el antígeno proteico correspondiente, y, en efecto, así sucede [M. F. SHAFFER y J. H. DINGLE. E. P. PORTER y A. M. PAPPENHEIMER, A. ROTHEN y K. LANDSTEINER (1939, 1942)], observándose también el fenómeno cuando las películas de

antígeno o de anticuerpo son extraordinariamente delgadas (véase luego). La formación de películas deja, por consiguiente, intacta la capacidad de reaccionar serológicamente, aunque en los casos extremos se produce indudablemente una fuerte deformación de la molécula proteica.

En efecto, SHAFFER y DINGLE, adsorbiendo ovalbúmina pura en una superficie de estearato, consiguieron una película de la proteína de 40 Agm. de espesor, que aumentó a 100 Agm. al adicionarle suero anti-ovalbúmina de conejo, aumento debido (como se demostró por experimentos auxiliares) a la reacción específica entre la película de antígeno y la proteína inmune, que originó una película de anticuerpo depositada sobre la del antígeno y adherida a él. Si se adsorbe en una superficie de estearato el polisacárido del neumococo tipo III, y esta capa de antígeno se trata con antisuero específico de conejo, se observa un aumento de espesor de unas 100 Agm., mientras que con antisuero específico de caballo el aumento observado es de 240 Agm.; estos resultados coinciden bastante bien con los del experimento con ovalbúmina, por una parte, y, por otra, con la relación entre los pesos moleculares de las globulinas inmunes del conejo y del caballo, que son, respectivamente, 150.000 y 930.000 (véase pág. 38). Sin embargo, el espesor de la capa de anticuerpo conseguida por la adsorción de éste por una película de antígeno no es constante, sino que varía para el mismo suero inmune (antisuero de conejo) dentro de amplios límites, según que sobre la película de antígeno se añada suero concentrado o muy diluído; la explicación de estos fenómenos puede verse en los trabajos de J. B. BATEMAN, H. E. CALKINS y L. A. CHAMBERS, de los que se hará una exposición en la página 215.

Los datos de SHAFFER y DINGLE y los de BATEMAN, CALKINS y CHAMBERS están en contradicción en varios puntos con los resultados de las experiencias dadas a conocer por A. ROTHEN (1945) en una comunicación previa. Este autor extendió proteínas (ovalbúminas, seroalbumina de vaca), formando varias capas superpuestas sobre una superficie de acero cuidadosamente pulimentada cubierta con estearato. Se consiguió la exfoliación de las capas, que si no se hubiesen tramado entre sí por la superposición indicada, por una previa preparación con acetato de uranilo que polariza las capas. Se observaron dos fenómenos: 1. Si se superponen varias capas de seroalbumina de caballo, al tratarlas después con el antisuero homólogo, se observa que el aumento de espesor debido a la fijación de las moléculas de anticuerpo crece con el número de capas del antígeno; este aumento fué de 39, 57, 104, 136 y 149 Agm., según que las capas de antígeno

fueran 1, 2, 4, 6 y 8, respectivamente. Sin embargo, este fenómeno no pudo reproducirse con ovalbúmina; el aumento de espesor provocado por la fijación del anticuerpo fué siempre de 20 Agm., cualquiera que fuera el número de las capas de antígeno superpuestas, en completa contradicción con lo observado con el antígeno anterior. 2. ROTHEN recubrió una película formada por varias capas de seroalbúmina vacuna con 2-8 capas de ácido esteárico sobre el que aplicó el antisuero homólogo; *observó un aumento considerable del espesor de la película, que disminuye con el número de las capas de estearina interpuestas*; esto significa que las moléculas de anticuerpos se fijan en gran cantidad; es decir, que la capa, fuertemente aislante, de estearato no impide la combinación de los anticuerpos, en contra de lo que pudiera preverse. Con ovalbúmina se obtuvo un resultado enteramente análogo, con la única diferencia de que en este caso el aumento de espesor de la película siempre era de 18-20 Agm., independientemente de la capa aislante, de acuerdo con el primer fenómeno observado por este autor. ROTHEN lo explica por la hipótesis de que el campo de fuerzas entre las moléculas de antígeno y de anticuerpo se extienden a un radio no de pocos Agm., sino de varios cientos de Agm.; en condiciones favorables (seroalbúmina de vaca) se reforzaría el campo de fuerza por el número de capas de antígeno. En todo caso, opina ROTHEN que de sus observaciones parece deducirse que los antígenos pueden actuar específicamente sobre los anticuerpos sin estar en contacto directo con ellos, ejerciendo su acción a distancia, por ejemplo, a través de finas membranas biológicas. Rebase el propósito de este libro exponer más por extenso esta cuestión, así como señalar las comprobaciones experimentales a que podría someterse.

En experimentos efectuados con partículas de colodión se ha establecido que no resulta indiferente el orden en que se fijan a ellas los componentes de la reacción (el antígeno y el anticuerpo); cuando se fija primero el antígeno, la reacción antígeno-anticuerpo aparece bajo la forma habitual de aglutinación, neutralización de toxina, etcétera; si se procede en el orden inverso, sólo se observa el enlace (fijación) del antígeno en el anticuerpo previamente depositado (véanse páginas 239 y siguiente). Se observan relaciones análogas en las pruebas efectuadas sobre películas; sin embargo, casi todos los autores han investigado únicamente el efecto de los anticuerpos sobre la película de antígeno.

Los descubrimientos de L. A. CHAMBERS, J. P. BATEMAN y H. E. CALKINS, interesantes también en otros conceptos, explican cómo se produce el desplegamiento para formar la película. Los autores con-

siguieron extender sobre agua películas de derivados de estreptococos que se trasladaron a frasquitos de vidrio recubiertos con estearato, de modo que en unos casos estuviera en contacto con la superficie del frasco la cara que estaba en contacto con el agua, y en otros casos la que estaba en contacto con el aire. Cuando la sustancia estaba extendida al máximo, las dos películas reaccionaban de distinto modo con antisueros homólogos y heterólogos; cuando la extensión era incompleta, la diferencia desaparecía casi por completo. La conclusión del experimento parece indicar que la molécula de los derivados de estreptococos contiene dos grupos reaccionantes independientes, los cuales, en las películas enteramente extendidas, se orientan en direcciones opuestas, mientras que cuando el desplegamiento es incompleto se ordenan irregularmente. También puede influir en los resultados la fuerza y probablemente la velocidad de la extensión, y no sólo del modo descrito, sino también con respecto a la conservación o destrucción de la capacidad de reaccionar serológicamente el antígeno proteico con su anticuerpo. A tales factores se deben probablemente los resultados negativos de J. F. DANIELLI, M. DANIELLI y R. MARRACK, quienes observaron que las películas de seroglobulina de caballo extendidas en superficies limitantes entre agua y aire o aceite han perdido la capacidad de reaccionar con antisueros de conejo sumamente activos, y que las películas de antisueros del neumococo tipo II tampoco reaccionan con el correspondiente polisacárido.

Los autores arriba citados no investigan la capacidad de reaccionar del antígeno y el anticuerpo, *sino en estado desplegado*. En sus publicaciones no se encuentra ningún dato con respecto al comportamiento de las sustancias investigadas, una vez que se han eliminado las fuerzas de superficie introducidas. Parece posible que las moléculas proteicas deformadas recuperen su forma original y con ella sus propiedades inmunológicas (función antigénica, capacidad de reaccionar de modo específico con las globulinas inmunes). Una reversibilidad de este tipo coincide, sin duda alguna, con la dirección en que trabajan las ideas de L. PAULING (véanse págs. 80 y siguientes); por otra parte, B. F. CHAUW y H. WOO, B. F. CHAUW y M. F. GOEBEL opinan que pueden regenerarse los anticuerpos inactivados por ácidos o por formaldehído (1).

Parece ser que todas las proteínas no se comportan de igual modo frente a la influencia que el desplegamiento de la molécula ejerce sobre la posibilidad de recuperar el estado inicial. Por ejemplo, si se

(1) J. O. ERICKSON y H. NEURATH (1934 b) señalan que los anticuerpos específicos contenidos en el suero antineumocócico de caballo que actúan contra el polisacárido específico de tipo correspondiente, se desnaturalizan por el clor-

extiende una película de ovalbúmina sobre la superficie limitante entre agua y aire o agua y aceite, dicha proteína se insolubiliza y no puede recuperar más su forma primitiva. En cambio, si se someten las seroproteínas al mismo proceso, no se desnaturalizan, y fácilmente vuelven al estado esférico (H. WOO y S. M. LING); sin embargo, estas afirmaciones no se fundan en experimentos efectuados con películas, sino en experiencias de coagulación mecánica de proteínas por batido (extensión sobre espuma), y pudiera ser que, aunque por este procedimiento también se consiguen películas monomoleculares extendidas en la superficie limitante entre el agua y el aire, tal vez en estas películas la molécula se deforme de otro modo o con distinta intensidad que en las películas utilizadas por J. DANIELLI y colaboradores.

También se ha observado que muchos fermentos pueden extenderse en películas monomoleculares sin que sufra su actividad enzimática específica, lo que apoya los datos de WOO y LING referentes a la reversibilidad de las seroproteínas extendidas en película. A este respecto pueden recordarse otras observaciones. Por ejemplo, H. BLOCH consiguió multiplicar 10^4 - 10^5 el título lítico de una suspensión de bacteriófago, extendiéndolo en espuma y condensándolo después, y (lo que aquí interesa especialmente) estableció además que dicho título elevado es lábil, es decir, que al cabo de dos horas de haber efectuado el tratamiento indicado retrocede al título inicial. En cambio los experimentos efectuados por BLOCH con suero pestoso de pollo dieron resultado negativo, ya que el producto de condensar un suero previamente sometido a la espumación posee el mismo título antiinfeccioso que el mismo suero antes de sufrir el tratamiento; el enriquecimiento del virus de LAPINE, por su extensión en espuma, señalado por E. WEINECK, es poco considerable y ni siquiera puede considerarse como análogo al fenómeno que aquí se discute de las películas proteicas.

Con respecto a la recuperación por las proteínas del suero extendidas de su primitiva forma esférica, tal como habría que admitirla,

hidrato de guanidina, y pueden regenerarse en parte; G. G. WRIGHT y L. PAULING (Science, 99, 198, 1944) dudan de estos resultados y opinan que probablemente no se trata de anticuerpos regenerados, sino de anticuerpos resistentes a la desnaturalización. ERICKSON y NEURATH consideran la capacidad de regenerarse que presentan los anticuerpos desnaturalizados como una consecuencia lógica de la capacidad de regenerar la función antigénica que ofrecen las seroalbúminas desnaturalizadas [M. SPIEGEL-ADOLF (1925); ERICKSON y NEURATH (1943 a)]; pero esta razón no resulta suficiente, ya que la función anticuerpo está adscrita a las globulinas y no a las albúminas.

según los datos de Woo y LING, observa J. R. MARRACK (obra citada, pág. 30), que este proceso resulta más fácil de entender si se supone que el desplegamiento consiste en la extensión de una lamina o en la separación de láminas combinadas entre sí, que si se admite que la regeneración de la molécula exige el restablecimiento de las relaciones de posición entre cadenas peptídicas paralelas. J. LANGMUIR, W. J. SCHAEFER y D. M. WRINCH, autores de la teoría de los cicloles, resumen los resultados teóricos de sus investigaciones sobre películas proteicas, diciendo que las capas monomoleculares presentan propiedades que permiten concebirlas como *redes bidimensionales* que mantienen su coherencia por fuerzas elásticas, pero que de ningún modo como cadenas de polipéptidos. Tales manifestaciones requieren, sin embargo, el apoyo de investigaciones experimentales. R. SIGNER señala que el único resultado definitivo hasta la fecha de los nuevos métodos coloidoquímicos es establecer que "para alterar una proteína no siempre se necesita una acción química, como hidrólisis, oxidación, etc., sino que la molécula proteica puede modificarse de modo irreversible por efecto de fuerzas físicas débiles, como, por ejemplo, por absorción en superficie". "Cada vez gana más terreno la convicción de que los antiguos métodos químicos, consistentes en el desdoblamiento proteico en péptidos y aminoácidos y en la síntesis de péptidos de mayor o menor complicación, no bastan para explicar las propiedades de las proteínas." Por consiguiente, a los caminos seguidos hasta ahora en la investigación proteica hay que añadir otros nuevos; no puede predecirse si siguiéndolos llegará a comprenderse la esencia de la especificidad de las globulinas inmunes.

XVII. TENTATIVAS PARA PROFUNDIZAR EN LA NATURALEZA DE LOS ANTICUERPOS POR EL ATAQUE QUÍMICO A LOS ANTISUEROS QUE LOS CONTIENEN

Los experimentos de este tipo se emprendieron pronto y se han proseguido con el fin de investigar el paralelismo entre el comportamiento de los anticuerpos y el de las proteínas del suero frente a los distintos agentes desnaturalizantes (calor, ácidos, álcalis, alcohol, acetona, irradiación, etc.) (véase pág. 20). Como resultado secundario se fueron reuniendo observaciones de las que se deduce que los distintos anticuerpos, o mejor dicho los distintos antisueros, manifiestan una resistencia diferente frente a los agentes desnaturalizantes; esto

puede ser debido a que no todos los anticuerpos se encuentran en la misma fracción de globulinas del suero inmune (incluso aparecen en fracciones globulínicas que no existen en el suero normal). Pero también parece posible que en los antisueros existan determinadas sustancias capaces de influir de distinto modo, según su naturaleza, en la desnaturalización de las globulinas inmunes. A. KLECZKOWSKI (véase también F. C. BAWBEN y A. KLECZKOWSKI) opinan que las seroproteínas inespecíficas, especialmente la albúmina, influyen en la desnaturalización de las globulinas inmunes, idea que podría apoyar la demostración, efectuada por JENNINGS y colaboradores, de que la desnaturalización de las globulinas-anticuerpo de un suero antineumocócico de caballo transcurre de modo muy distinto cuando se calientan aisladas o en presencia de otras proteínas

Por otra parte, P. EISENBERG y R. WOLK ya establecieron en 1902 que si se calientan los sueros aglutinantes durante unos minutos a 70-80°, pierden su poder de aglutinación; pero en cambio se fijan a las bacterias y ofrecen el fenómeno de la inhibición; esta observación fué corroborada por F. S. JONES (1928 a) y hecha extensiva por A. KLECZKOWSKI en 1941 a los sueros antivírus de conejo. Según las investigaciones de este último autor, la desnaturalización por el calor transcurre en dos fases; en la primera se fijan proteínas inespecíficas en la globulina-anticuerpo, y si la proteína sumada es una albúmina, los sueros inmunes pierden la capacidad de flocular el antígeno, aunque no la de fijarse a él de modo específico; en la segunda fase prosigue la desnaturalización, destruyéndose incluso la capacidad de combinarse específicamente. Esta disociación de las capacidades de flocular y de combinarse se ha podido demostrar en distintos tipos de sueros inmunes, por ejemplo, en las antitoxinas y en las precipitinas para polisacáridos [H. EAGLE (1938), St. MUDD y E. W. JOFFE]. Además, la aplicación de calor no es el único procedimiento para efectuar esta transformación; se consigue el mismo resultado adsorbiendo los anticuerpos en partículas de colodión (véase pág. 239), tratando los sueros inmunes con formaldehído a determinadas concentraciones [EAGLE (1938), St. MUDD y JOFFE], acetilando con cetena (H. GOLDIE y G. SANDOR y colaboradores, J. T. TAMURA y M. J. BOYD, B. F. CHOW, W. F. GOEBEL) por copulación moderada con diazoderivados (H. EAGLE, D. E. SMITH y P. VICKERS), por foto-oxidación [A. TYLER (1945 a, b), A. TYLER y St. SWINGLE (1945)], extrayendo los lípidos con éter [P. HARTLEY (1925)] o con otros disolventes orgánicos [F. L. HORSFALL y K. GOODNER (1935, 1936 b)]. Considerando este estado de cosas, parece prudente referir

la pérdida de la capacidad de floculación al modo de efectuarse el ataque y, por ejemplo, del efecto del formaldehído o de la cetena sacar como consecuencia que los grupos NH_2 juegan un papel importante en esta función de los anticuerpos. En todos estos casos pudiera tratarse sencillamente de un proceso de desnaturalización. Conviene señalar que distintos anticuerpos se comportan de modo diferente frente al mismo agente, de modo que, por ejemplo, las aglutininas flagelares resultan más resistentes que las aglutininas "O" y las hemaglutininas inmunes más que las hemaglutininas normales (A. J. WEIL, A. M. MOOS y F. S. KLAPP, E. PRASEK), aunque todos estos productos son seroglobulinas; ahora bien: estos hechos no resultan discordantes con la concepción antes señalada, ya que los anticuerpos pueden estar localizados en distintas fracciones de globulina y pueden jugar también un papel otros factores (relaciones cuantitativas, fase de la inmunización, pH). Por ejemplo, A. H. ROSENHEIM observa que la resistencia que la aglutinina flagelar del bacilo tífico ofrece frente a la digestión péptica y trípica aumenta después de repetir las inyecciones del antígeno (véase también la pág. 171).

En resumen, puede decirse que las investigaciones emprendidas en esta dirección no han proporcionado hasta la fecha ningún conocimiento fundamental, aunque los métodos se han modificado de todos los modos compatibles con la naturaleza proteica de los anticuerpos. Muchas veces se ha procedido de modo completamente esquemático, intentando aplicar a los anticuerpos, o a los sueros inmunes que los contienen, determinados procedimientos que habían dado resultado en los antígenos, como, por ejemplo, el tratamiento con formaldehído, método que se puso de moda, la acetilación con cetena o la copulación con compuestos diazoicos [BREINL y HAUROWITZ (1932), J. R. MARRACK (1942), H. EAGLE, D. E. SMITH y VICKERS, L. REINER (1930), J. BRONFENBRENNER, D. M. HETLER y I. O. EAGLE (1931)]. En todo caso, como también ha señalado especialmente K. LANDSTEINER (1945, pág. 142), por ninguno de estos procedimientos se ha conseguido transformar las relaciones específicas de los anticuerpos con sus antígenos, del mismo modo que se consiguió hacerlo aplicando al antígeno el mismo método. Pero entre los muchos resultados particulares de esta época se encuentra una observación que posteriormente adquirió importancia por otro camino. BRONFENBRENNER, HETLER e I. O. EAGLE comprobaron que el suero inmune de caballo, después de tratado con combinaciones diazoicas, puede conservar, prácticamente, toda su actividad, aunque se modifica su especificidad de especie de un modo tal, que los productos de la copulación dejan

de reaccionar como proteínas del suero de caballo. Estos resultados demuestran que la función de anticuerpo de las globulinas inmunes debe ser independiente en alto grado de su función antigénica.

Lo anterior parece corroborarse por las investigaciones que condujeron a un método de purificación que patentó en los Estados Unidos I. A. PARFENTJEW. Este autor digiere el suero antitóxico con un exceso de pepsina a pH 4-4,5 y 37° durante cuatro a veinticuatro horas, de modo que se hacen incoagulables por el calor el 70-80 por 100 de las seroproteínas. El grado de acidez señalado destruiría por sí solo la antitoxina, pero la pepsina ejerce un efecto protector. La purificación ulterior se efectúa por distintos métodos (dialisis, precipitación por sulfato amónico, etc.), obteniéndose un producto que se designa con el nombre de "globulina modificada", en el que está concentrada casi toda la actividad antitóxica inicial del suero. El método también puede conducirse de modo que combine la acción de la pepsina con una calefacción ulterior a temperatura adecuada (60°) que coagule la proteína inactiva (no antitóxica), que se desnaturaliza más fácilmente; de este modo puede simplificarse la purificación del producto.

En uno de los primeros trabajos (A. J. WEIL, I. A. PARFENTJEW y K. L. BOWMAN) se señalaba ya que la antitoxina obtenida por este procedimiento resulta alterada en un importante aspecto. Los anticuerpos, en cuanto globulinas, poseen propiedades de seroproteínas dotadas con especificidad de especie. De numerosas investigaciones (véase pág. 72) se deduce que en el organismo del conejo provocan la formación de precipitinas y de anticuerpos fijadores de complemento y que, además, pueden sensibilizar específicamente al cobayo. La globulina γ de los sueros inmunes, en la que se localizan preferentemente los anticuerpos, no constituye, naturalmente, una excepción en este respecto (G. G. WRIGHT). La globulina inmune reúne, pues, junto a su propiedad de anticuerpo, la acción de antígeno. En la antitoxina obtenida por el desdoblamiento enzimático aparece considerablemente alterada la segunda función. Si se sensibilizan cobayos de modo activo mediante suero equino normal o suero diftérico nativo, no reaccionan sino excepcionalmente cuando se les inyecta por vía intravenosa suero de caballo, antitóxico o normal, digerido [A. J. WEIL, I. A. PARFENTJEW y K. L. BOWMAN (1938), R. D. COGHILL, N. FELL, M. CREIGHTON y G. BROWN (1940), T. H. KASS, M. SCHE-RAGO y R. H. WEAWER (1942)]. WEIL y colaboradores pudieron demostrar además, que si se inmunizan cobayos con preparados digeridos no se producen los anticuerpos homólogos sino tarde y en pe-

queña cantidad; de esto se deduce que la digestión no sólo origina una especificidad nueva, sino que reduce considerablemente la actividad de antígeno; los mismos autores han observado que los cobayos preparados con productos digeridos no reaccionan al reinyectarles estos preparados, lo que refuerza la conclusión anterior. Los resultados de los experimentos anafilácticos efectuados por KASS y colaboradores difieren algo de los resultados anteriores, ya que estos autores consiguieron insensibilizar a cobayos mediante antitoxina digerida y calentada. No obstante, por la naturaleza misma del método, que, por otra parte, se modificó varias veces, parece posible que escapara tanto al efecto del enzima hidrolítico como al de la calefacción, parte del producto de partida. Esta posibilidad fué considerada anteriormente por WEIL, PARFENTJEW y BROWN; pero estos autores, mediante experimentos de absorción, hacen creíble la opinión de que en tales casos la antitoxina esté contenida en la *fracción privada de su función antigénica*. Por último, la reducción de la especificidad de especie no es la única transformación que pueden sufrir los sueros inmunes; hay que comprobar también modificaciones del diagrama electroforético [J. van der SCHEER y R. W. C. WYCKOFF (1940), N. FELL, K. G. STERN y R. D. COGHILL (1940)], y alteraciones de las propiedades físicas [E. H. KASS, A. SCHERAGO y R. H. WEAWER, N. FELL y colaboradores] (véase también la pág. 34).

Continuando la investigación de este fenómeno, se ha podido observar que la reducción y modificación de la especificidad de especie no sólo se logra con pepsina, sino con otros fermentos proteolíticos, como tripsina [G. POPPE (1938, 1939)], con takadiastasa [R. D. COGHILL, FELL, CREIGHTON y G. BROWN (1940), E. H. KASS y colaboradores (1942)], y con diastasa de malta (E. H. KASS y colaboradores); más importante es la observación de que la antitoxina no posee, a este respecto, una propiedad especial, puesto que la proteólisis parcial puede actuar de modo análogo sobre anticuerpos de otro tipo (o de otra designación), como se deduce de los trabajos de B. F. CHOW y W. F. GOEBEL, de P. GRABAR, de H. P. TREFFERS y M. HEIDELBERGER (1941 a), y de M. P. PETERMANN y A. M. PAPPENHEIMER (1941 a), que conciernen a la purificación de sueros antineumocócicos, y de los de I. F. HUDDLESON y R. B. PENNELL acerca de la desespeciación (1) de los sueros antibrucelosos. Hay que men-

(1) En las publicaciones americanas, los antisueros modificados por proteólisis no se designan como desespecificados, sino como desespeciados (*despeciated*), lo que, sin duda, es más exacto. La especificidad del anticuerpo

cionar que los sueros inmunes antitóxicos son más difíciles de atacar por los fermentos proteolíticos que los sueros normales y antibacterianos, y que estas diferencias en su resistencia a la proteólisis puede ponerse de manifiesto claramente en determinadas circunstancias [H. E. SCHULTZE (1940-1941)], lo que pudiera ser debido a una propiedad particular del soporte globulínico de las antitoxinas (componente-T, véase pág. 32).

Del procedimiento para obtener anticuerpos purificados y concentrados por hidrólisis enzimática parcial, y especialmente del hecho que se reduzca o altere la capacidad de las globulinas inmunes para actuar como antígenos específicos, parece deducirse que las moléculas de anticuerpo contenidas en los productos preparados por tal procedimiento poseen dimensiones menores que las de los sueros inmunes nativos. M. L. PETERMANN y A. M. PAPPENHEIMER (1941 a) han demostrado, efectivamente, que la digestión modifica las constantes de sedimentación de los anticuerpos contenidos en los antisueros neumocócicos. Los mismos autores [PETERMANN y PAPPENHEIMER (1941 b)] y A. ROTHEN han examinado en este sentido los sueros antitóxicos de caballo, modificando la técnica con el fin de mejorar el aislamiento del anticuerpo modificado; para ello han procurado que el derivado de la antitoxina obtenido por la hidrólisis enzimática precipite con la toxina, a continuación desdoblan el precipitado en sus componentes y aíslan la antitoxina disociada precipitándola con sulfato amónico. El producto final contiene un 77 por 100 de N precipitable por la toxina y posee un peso molecular de 113.000 en lugar de los 183.000 que PETERMANN y PAPPENHEIMER atribuyen a la antitoxina del antisuero nativo. Además, también se modifican las constantes de disimetría; la razón entre los diámetros mayor y menor, de 1:7 pasa a ser 1:5,3.

Los autores citados suponen que la demolición enzimática de la molécula de la antitoxina se produce, en cierta medida, por un corte perpendicular al eje mayor que separa un trozo sin importancia para la función antitóxica, ya que el contenido de antitoxina no disminuye a lo largo de todo el proceso; por el contrario, aumenta con la reducción del tamaño molecular, y, por otra parte, los productos secundarios separados por la hidrólisis enzimática no contienen antitoxina.

(antitoxina) no se destruye ni reduce por este procedimiento, sino sólo se altera aquella parte de la especificidad del suero que está condicionada por proceder de una determinada especie animal (*Species*); un suero normal de la misma procedencia sufre por la proteólisis la misma modificación que un suero inmune que contenga anticuerpos.

Con igual razón podría sostenerse que la especificidad antigénica del anticuerpo está localizada en el trozo separado, puesto que esta especificidad se altera por la hidrólisis enzimática. No es seguro que esta representación, groseramente mecánica, se aproxime a la verdadera esencia del problema.

A. ROTHEN (1942) estimó que una antitoxina purificada por digestión de un complejo toxina-antitoxina poseía un peso molecular menor que el de PETERMAN y PAPPENHEIMER, a saber: 90.000; por consiguiente, parece ser que el grado de pureza depende de las particularidades de la técnica empleada. Resulta interesante que, según ROTHEN, no pueda conseguirse el diagrama electroforético de un plasma antitóxico de caballo por la adición de antitoxina purificada por proteólisis a un plasma de caballo normal. El plasma antitóxico de caballo se distingue del plasma normal de caballo por una pequeña reducción de la albúmina, un débil aumento de las globulinas α y β , y un aumento tan fuerte de la globulina γ que sobrepasa la cima del fibrinógeno; en cambio, si se añade antitoxina difterica purificada a plasma normal de caballo no se observa sino un pequeño aumento de la cima de la globulina γ : ROTHEN encuentra para su observación dos explicaciones: que la globulina γ del suero inmune contenga, además de la toxina aislable, anticuerpos de actividad restringida, o que la globulina γ contenga una cantidad considerable de proteína inespecífica ("proteína inerte").

A. M. PAPPENHEIMER, H. P. LUNDGREN y J. W. WILLIAMS (1940) explican el efecto de los enzimas proteolíticos sobre los sueros antitóxicos, suponiendo que el grupo responsable de la acción antitóxica está distribuido asimétricamente en la molécula de la antitoxina; esta hipótesis ha sido corroborada por las alteraciones que se observan en dicha molécula a consecuencia de la acción de las proteasas (véase luego). E. F. PORTER y A. M. PAPPENHEIMER habían comunicado ya, en 1939, que una película monomolecular de toxina adsorbida en estearato bórico puede fijar la antitoxina; pero que, en cambio, no puede efectuarse la combinación inversa: fijar toxina sobre una película de antitoxina. La influencia del factor de dispersión explica que la molécula de antitoxina (y de otros anticuerpos) pueda desmenuzarse sin perturbar de modo considerable su función de anticuerpo; sin embargo, permanece oscuro *per qué* la estructura que condiciona la función de anticuerpo resulta más resistente frente a las influencias proteolíticas que la configuración de que depende el carácter específico de especie de la globulina inmune. Haciendo teorías en dirección a las "hipótesis de los plegamientos", pudiera opinarse que los plegamientos de los anti-

cuerpos están asegurados por combinaciones intramoleculares más firmes que los plegamientos que condicionan la especificidad de especie; pero estas especulaciones no encuentran apoyo en los experimentos que estudian el comportamiento de los anticuerpos y de los anticuerpos en capas monomoleculares (véanse pág. 80 y sigs.).

Si teniendo en cuenta los resultados experimentales consignados volvemos a la cuestión iniciada en otro lugar (véase pág. 70), relativa a las diferencias que existen entre las globulinas inmunes (prescindiendo de sus funciones de anticuerpo) y las globulinas normales de plasma sanguíneo, pudiera suponerse que se distinguen unas de otras por poseer las primeras un grupo resistente a los enzimas en el que se localiza la función anticuerpo. Sin embargo, para hacer tal generalización no se dispone de suficiente número de hechos experimentales bien comprobados.

La aplicación de sueros inmunes desespeciados con fines profilácticos y terapéuticos ofrece la ventaja de que carecen, en mayor o menor grado, de las propiedades de antígeno proteico, por lo que en ellos se reduce e incluso en ocasiones se evita por completo el peligro de un choque sérico primario o de reacciones anafilácticas. Una revisión crítica de la experiencia clínica, sólo en parte satisfactoria, obtenida con tales antisueros, se encuentra en la obra de BR. RATNER: *Allergie, Anaphylaxie und Immunotherapie* (pág. 75 y siguientes).

XVIII. RESUMEN DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE LA ESENCIA DE LOS ANTICUERPOS

Si se efectúa un balance de las consideraciones previas expuestas, estimando de modo cuidadoso y objetivo los resultados experimentales y sus interpretaciones teóricas, se llega a la conclusión de que no poseemos ningún conocimiento general y, por consiguiente, definitivo acerca del lugar y del mecanismo de la formación de los anticuerpos, ni de la naturaleza de los anticuerpos, ni de los fundamentos de su diversidad ilimitada. Quizá lo único que puede decirse es que los anticuerpos son "globulinas inmunes" y que las seroglobulinas poseen una cierta plasticidad que tal vez pueda aumentar extraordinariamente *in loco et in statu nascendi*. Pero esta concepción, admitida generalmente, no puede considerarse como la "última palabra". En particular no resulta claro por qué una globulina se transforma en anticuerpo, ni por qué

sólo las globulinas poseen la capacidad de funcionar como anticuerpos; y ni siquiera todas las globulinas gozan de esta propiedad, que se limita a una clase determinada de estas seroproteínas, que, por otra parte, no es siempre la misma. Sólo el conocimiento de la naturaleza y causas de la ilimitada variedad de los anticuerpos, puede llevar a conclusiones decisivas sobre estos problemas fundamentales.

CAPÍTULO VI

EL ANTICUERPO CONSIDERADO DESDE EL PUNTO DE VISTA DEL ANTIGENO

El anticuerpo está adaptado específicamente al antígeno, al que debe su formación, y de esta relación surgen *dos caminos que acercan al problema de los anticuerpos*. Se puede investigar primeramente *cuáles son las propiedades del antígeno que determinan la especificidad de los anticuerpos*. R. DOERR (1929 d) ha designado la suma de estas propiedades del antígeno determinantes de su especificidad con la expresión de *complejo de los determinantes inmunológicos*, que ha sido reconocida como conveniente y generalmente aceptada. Por este primer camino puede conocerse cuáles son las cualidades de los antígenos que influyen de modo exclusivo o predominante sobre la reactividad de los anticuerpos, y las que, por el contrario, carecen de influencia; pero este método no facilita necesariamente el descubrimiento de la manera de transformarse las propiedades del antígeno en el modo de reaccionar del anticuerpo, ni de lo que hemos de entender por substrato material de las innumerables reactividades de los anticuerpos. En segundo lugar puede elegirse, como objeto de la investigación, el examen del curso de la reacción *in vitro* entre distintos anticuerpos y los correspondientes antígenos. En tales investigaciones los "anticuerpos" sólo pueden emplearse en forma de antisuero o de una fracción proteica de un antisuero, lo que en cierto sentido préjuzga el valor y significación de los resultados; también se excluye de la investigación el punto más importante del problema de los anticuerpos, a saber: los procesos que se producen en el organismo generador de los anticuerpos.

Se hará una revisión de los resultados que se han conseguido investigando en los dos sentidos; para ello resulta inevitable abandonar la exposición de particularidades y presentar en primer plano aquellos resultados seguros a los que quepa atribuir una importancia fundamental.

A. LA ESPECIFICIDAD DE ESPECIE

Este concepto, que constituye el punto de partida para la enseñanza de la especificidad de los antígenos que se refleja en sus anticuerpos, se constituyó y se desarrolló con auxilio de una técnica especial designada como *reacción de precipitinas o precipitación inmune*. En 1897, R. KRAUSS observó que los antisueros provocan precipitados en los filtrados de cultivos de bacterias exentos de gérmenes, y que este fenómeno era específico, del mismo modo que los ya conocidos de la aglutinación y de la bacteriolisis; es decir, que un antisuero de cólera reacciona con los filtrados de cultivos de cólera, pero no con los filtrados de cultivos tíficos, y, en general, que la precipitación sólo se produce cuando al filtrado del cultivo se le adiciona el antisuero *homólogo*. KRAUSS (1929, pág. 1141) deduce del carácter común de la *especificidad "biológica"* que la precipitación debe considerarse como "un fenómeno de inmunidad *sui generis*", y que en la inmunización conseguida con determinados *antígenos bacterianos*, además de antitoxinas, bacteriolisinas y aglutininas, se forman otros anticuerpos que denominó, por su modo de acción, *precipitinas*.

BORDET se planteó si era justificada la limitación a los antígenos bacterianos o si, por el contrario, se obtendrían por la inyección de eritrocitos u otras células animales los mismos resultados que por la inyección de bacterias, siempre que los eritrocitos procedieran de distinta especie animal, es decir, fueran extraños al organismo, como sucede, naturalmente, en el caso de los microbios patógenos. Efectivamente, consiguió, como él mismo dice [J. BORDET (1939, página 332)], decidir fácilmente esta cuestión por la inmunización de una especie animal A con eritrocitos de otra especie B; de este modo consiguió antisueros que aglutinaban los eritrocitos de B, y, finalmente, los disolvían; ofrecían el mismo grado de especificidad que los anticuerpos bacterianos equivalentes, las aglutininas y lisinas de las bacterias [J. BORDET (1898)]. La hemoaglutinación y la hemolisis no presentan la misma forma exterior que la precipitación bacteriana porque, a diferencia de en ésta, el antígeno no se emplea en disolución, sino que, como en la aglutinación de las bacterias, se aplica en forma de una suspensión de células. Los resultados obtenidos por BORDET tuvieron en la época de su publicación la fundamental trascendencia de eliminar de un golpe el prejuicio bacteriocéntrico de la investigación inmunológica. Su consecuencia inmediata fué que, en lo

sucesivo, con el nombre de "inmunización" no se consideraron exclusivamente los procesos que reforzaban la capacidad de resistir las infecciones, sino todos los procesos cuya característica común es iniciarse por la administración parenteral de un antígeno y tener como consecuencia la aparición en el suero de anticuerpos que reaccionan específicamente con dicho antígeno; el suero que contiene anticuerpos se denominó "suero inmune" (1). Por último, se discutió que fuera imprescindible la condición de que *el antígeno procediera de una especie distinta*, condición que estaba implícita en los antiegnos bacterianos, pero que pudiera no tener validez general.

Al año siguiente de haber publicado sus investigaciones sobre los anticuerpos contra eritrocitos de otra especie, comunicó J. BORDET (1899) (y simultáneamente ТСНІСТОВІТСН) que también podían obtenerse anticuerpos por el tratamiento con *proteínas disueltas de procedencia animal (suero de caballo, suero de conejo, suero de anguila y leche de vaca)*, anticuerpos que reaccionan específicamente *in vitro* con el antígeno utilizado, formando un precipitado. Estas disoluciones naturales de antígenos proteicos animales, y muy especialmente los sueros sanguíneos, pueden prepararse de un modo sencillo y administrarse directamente por vía parenteral (y también por vía intravenosa); en los ensayos cuantitativos de precipitinas pueden obtenerse rápidamente, por simple dilución, todos los grados de concentración que se desee, sin que sean de temer la separación de fases líquidas o la formación de sedimentos; debido a estas múltiples ventajas técnicas, estas sustancias se emplearon de modo extensísimo en los experimentos que pretenden establecer la base fenológica del conocimiento de la especificidad serológica. Posteriormente se comprobó también la especificidad de las proteínas tisulares, aunque no se estudió con el mismo detenimiento. Por lo demás, las reglas más importantes se pueden deducir de los resultados obtenidos con el suero y con las proteínas del suero, de las que en lo sucesivo, por la sencillez de manejo, se hará un amplio uso. Hay que tener siempre en cuenta que la diferencia entre los antígenos sólo se conoce al reflejarse en los anticuerpos obtenidos, y que tal diferencia sólo recibe el carácter de objeto independiente después de precisar cuáles son las propiedades químicas o físicas del antígeno que determinan el modo de reaccionar de su anticuerpo.

(1) "The scientist shares with Humpty the privilege of paying words extra and making them mean what he likes" [WHITEHEAD, *Introduction to Mathematics*, citado por W. W. C. TOPLEY (1933)].

I *Diferenciación de los antígenos procedentes de especies próximamente emparentadas.*

a) *Los sueros sanguíneos de dos especies diferentes pueden ofrecer igual comportamiento en las pruebas con precipitinas (y en los experimentos anafilácticos) de modo que resulte imposible diferenciarlos por estos métodos.* Esto sucede cuando ambos sueros proceden de especies extraordinariamente próximas en el sistema natural. Especial interés ofrecen las reacciones de grupo entre las sangres de hombre y de mono que han dado ocasión a diferentes especulaciones sobre la procedencia animal del género humano; reacciones, sin embargo, que niegan decididamente autores recientes (PORTMANN y otros). Presentaremos aquí las investigaciones clásicas de G. H. F. NUTTALL, por razones biológicas de otra índole.

TABLA 3.^a

Reacciones de un antisuero precipitante obtenido por la inyección de suero humano normal a conejos.

<i>Antígenos examinados.</i>	<i>Volumen de precipitado (1).</i>
34 muestras de sangre humana.....	100 %
8 muestras de Simiidae, 3 especies de antropoides..	100 %
36 muestras de Cercopithecidae.....	92 %
13 muestras de Cebidae.....	78 %
4 muestras de Hapalidae.....	56 %
2 muestras de Lemuridae.....	0

Si se tiene en cuenta que el suero sanguíneo representa una mezcla de proteínas que difieren entre sí serológicamente (véase pág. 000), resulta improbable la completa identidad de dos sueros de especies diferentes. Este convencimiento sirvió de estímulo a investigadores que atribuían la imposibilidad de la diferenciación a errores o imperfecciones de los procedimientos aplicados. Esto se consiguió, efectivamente, en experimentos en que se utilizó como antígeno para inmunizar y reaccionar, suero total (en lugar de seroproteínas aisladas).

(1) El volumen de precipitado obtenido con el antígeno homólogo se considera como del 100 por 100, y a este volumen se refieren los obtenidos con los antígenos heterólogos.

Entre los factores de que depende la especificidad de las precipitinas hay que considerar inmediatamente *el modo de inmunizar el animal productor de anticuerpos*, que influye en el sentido siguiente: la administración reiterada del antígeno rebaja la especificidad de los anticuerpos; es decir, disminuye lo estricto de la adaptación inicial entre el anticuerpo y el antígeno empleado en la reacción preparatoria, creciendo gradualmente el número de las reacciones con sueros sanguíneos heterólogos. Este fenómeno fué confirmado por diferentes autores [H. R. WOLFE (1929, 1933, 1935), E. NICOLAS, T. SATOR], observándose más tarde análogos resultados con otros antígenos que pueden considerarse sustancias puras y unitarias (ovalbúmina cristalizada, hemoglobina) [M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 d), S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1934), A. K. BOOR y N. HEKTOËN, HEKTOËN y BOOR]; es indudable que lo que verdaderamente influye en la disminución de la especificidad de las precipitinas es el número de estímulos del antígeno.

Así se explica también que los experimentos de anafilaxia activa en cobayos resulten más apropiados para diferenciar entre sí antígenos proteicos emparentados que las reacciones de precipitinas, porque en el primer caso los animales se sensibilizan con una única inyección subcutánea de una cantidad muy pequeña, en general, de antígeno, mientras que los antisueros precipitantes suelen obtenerse forzando la producción de los anticuerpos por una inmunización lo más intensa posible, para de este modo conseguir un reactivo serológico tan sensible con respecto a una determinada proteína, que permita descubrir incluso indicios de ésta (investigaciones forenses). En el experimento de anafilaxia *pasiva*, los cobayos, en general, se preparan mediante antisueros "sumamente activos" de conejo, por lo que no suelen presentar una especificidad tan acusada como los cobayos sensibilizados por vía activa; por el contrario, ofrecen las mismas reacciones de grupo que los sueros preparados de modo pasivo cuando se someten a la reacción de precipitinas (véase la pág. 108).

La causa del comportamiento descrito no ha podido precisarse con seguridad, pero no parece que sea una sola. En general se admite la explicación de HEIDELBERGER y KENDALL, según la cual en la inmunización prolongada (incluso cuando se efectúa empleando como antígeno una proteína pura) siempre se producen más anticuerpos que los que pueden reaccionar con un gran número de grupos diferentes (determinantes inmunológicos) del antígeno. Este juicio se puede completar por la hipótesis de que los determinantes inmunológicos de un antígeno, o de una mezcla de antígenos, poseen distinta

actividad y que los determinantes más débiles sólo entran en acción mediante una inmunización más intensiva (véase pág. 113). T. SATOH señala que también puede perjudicar la especificidad un gran contenido de anticuerpos (precipitinas); este autor consiguió reducir, e incluso eliminar, las reacciones con antígenos heterólogos sin más que diluir hasta un cierto grado (por ejemplo, 25 veces) las precipitinas de elevado título (frente al antígeno homólogo; este fenómeno también se ha observado por A. K. BOOR y L. HEKTOËN (véase también HEKTOËN y BOOR) en experimentos efectuados con hemoglobina.

Como aplicación práctica de lo anterior hay que tener en cuenta que para la investigación serológica directa de sueros sanguíneos o de otros antígenos proteicos de especies animales próximamente emparentadas, en general no resultan apropiadas las precipitinas obtenidas por reiteradas inyecciones del antígeno. Deben, por consiguiente, emplearse antisueros obtenidos del animal donante después de haber administrado a éste una sola inyección de antígeno, y que a la vez reaccionen con dicho antígeno a elevada dilución; también puede procederse a eliminar las reacciones secundarias de precipitinas obtenidas por hiperinmunización. Esto en ocasiones se consigue por una simple dilución del antisuero (véase antes) o por adsorción selectiva de las precipitinas secundarias, para lo que se le incorporan al antisuero los antígenos proteicos heterólogos, se separa el precipitado producido y se utiliza el líquido sobrenadante para la prueba principal. La separación de las precipitinas secundarias también puede efectuarse *in vivo*, para lo que al animal inmunizado, en cuya sangre existen las precipitinas secundarias, se le inyecta el correspondiente antígeno heterólogo y poco tiempo después se le somete a la sangría que suele suministrar un suero inmune específico [K. NISHEGORODZEFF]. A esta técnica corresponde, en el experimento anafiláctico, la desensibilización parcial de todo el animal o de los órganos aislados (cuerpo de los úteros, etc) mediante antígenos heterólogos, ya efectuada por DAKIN y H. DALE, y por H. G. WELLS y Th. OSBORNE.

P. UHLENHUTH (1905 b) describió y designó con el nombre de *inmunización cruzada* otro método biológico interesante. Si se tratan gallinas con sangre de liebre se obtiene un suero que precipita tanto con la sangre de liebre como con la de conejo; si, por el contrario, se inmunizan conejos con sangre de liebre o con suero de liebre, se obtiene una precipitina que no reacciona con el suero de conejo, sino sólo con el de liebre. Siguiendo a K. LANDSTEINER (1936), este fenómeno se atribuye, con gran verosimilitud, a que los antígenos proteicos de ambas especies animales, tan íntimamente emparentadas,

poseen en común varios determinantes (funciones antigénicas potenciales); en el organismo de la gallina pueden actuar todos, y, en cambio, en el del conejo sólo lo hacen aquellos por los que difieren las seroproteínas de liebre de las de conejo (véase pág. 115). El método se ha aplicado con éxito en otros casos, en los que también se utilizaba como reacción el ensayo de precipitinas y como antígeno un suero sanguíneo (1). P. UHLENHUTH (1905) señaló que el suero de monos (*Cercopithecus fuliginosus* y *Macacus rhesus*) inmunizados intensivamente con suero humano provoca en sangre humana diluida una manifiesta turbidez, mientras que no daba ninguna reacción con la sangre de monos de especies próximas. Este resultado tenía interés principalmente teórico, ya que NUTTALL había establecido las diferencias entre la sangre humana y la de las especies de monos citadas, en ensayos cuantitativos de precipitinas (véase pág. 102). Más importante sería la diferenciación serológica entre hombres y antropoides. El chimpancé sólo excepcionalmente reacciona frente a la inyección de suero humano con formación de precipitinas; sin embargo, en una ocasión se consiguió obtener de un chimpancé un antisuero que reaccionaba claramente con el suero humano y con el de chimpancé daba resultado completamente negativo [K. LANDSTEINER y P. H. LEVINE (1932)].

No existe ningún método universal que permita en todos los casos diferenciar entre sí los sueros sanguíneos, u otros antígenos proteicos, de especies animales muy emparentadas. Muchas veces fracasa el método de la inmunización cruzada; por ejemplo, no permite dife-

(1) Las observaciones de R. E. SHOPE también deben estar relacionadas, en opinión de H. P. TREFFERS (1944 b), con la "inmunización cruzada"; según este autor, el suero de cerdos que han sufrido la gripe porcina protege a los ratones de la infección por siete estirpes de virus de dicha enfermedad, mientras que el antisuero de conejos inmunizados con dichas estirpes en general sólo neutralizan una parte de dichas siete estirpes; en dos casos, incluso nada más que la utilizada para inmunizar el conejo, y sólo excepcionalmente, las siete. Fundándose en su comportamiento contra el suero de cerdo convaleciente, se suponía que las siete especies eran idénticas, pero se diferenciaron, como se ha dicho, por los ensayos de neutralización cruzada con sueros de conejo. Según opinión de SHOPE, las siete estirpes investigadas poseen la misma composición, pero en ellas los grupos antigénicos están ordenados de modo distinto, y esta distinta disposición sólo se acusa en los conejos. Sin embargo, caben otras muchas interpretaciones, quedando en definitiva como bien establecido únicamente el hecho de que los sueros inmunes que proceden de individuos infectados manifiestan una especificidad menor que los antisueros obtenidos por inmunización artificial; experiencia que también se ha observado en otros casos análogos.

renciar el suero de caballo del de asno, ya que el caballo no produce ninguna precipitina específica para el suero de asno; tampoco los carneros suministran precipitinas para el suero de cabra (véase P. UHLENHUTH y W. SEIFFERT, obra citada, pág. 373); también fracasa el intento de diferenciar el suero de los cobayos ordinarios del suero de los cobayos brasileños mediante inmunización cruzada, porque los primeros no reaccionan frente a la inyección del suero del cobayo brasileño (*Cavia rufescens*) con formación de una precipitina que sea estrictamente específica para el suero inyectado [F. J. HOLZER]. Con frecuencia hay que eliminar selectivamente las precipitinas secundarias del suero inmune, lo que se efectúa precipitándolas mediante el antígeno heterólogo disuelto [KISTER y W. WEITHARDT], o, más fácilmente, separándolas por su adsorción en células heterólogas (eritrocitos, células de órganos) [E. FRIEDBERGER y JARRE, E. FRIEDBERGER y G. NEISSNER] (también puede prepararse el adsorbente coagulando por el alcohol el antígeno disuelto [D. HALLMANN]. Esta purificación, efectuada eliminando por adsorción las precipitinas secundarias, suele dar, aunque no siempre, el resultado deseado [K. MAKINO, H. R. WOLFF (1933), E. NICOLAS, S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1934, 1936 b), D. HALLMANN y otros]. Además cabe inmunizar siguiendo un procedimiento que resulte más adecuado, o, simplemente, afinar la técnica de valoración de las precipitinas; o, por último, buscar de modo empírico cuál es la especie animal cuyos anticuerpos, en cada caso, reflejen del modo más nítido la especificidad del antígeno. Por ejemplo, con sueros precipitantes de conejo se pueden diferenciar fácilmente los sueros de ratón y de rata [P. UHLENHUTH y VEIDANZ, R. TROMMSDORFF, F. R. GRAETZ]; en cambio, mediante precipitinas de conejo no se consiguen diferenciar los sueros de gallina y de paloma, ni incluso de ganso. Puede admitirse aquí la explicación utilizada para interpretar el fenómeno de la inmunización cruzada; en el organismo del conejo actúa lo que poseen en común las proteínas de las aves, pero sólo se aprecian las diferencias de las proteínas de los roedores, ya que el conejo es un roedor. Esto puede comprobarse de un modo doble. Por una parte, porque pueden obtenerse precipitinas específicas de gallina con respecto al suero de paloma, y recíprocamente precipitinas de paloma específicas para el suero de gallina [UHLENHUTH y SEIFFERT, obra citada, pág. 373], y por otra, porque los antisueros de conejo no sólo permiten diferenciar los sueros de ratón y rata, sino que resultan apropiados para distinguir, en general, los sueros de roedores incluso

cuando se trata de sueros procedentes de especies muy próximas [R. A. HICKS y C. C. LITTLE, H. P. LEVINI y P. A. MOODY].

Quien no opere en este campo como especialista y se limite a considerar los datos promedios se asombra de la especificidad, es decir, de las diferencias entre las proteínas del suero sanguíneo que se aprecian por vía serológica. Sin embargo, G. H. WELLS (1929, pág. 67) subraya muy acertadamente que la especificidad inmunológica no es sino una manifestación particular de la especificidad biológica que domina todos los procesos de la vida. Una manifestación de especificidad química tan típica como la producción de una antitoxina especial por un caballo inmunizado con el veneno del bacilo diftérico es, por ejemplo, la imposibilidad de que un huevo se fecunde más que por una determinada especie de espermatozoides, y el que el huevo, durante su desarrollo, desenvuelva las formas y funciones características de su especie, de modo que las hojas del arce se vuelven rojas en el otoño y las del abedul amarillas. El hecho, escribe WELLS, de que un perro pueda seguir las huellas de su amo hasta encontrarlo y que lo distinga por su olor de todas las demás personas, suministra una prueba de que cada hombre es un individuo químico. La naturaleza, como muestra este ejemplo, sobrepasa la especificidad de especie y se eleva hasta la especificidad individual, que representa un máximo al que se acerca la inmunología en las investigaciones de los grupos sanguíneos (1). En este sentido, el perro que reconoce a su amo por el olfato encuentra una analogía singular: los ideosincrásicos que son sensibles a emanaciones de perro reaccionan con frecuencia sólo frente a determinadas razas caninas [S. B. HOOKER (1944)].

II. *Especificidad natural de un orden más alto.*

Cuando se inmuniza un conejo de modo intensivo con suero de carnero, se obtiene un antisuero que no sólo precipita con suero de carnero, sino con una serie de sueros de otros mamíferos; pero que, en cambio, no precipita con suero de gallina. La tabla 4.^a, procedente

(1) R. W. CUMLEY y M. R. IRVIN (1943) pudieron demostrar que entre los sueros sanguíneos de diferentes hombres existen diferencias individuales análogas a las establecidas para los hematíes. Tales diferencias se observaron inmunizando conejos con sueros de diferentes individuos y sometiendo las precipitaciones obtenidas a la adsorción con sueros procedentes de la misma o de diferente persona. En opinión del autor, hasta ahora no está claramente establecido si los antígenos son seroproteínas u otras sustancias.

de un trabajo de R. DOERR y RUSS, puede ilustrar este comportamiento.

TABLA 4.^a

A 0,1 mil. de suero anticarnero de conejo se le adicionan 1,0 ml. de disoluciones a dilución creciente de suero normal de diferentes especies; las lecturas se efectúan después de mantener la mezcla dos horas en el termostato. +++ representa un precipitado fuerte, ++ una floculación manifiesta, + enturbiamiento; 0 significa que el líquido continúa transparente.

Diluciones.	Suero normal utilizado como antígeno.						
	Carnero.	Cabra.	Vaca.	Cerdo.	Hombre.	Caballo.	Gallina.
50	+++	+++	+++	+++	+++	++	0
100	+++	+++	+++	+++	++	+	0
500	+++	+++	+++	++	0	0	0
1000	+++	+++	+++	+	0	0	0
2000	+++	+++	+++	+	0	0	0
3000	+++	+++	+++	0			
4000	+++	+++	++	0			
5000	+++	+++	++	0			
6000	+++	++	+				
7000	+++	++	+				
8000	++	++	+				
9000	+	+	+				
10000	+	+	+				
14000	+	+	0				
20000	+	+	0				

Este experimento se corroboró por experimentos de anafilaxia pasiva en cobayos. Se prepararon una serie de cobayos por inyección intraperitoneal de 1,0 ml. de un mismo antisuero de carnero, y al cabo de veinticuatro horas recibieron como inyección desencadenante las dosis de los sueros normales que se indican en la tabla anterior, administrados intravenosamente. Con el suero de carnero y con el de cabra la dosis mínima letal resultó ser de 0,006 ml., con el suero de vaca 0,02 ml. y con el suero de cerdo 0,1 ml.; el suero humano provocó síntomas graves cuando se administró en una dosis de 1,0 ml., pero sobrevivió el animal; 2,5 ml. de suero de caballo ocasionaron únicamente síntomas ligeros y 1,5 ml. de suero de gallina no provocaron ni la menor reacción.

H. E. REESER, E. FRIEDBERGER y COLLIER, P. MANTEUFÉL y H. BEGER, E. FRIEDBERGER y G. MEISSNER, A. A. BOYDEN, T. SATOH y otros autores han descrito tales precipitinas. (Véanse en nuestra obra las consideraciones acerca del efecto de la hiperinmunización sobre

la amplitud de especificidad de los sueros inmunes (pág. 102.) Aquí, naturalmente, no puede hablarse ya de "reacciones de parentesco" en el sentido de que la reciprocidad de reacción entre unos sueros heterólogos corresponda a la afinidad que, en el sistema de clasificación zoológica natural, exista entre las especies que suministran los sueros. La circunstancia de que la amplitud de la reacción se extienda a casi todos los mamíferos, pero que no alcance a las aves, sugiere, no obstante, el pensamiento de que se trata de una reacción de parentesco *que está condicionada por la semejanza entre las proteínas de la sangre de los mamíferos*. Esto parece más probable después de las interesantes comunicaciones de F. A. SIMON (1941, 1942), quien comprobó, por el método de escarificación, la sensibilidad de la piel de enfermos de la fiebre del heno frente a distintos sueros sanguíneos, encontrando que muchas personas reaccionaban positivamente frente al suero de los mamíferos más diversos (caballo, vaca, perro, cobayo, cerdo, rata, ratón, conejo, oveja, gato, elefante, manicú, mono y delfín). Como había que descartar que existieran contactos sensibilizadores con muchos de los animales reseñados (elefante, manicú, cobayo y delfín), y tampoco parecía probable que cada contacto arbitrario con un mamífero condujera a una sensibilización específica para el mismo individuo, SIMON (1942) se inclina a suponer que en el suero de mamíferos existe, en cantidad y ordenación variables, un número relativamente pequeño de determinantes alérgicos comunes, que son independientes hasta un cierto grado de los determinantes específicos de especie, pero que son suficientes para conseguir una apreciable sensibilización. SIMON (1941, 1942) estableció en todo caso: 1, que ninguna de las personas investigadas por él reaccionó frente al suero de rana o de gallina, y 2, que en el suero de los enfermos estudiados se observaba la presencia de anticuerpos (reaginas) que permiten sensibilizar pasivamente, frente a las proteínas del suero de los diversos animales, la piel de individuos normales.

Con respecto al principio de la inmunización cruzada, es digno de notarse que la "especificidad de mamífero" puede adquirir validez en la producción de anticuerpos de conejos y hombres, es decir, de mamíferos.

III. ESPECIFICIDADES PARTICULARES DENTRO DEL CUADRO DE LA ESPECIFICIDAD DE ESPECIE

Del mismo modo que la especificidad de especie puede combinarse con *especificidades de un orden más elevado*, a saber: con especificidades para especies próximas o con especificidades de una carácter aún más general (especificidad de mamífero, especificidad de ave); reciprocamente, dentro de la especificidad de especie pueden descubrirse *especificidades particulares subordinadas*.

La primera demostración de tales especificidades particulares dentro del cuadro de la especificidad de especie se encontró en las proteínas del suero sanguíneo. En 1901, LEBLANC demostró que las euglobulina, seudoglobulina y albúmina obtenidas por el fraccionamiento de un mismo suero sanguíneo se distinguen entre sí por reacciones de precipitinas, y todas ellas difieren de la hemoglobina procedente del mismo animal. Estos datos fueron corroborados por L. MICHAELIS (1904), y a continuación por una serie de autores [H. H. DALE y P. HARTLEY, R. DOERR y W. BERGER (1922 a, 1922 b), E. STERN, KATO y otros], utilizando reacciones de precipitinas y, en parte, experimentos anafilácticos; DOERR y BERGER (1922 a) señalaron que la seroalbúmina precipitada primero parcialmente con el 56-66 por 100 de sulfato amónico y separada después por salado mediante una concentración salina más alta, puede desdoblarse en dos albúminas parciales que poseen diferente comportamiento serológico. BAUER y ENGEL comunicaron en 1912 que el antisuero obtenido mediante fibrinógeno de sangre de vaca no presenta las reacciones de precipitinas ni de fijación de complemento con el suero de vaca, y recíprocamente; y posteriormente se reconoció el carácter de antígeno *sui generis* al seromucoide [J. H. LEWIS y G. H. WELLS]. G. H. WELLS (1929), en la segunda edición de su obra sobre los fundamentos químicos de la inmunidad, dijo que, como resumen, todo plasma sanguíneo de un mamífero contiene seis antígenos diferentes (fibrinógeno, euglobulina, seudoglobulina, dos albúminas y seromucoide).

El perfeccionamiento progresivo de los métodos para fraccionar proteínas junto con la investigación química de los productos obtenidos por dichos fraccionamientos llevaron a la conclusión de que el número de proteínas contenidas en el plasma sanguíneo o en el suero sanguíneo era mayor que lo que se había supuesto (E. J. COHN, 1941).

Hasta la fecha se conocen las siguientes seroproteínas diferenciables serológicamente: 3 globulinas [F. E. KENDALL (1937-1938), T. HARRIS y H. EAGLE], 2 albúminas cristalizables [L. F. HEWITT (1937, 1938 b), R. A. KERWICK, P. G. H. GELL y M. E. YUILL], el seromucoide (véase antes), 1 globoglucóide [L. F. HEWITT (1938 a, 1938 b)] y 1 seroglucóide [L. F. HEWITT (1937, 1938 b, 1938 c)]. Esta lista no incluye sino los componentes del suero. Si se tienen en cuenta criterios físicos (tales como la solubilidad o insolubilidad en agua exenta de electrolitos), las propiedades químicas (combinación con lípidos, ácidos grasos e hidratos de carbono) y las diferentes actividades biológicas de los productos del fraccionamiento que se observan en el tubo de ensayo y en el organismo, el cuadro de las proteínas del suero se complica mucho más aún, como puede observarse en el esquema de E. J. COHN reproducido en la página 27, donde se resumen los resultados de las amplias investigaciones del Blood Substitutes Sub-Committee of the National Research Council.

El hecho de que ciertas actividades, como las de isoaglutininas, las de los anticuerpos contra el sarampión, las de los factores de la función del complemento, puedan cumplirse por determinadas fracciones aisladas, fracciones que pueden concentrarse por procedimientos adecuados, demuestra que las proteínas aisladas de un mismo suero, dinámica y serológicamente distintas, no deben concebirse como productos artificiales producidos por el fraccionamiento mismo. En especial, con respecto a la distinción entre albúmina y globulina, productos que en un principio se pensó que se producirían al fraccionar las seroproteínas, R. DOERR y W. BERGER (1922 c) adujeron en contra una prueba decisiva al poner de manifiesto que se trata de antígenos no sólo de especificidad particular, sino también de actividad completamente distinta; si se preparan cobayos con una mezcla de una parte de albúmina y 100 de globulina procedentes del mismo suero, los animales reaccionan anafilácticamente frente a la globulina, pero no frente a la albúmina; por el contrario, si se cambian las proporciones de la mezcla antigénica (100 partes de albúmina para una parte de globulina), los animales se sensibilizan tanto contra la albúmina como contra la globulina. Por último, si se inmunizan conejos con el suero total de otra especie, se forman anticuerpos contra la globulina y la albúmina; si un antisuero de este tipo se mezcla con suficiente cantidad de globulina, se produce un precipitado que puede centrifugarse, y el líquido sobrenadante no precipita ya con globulina, pero sí con albúmina [K. LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1924)].

En tratados recientes todavía se encuentran expresiones como

"proteína humana", "proteína de mono", "proteína de caballo", etcétera (véase, por ejemplo, B. P. UHLENHUTH y W. SIFFERT), que únicamente son admisibles como expresión abreviada de la procedencia de los antígenos proteicos, sin especificar si se trata de proteínas puras o de determinadas mezclas proteicas. Pero debieron evitarse tales designaciones y hablar de sueros humanos, de mono o de caballo, con las que se designa, además de la procedencia, la índole del producto; y el plasma o el suero sanguíneo no es el único líquido orgánico constituido por una mezcla de sustancias que difieren entre sí por su función fisiológica y sus propiedades físicas, químicas y serológicas; también tienen una composición compleja el líquido céfalo-raquídeo, la leche, la clara y la yema de huevo, etc., que a su vez son totalmente distintos del plasma sanguíneo.

R. DOERR y W. BERGER (1922 b), fundándose en sus investigaciones acerca de la albúmina y globulina del suero sanguíneo, hacen observar que cada una de estas proteínas posee dos clases de especificidad, una condicionada por su procedencia de una especie animal determinada y otra que distingue el tipo de proteínas de las restantes proteínas con la misma especificidad de especie. En tales proteínas deben, pues, existir al menos dos grupos determinantes de la especificidad, o "determinantes inmunológicos", de lo que parece deducirse que ninguna de ambas especificidades depende de la estructura total de la molécula proteica, concepto al que, por otra parte, ya habían llegado H. G. WELLS y Th. OSBORNE en sus intentos de analizar los fundamentos químicos de la especificidad de las proteínas vegetales. Si fuera cierto que todas las proteínas, con la misma especificidad de especie (aunque posean especificidades particulares por las que se distinguen entre sí las diversas proteínas procedentes de la misma especie animal), contienen un determinante idéntico en el que descansa la común especificidad de especie, todas las proteínas especiales existentes en cada especie animal deberían ofrecer reacciones de parentesco; por ejemplo, la albúmina del suero humano debería originar en el cobayo un anticuerpo que reaccionara también con la globulina del suero humano. Pero este fenómeno no se produce, como observaron ya R. DOERR y V. RUSS (1909) y han confirmado modernamente, con técnica más precisa, H. P. TREFFERS, MOORE y HEIDELBERGER. Estos autores inmunizaron cobayos con albúminas y con globulinas de sueros de caballo y de cabra, y observaron que las albúminas de cabra y de caballo daban reacciones cruzadas, y que del mismo modo se comportaban las globulinas de las mismas procedencias; pero no pudo apreciarse ningún parentesco entre la albúmina y la globulina

del suero equino, ni entre la albúmina y la globulina del suero de cabra. K. LANDSTEINER (1941, pág. 61) opina, pues, lo siguiente: "The possibility that the various proteins within one species are somehow related in structure is not supported by any actual evidence"; pero añade que si existiera tal comunidad de estructura se entendería más fácilmente cuál es el motivo por el que las proteínas homólogas no provocan, a pesar de su diversidad, la formación de anticuerpos, como si las células del animal percibieran que, dentro de su diversidad, poseen la propia procedencia. H. P. TREFFERS (1944 b, pág. 75) dice aproximadamente lo mismo cuando no niega la posibilidad de que exista una estructura común de esta índole, aunque añade que hasta ahora no ha sido "descubierta".

No resulta fácil, efectivamente, formarse una idea precisa de la proporción recíproca en que se encuentran los dos determinantes supuestos por R. DOER y W. BERGER (1922 b), ni de la causa por la que uno de ellos, el específico de especie, carece de validez en experimentos de cierto tipo (por ejemplo, en la comparación serológica entre la albúmina y la globulina de un mismo suero). Pudiera pensarse que los determinantes de la especificidad particular de la albúmina, globulina, etc., no son sino grupos especiales dentro de la estructura específica de especie, estructura que, dicho con otras palabras, constituye una unidad de orden superior que no puede desdoblarse en componentes distintos. El hecho de que cuando dos proteínas de la misma procedencia se someten a pruebas de inmunidad cruzada, se observe que los determinantes para la especificidad particular inhiben completamente el carácter de especificidad de especie, parece demostrar a primera vista la ausencia del factor específico de especie. Pero, probablemente, la prueba fracasa porque el determinante de la especificidad particular es mucho más activo que la estructura específica de especie, de modo que lo único que puede apreciarse es la especificidad particular. Tan sólo si se elimina esta "concurrancia", utilizando proteínas de la misma especificidad particular, pero de distinta especificidad de especie, se manifiesta la especificidad de especie por el parentesco serológico que acusan; la seroalbúmina de caballo y la de cabra, sometidas a las pruebas de TREFFERS, MOORE y HEIDELBERGER, no se comportan como productos idénticos, de acuerdo con el concepto de especificidad de especie. No se llegará a conclusiones definitivas hasta que se pongan en claro los fundamentos de la especificidad de especie de las proteínas, lo que no se ha conseguido hasta la fecha (véase pág. 125).

Entretanto sólo podemos decir que no se ha conseguido obtener

in vitro, a partir de albúminas, "globulinas artificiales" que fueran serológicamente idénticas a las seroglobulinas naturales, o que estuvieran más íntimamente emparentadas con ellas que con las albúminas nativas [G. FRANCONI, S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1933 a)]. Por el contrario, resulta relativamente fácil debilitar la especificidad de especie por diversos medios (aplicación de calor, tratamiento con ácidos), en ocasiones tan profundamente, que si se inmuniza un conejo con una seroproteína alterada, suministra una precipitina que reacciona con las más diversas seroproteínas alteradas por el mismo procedimiento, cualquiera que sea la especie de mamífero de que procedan las seroproteínas. Un ejemplo de "especificidad de mamífero" (véase página 109) artificial de este tipo se reproduce en la siguiente tabla de J. FUTHER:

TABLA 5.^a

Reacciones que da, con el suero de diversos mamíferos, una precipitina obtenida por la inmunización de un conejo con suero de bovino hervido.

Diluciones del antígeno.	A. Reacciones con sueros nativos de mamíferos.					
	Vaca.	Oveja.	Caballo.	Hombre.	Cobayo.	Conejo.
100	+	+	0	0	0	0
1000	+++	++	0	0	0	0
10000	++	++	0	0	0	0
100000	+	+	0	0	0	0

B. Reacciones con los mismos sueros calentados a 100°						
100	+++	++	+	+	0	0
1000	+++	+++	++	++	indicios de turb.	+
10000	+	turbidez	turbidez	turbidez	0	turbidez
100000	0	0	0	0	0	0

Es digno de observarse que también se produce una débil reacción con el suero de conejo calentado, es decir, con el coctosuero del animal inmunizado.

Los datos reunidos acerca de la "desespecificación" de proteínas antigénicas por el calor son muy dispares. J. FURTH, UWAZUMI y otros autores afirman que tales "coctoantígenos" presentan una especificidad menos estricta, es decir, que aumenta el número de los antígenos con que reaccionan los antisueros (precipitinas) obtenidos con ellos; estos resultados están en contradicción con los de otros trabajos, según los cuales la inmunización con sueros coagulados por el calor originan precipitinas con especificidad muy acusada [H. BEGER (1924), R. ROSENBERG (1926)]. K. FUJWARA y DUJARRIC DE LA RIVIERE y KOSSOVITZ

no pudieron apreciar ninguna modificación esencial de la especificidad, y A. ROTHEN y K. LANDSTEINER (1942), en experimentos con ovalbúmina desnaturalizada por el calor procedente de gallinas y de gallinas de Guinea, pudieron diferenciar estas proteínas tan íntimamente emparentadas mediante los antisueros de los coctoantígenos, especialmente cuando aplicaban el método de absorción. En cambio, los mismos ROTHEN y LANDSTEINER, al examinar el efecto del calor sobre la albúmina y globulina del suero de caballo, no encontraron sino una pequeña diferencia entre las reacciones subsiguientes de estas seroproteínas calentadas, cuando son tan distintas, en cambio, en estado nativo. A su publicación no deducen ninguna conclusión acerca de la causa de lo contradictorio de los resultados. El análisis electroforético del suero de caballo demuestra que basta calentar a 65-70° para alterar considerablemente el estado nativo (véase pág. 35); pero no puede juzgarse el grado en que tales alteraciones influye sobre la especificidad del antígeno.

IV. HORROR AUTOTOXICUS. ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DE LA MISMA ESPECIE

Con la expresión *horror autotoxicus*, P. EHRLICH quiso caracterizar las consecuencias que debe experimentar el organismo cuando produce anticuerpos contra sus propias proteínas o contra proteínas específicas de su especie. La experiencia enseña que las proteínas de la propia especie normalmente no pueden desencadenar ninguna producción de anticuerpo.

Cuando al efectuar un experimento de este tipo se obtenga resultado positivo debe considerarse, en primer lugar, que las proteínas, al separarse de los líquidos y tejidos del cuerpo, han podido experimentar transformaciones que impliquen la pérdida de su especificidad de especie. Es sabido que el suero de conejo, cuando se trata con yodo, ácido nitroso o formaldehído, o se calienta a 120° (UWAZUMI), adquiere la capacidad de provocar en el conejo la formación de precipitinas para el suero de conejo alterado del mismo modo. Probablemente basta almacenar un suero durante algún tiempo, con o sin adición de sustancias conservadoras, para que se transforme de modo que pueda actuar como antígeno frente a la propia especie, lo que explicaría el choque o la enfermedad del suero que experimentan el hombre y los animales después de recibir repetidas inyecciones de suero de la misma especie [consúltese R. DOERR (1929 b, pág. 803, y 1922, pág. 138)], caso de que no jueguen un papel las diferencias individuales de los sueros (véase la nota al pie de la página 107). Especialmente hay que tener en cuenta posibles transformaciones espontáneas de la especificidad al manejar sustancias sólidas, tejidos

desecados por ejemplo, que luego hayan de disolverse por la adición de ácidos, álcalis, antiformina, etc.

Por consiguiente, hay que mirar siempre con reserva las comunicaciones que conciernen a la formación de anticuerpos por la inmunización con proteínas de la misma especie. Se admite que la demostración de un resultado positivo va ligada a la condición de que el antígeno proteico correspondiente no es específico de especie o sólo lo es en pequeño grado, es decir, que se encuentra en forma idéntica o muy semejante (desde el punto de vista serológico) en numerosas especies muy distantes entre sí en el sistema natural. Esta condición no es, sin embargo, suficiente en todos los casos, como enseña el muy conocido de la proteína del cristalino, descrito por primera vez por Th. UHLENHUTH (1903). La precipitina obtenida por la inmunización de un conejo con disolución de cristalino de vacuno reacciona con disoluciones obtenidas de cristalinos de vaca, hombre, caballo, cordero, cerdo, corzo, cobayo, ratón, rata, erizo e incluso de conejo, y da también reacciones con los cristalinos de aves y de animales de sangre fría; sin embargo, ofrece una dificultad inesperada la producción de anticuerpos por la inmunización de conejos con cristalino de conejos, o generalizando, la inmunización con *cristalino de la propia especie*; la carencia de especificidad de especie, que alcanza un máximo en la sustancia del cristalino, no implica, por consiguiente, que un tal antígeno, *extraño al cuerpo*, pueda ejercer su *ictus immunisatorius*. Un segundo caso muy semejante, aunque no completamente idéntico, es el descrito por E. WITEBSKY y J. STEINFELD: inmunizando conejos con emulsión de cerebro de otras especies se obtienen antisueros que reaccionan con la mayor parte de las suspensiones de cerebro de las especies animales más dispares, incluso con el cerebro de conejo; no obstante, no se consigue la formación de anticuerpos cuando los conejos se tratan con *suspensión de cerebro de conejo*.

E. WITEBSKY y E. STEINFELD (1927, 1928) observaron que los antisueros del cristalino dan la reacción de fijación del complemento con los extractos alcohólicos del cristalino de diferentes especies animales, y dedujeron de ello que los extractos acuosos de cristalino contienen, además de proteínas específicas, un lipóide común combinado con dichas proteínas, que es la sustancia dominante en el proceso de la inmunización, y debido a ella no se manifiestan las diferencias específicas de las proteínas de cristalino en la producción de los anticuerpos. Esto explicaría la dificultad o imposibilidad de obtener anticuerpos por el tratamiento con cristalinos de la misma especie: el cristalino propio contiene el lipóide común; pero éste, por sí solo,

no puede actuar como un antígeno completo, necesitando para adquirir esta propiedad estar combinado con proteínas extrañas que faltan en el cristalino de la misma especie. El mismo mecanismo, según WITEBSKY y STEINFELD [consúltese también E. WITEBSKY, 1929)], debe ser la causa de los fallos de inespecificidad de los antisueros de cerebro. La idea de que el efecto de las estructuras proteicas con especificidad de especie está reprimido por los componentes activos que se combinan con ellas para constituir un antígeno concuerda en todo caso con el principio de la concurrencia de determinantes dentro de la misma molécula de antígeno, lo que explicaría por qué en ciertos experimentos sólo se pueden poner de manifiesto las especificidades particulares de las proteínas de una especie animal, mientras que su especificidad común de especie permanece oculta (véase pág. 104).

En la literatura que concierne a estos estudios sólo se encuentran escasos datos acerca de la formación de anticuerpos frente a sustancias (proteínas) existentes en el organismo del mismo animal, es decir, frente a sustancias propias, y la mayor parte de lo publicado no puede aceptarse sin una previa comprobación.

F. F. KRUSIUS (1910 a), por ejemplo, ha señalado que pueden sensibilizarse cobayos por inyección intraocular o discisión de su propio cristalino y desencadenar por la misma operación un choque anafiláctico; otros autores pretenden también haber sensibilizado cobayos por cristalino de la misma especie e incluso del mismo individuo [P. UHLENHUTH y HÄNDEL, ANDEREJEW, G. KAPSENBERG]. Estos trabajos no han quedado sin réplica, señalándose que, en los casos en que se han obtenido resultados positivos, los cobayos se sensibilizan con mucha dificultad con cristalino de cobayo y la dosis desencadenante intravenosa letal es extraordinariamente alta (G. KAPSENBERG); es decir, que los datos relativos al efecto antigénico que ejerce la propia sustancia del cristalino resultan cuantitativamente confusos (1). KRUSIUS (1910 b) señala también que el cobayo puede sensibilizarse por anafilaxia activa con queratina de cobayo; pero en sus

(1) G. KAPSENBERG observa el hecho importante, hasta ahora poco aclarado, de que los cobayos sensibilizados con cristalino de la misma especie reaccionan sólo frente a la reinyección de sustancias de cristalino de la misma especie, pero no de especies distintas (hombre, cerdo o conejo); por el contrario, si los animales se preparan con cristalininos de otras especies (hombre, cerdo, conejo), puede desencadenarse el choque anafiláctico con cristalino de la misma especie (cobayo). No se ha investigado la causa de este fenómeno; pero en todo caso habla contra la opinión de que el cristalino de todos los mamíferos contenga un antígeno idéntico desprovisto de toda especificidad de especie.

pruebas los tejidos córneos se disolvieron en antiformina (véase página 115). Según L. HEKTOËN y SCHULHOFF, por la inmunización de cobayos con tireoglobulina, proteína del tiroides que contiene yodo, se obtienen antisueros que reaccionan con las tireoglobulinas de diversos mamíferos, resultado que también se consigue por la inmunización con la tireoglobulina de conejo; pero esta falta completa de especificidad de especie sólo es aparente, ya que si se inmuniza con pocas inyecciones se obtienen antisueros que manifiestan una clara especificidad de especie; el predominio sobre las tireoglobulinas de especies animales poco emparentadas sólo se consigue después de una inmunización prolongada (véase pág. 103) o calentando a ebullición la tireoglobulina (véase pág. 114). Con ello no se esclarece de ningún modo el problema, como subraya E. WITEBSKY (1929), fundándose en sus propias investigaciones. También existe una afirmación de G. BRUYNOCHE según la cual las gallinas y gallos responden a la inyección de ovalbúmina de huevos de gallina, formando "isoprecipitinas" para dicha sustancia. La precipitación, sin embargo, sólo aparece cuando se mezclan grandes cantidades de antisuero (0,4 ml.) con disoluciones muy concentradas de ovalbúmina, y después de mantener la mezcla durante dos horas en el termostato y doce horas en nevera, e incluso en estas condiciones forzadas, la reacción transcurre de modo tan manifiestamente débil, que no conduce a la formación de un precipitado, sino tan sólo al enturbamiento de la mezcla. En tales condiciones es muy fácil que se produzcan resultados sólo positivos en apariencia; H. SENCES no pudo conseguir la producción de anticuerpos por la inmunización de patos con clara de huevo de pato, aunque para descubrirlos, además de la reacción de precipitación, utilizó la reacción, más sensible, de fijación del complemento. Únicamente parece libre de objeciones la obtención de precipitinas para la caseína por inmunización de cabras con caseína de cabra (J. H. LEWIS); la producción espontánea que puede conseguir un título elevado de isoprecipitinas para extractos de testículo de la misma especie que se observa en el suero de machos de diferentes especies (gallo, paloma, ganso, cobayo, conejo, hombre) cuando está iniciada la espermatogénesis (C. PICARDO y W. ROTTER (1937, 1938); y, por último, la difícil aunque posible producción de anticuerpos inmunizadores frente a la sustancia del cristalino propio (véase antes).

En determinados órganos se encuentran antígenos que poseen escasa especificidad de especie (cristalino, tiroides, cerebro), a los que se designa como específicos de los órganos, expresión que puede conducir a la opinión de que en cada órgano existe un único antígeno

que lo caracteriza y cuyas funciones inmunológicas son independientes en alto grado de la especie animal, estando determinadas por el metabolismo y las funciones fisiológicas del órgano. Esta opinión resultaría, como entre otros ha subrayado R. DOERR (1929, b, página 803), falsa en todos los respectos. Tampoco resulta satisfactoria la expresión de antígeno "extraño a la circulación", propuesta por L. HIRSZFELD, porque el fibrinógeno presenta propiedades análogas a la caseína o a las proteínas del cristalino (L. HEKTOËN y W. H. WELKER). Para juzgar objetivamente las expresiones debe tenerse en cuenta *que no existe en absoluto una delimitación estricta entre los antígenos que poseen y los que carecen de especificidad de especie*. No es cierto que sea común a todos los animales el antígeno del cristalino (para comenzar discutiendo el caso del antígeno menos específico que se conoce desde tiempos de UHLENHUTH). Ya este autor observó que el cristalino de los peces es un antígeno que difiere fuertemente del antígeno del cristalino de los mamíferos; G. KAPSENBERG encontró más tarde diferencias pequeñas, pero manifiestas, en la especificidad de especie de los cristalinos de mamíferos y descubrió que en el cristalino de los cobayos, caballos, gallinas no existe un único "antígeno del cristalino", sino también el antígeno de FORSSMAN (R. PICK), que incluso parece dominar sobre el antígeno del cristalino, por lo que al inmunizar conejos con cristalino de cobayo no se producen antisueros frente al antígeno del cristalino, sino sólo hemolisinas para el carnero, heterogénicas [citado por E. WITEBSKY (1929, pág. 499)]. H. E. STOCKINGER y M. HEIDELBERGER pudieron distinguir entre sí en ensayos cuantitativos de precipitinas las tireoglobulinas de hombre, de vaca, de cerdo y de oveja. Sabido es que las proteínas del suero sanguíneo poseen acusada especificidad de especie y que el descubrimiento de sus diferencias específicas de especie no sólo posee extraordinaria importancia práctica, sino que dió el impulso más poderoso y trascendente al estudio de la especificidad serológica. Pues bien, no obstante, actualmente se sabe que si se administran a un conejo repetidas inyecciones de un determinado suero normal, terminan originándose precipitinas que reaccionan no sólo con el suero utilizado como antígeno, sino también con el suero de mamíferos de especies muy alejadas. Lo que aproxima estos antígenos a la "especificidad de mamífero" de las proteínas del cristalino (véase pág. 107).

La especificidad de especie manifiesta, por consiguiente, una serie de *gradaciones* para las que en general resulta válida la regla de que la especificidad es más acusada en las proteínas de los líquidos

orgánicos que en las de los tejidos: sin embargo se conocen desviaciones de esta regla en ambos sentidos, y, además, cuando falta la especificidad de especie hay que precisar si la proteína misma es la responsable de esta carencia o si se debe a una sustancia copulada a ella de naturaleza no proteica (consúltese la pág. 116). La producción de anticuerpos utilizando como antígeno una proteína existente en el cuerpo del animal inmunizado que no haya sido sometida a una transformación previa debe considerarse, en todo caso, como fenómeno excepcional, que sólo debe admitirse cuando esté fundado en un número suficiente de hechos bien observados; parece probable la opinión de que este hecho es frecuente, pero que los anticuerpos no pueden manifestarse porque están saturados por los antígenos existentes en el organismo [véase K. LANDSTEINER (1945, pág. 61)]; esta hipótesis exige la explicación previa de la causa para que reacciones de este tipo no actúen de modo patológico, problema cuya consideración especulativa ha conducido con frecuencia a notables desviaciones. Así, P. RÖMER ha atribuido la formación de las cataratas en el hombre al efecto de autoanticuerpos; no obstante, tales anticuerpos no han podido demostrarse en el suero de individuos afectados de cataratas, y en los conejos inmunizados durante mucho tiempo con cristalino no se ha observado nunca ningún indicio de alteraciones del cristalino [R. PICK, E. WITEBSKY y J. STEINFELD (1927, 1928), E. WITEBSKY (1929)]. Había que explicar cómo puede salir del cristalino una cantidad de sus proteínas suficiente para actuar de antígeno, cómo alcanzan las células productoras de anticuerpo y, por último, cómo actúa sobre el cristalino el autoanticuerpo, tanto si es una seroglobulina como una sustancia combinada con una seroglobulina. En los cristalinos normales no puede demostrarse la presencia de ninguna seroproteína específica de especie ni tampoco, salvo excepciones, en el cristalino con catarata desarrollada [las excepciones, según L. HEKTOËN (1922), suponen el 16 por 100 de los casos investigados].

V. LOS FUNDAMENTOS DE LA ESPECIFICIDAD INMUNOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS NATURALES

En sus investigaciones sobre la especificidad inmunológica de proteínas vegetales, H. G. WELLS y Th. OSBORNE (1913, 1915, 1916) (1) encuentran que proteínas químicamente semejantes, pero que proceden de semillas de especies diferentes, pueden sustituirse entre sí en pruebas de anafilaxia cruzada, mientras que las proteínas que difieren químicamente no poseen esta propiedad aunque procedan de semillas de la misma especie; de lo anterior deducen que la especificidad de las reacciones anafilácticas debe depender de la estructura química de la molécula de la proteína que se utiliza como antígeno (anaflactógeno). Por ejemplo, dichos autores, de los guisantes, lentejas y arvejas obtuvieron leguminas bastante puras, que no podían diferenciarse entre sí químicamente y que tampoco se distinguían en los experimentos anafilácticos; las globulinas procedentes de las semillas de calabazas y melones también parecen idénticas entre sí con arreglo a los criterios químico, cristalográfico e inmunológico (JONES y GERSDORFF). Por otra parte, con frecuencia ha podido observarse que en una misma semilla se encuentran proteínas que difieren entre sí química e inmunológicamente; por ejemplo, los albuminoides hidrosolubles que se designan con el nombre de "proteosas" difieren, en general, por completo de las otras proteínas que se aíslan de la misma semilla.

La gliadina y la glutenina, dos proteínas químicamente diferentes aisladas del grano de trigo, dan en las pruebas anafilácticas reacciones de parentesco. Como hay que excluir por completo que la gliadina se extraiga impurificada con glutenina, ni la glutenina impurificada con gliadina, es decir, que los dos antígenos proteicos se hubieran separado de modo imperfecto al obtenerlos, WELLS y OSBORNE supusieron que la causa pudiera consistir en que ambas proteínas, a pesar de su diferencia, poseyeran un grupo reaccionante común. En la tabla que sigue se expone el plan del experimento por el que los autores citados intentaron demostrar este mecanismo de las reacciones de parentesco; con las iniciales G C se designa la gliadina de trigo, y con H C la hordeína de la cebada, dos proteínas

(1) Véase también B. WHITE y O. Z. AVERY (1913) y G. C. LAKE, Th. OSBORNE y H. G. WELLS (1914).

que no son idénticas, sino sólo semejantes o emparentadas. G y H designan los grupos de reacción diferente, y C los idénticos. En la primera columna se expresa la proteína utilizada como sensibilizador, y en la segunda, el antígeno empleado en la inyección desencadenante; en la tercera, el resultado de esta inyección; en la cuarta, la proteína que se ha utilizado para investigar la anafilaxia, y en la quinta, el resultado de esta experiencia.

TABLA 6.^a

Antígeno de la sensibilización.	Antígeno de la reinyección.	Resultado.	Investigación anafiláctica.	Resultado de la prueba.
HC	GC	+ ¹	HC	+ ²
GC	HC	+ ³	GC	+ ⁴
HC	HC	+ ⁵	GC	- ⁶
GC	GC	+ ⁷	HC	- ⁸

1. Reacción de C con su anticuerpo.
2. Reacción del anticuerpo para H, no saturado por su antígeno.
- 3 y 4. Deben interpretarse análogamente a 1 y 2.

En las dos últimas filas no resulta positiva la prueba de la anafilaxia, es decir, que el animal *no* reacciona a la inyección con el antígeno heterólogo, porque la inyección desencadenante con el antígeno homólogo ha agotado los dos componentes del anticuerpo.

Los resultados de este experimento y de otros semejantes hicieron admitir a WELLS y OSBORNE que en las reacciones debe participar la molécula proteica intacta, que sólo así es capaz de reaccionar; pero que el carácter específico de la reacción no está determinado por toda la molécula proteica, sino sólo por ciertos grupos o radicales de ella, y que una molécula puede contener dos o más grupos determinantes de la especificidad. Estos grupos se designaron por R. DOERR (1929 b, página 790) como *determinantes inmunoquímicos*. Según el punto de vista de WELLS (1929), no ofrece ninguna dificultad interpretar, desde el punto de vista inmunoquímico, el ilimitado número de las especificidades de proteínas naturales. Suponiendo que los elementos estructurales de que se componen las moléculas proteicas son 20 aminoácidos diferentes, E. ABDERHALDEN calcula que pueden obtenerse 2.432.902.008.176.640.000 combinaciones distintas, número que aún resulta mucho mayor si se tienen en cuenta las diferentes proporciones en que pueden entrar los distintos aminoácidos. Las diferencias

de especificidad natural de las proteínas la atribuye WELLS, como puede deducirse de lo dicho, a la diferente ordenación de los aminoácidos dentro la cadena molecular, a la ausencia o presencia de determinados aminoácidos y, eventualmente, a las distintas relaciones cuantitativas de unos aminoácidos con otros.

Efectivamente, entre las proteínas que poseen distinta especificidad inmunológica, pueden apreciarse tales diferencias químicas. E. ABDERHALDEN estableció en 1903 que la albúmina del suero de caballo no contiene glicina, mientras que la globulina del mismo suero contiene un 3,5 por 100 del aminoácido, y P. HARTLEY ha observado que las seroalbúminas difieren en general de las seroglobulinas por el distinto contenido de cistina y diaminoácidos. Un avance importante en este sentido suponen las investigaciones de F. R. OBERMAYER y WILLHEIM, quienes aprecian la proporción en que se encuentran el N total y el N amínico (que valoran mediante formol) en las distintas fracciones del suero, proporción que designan como "índice de amino". Observan diferencias entre las seroproteínas de caballo y de vaca por una parte, y las de gallina y de ganso por otra; por ejemplo, la fracción proteica precipitada del suero de las aves, saturándolo al 25-30 por 100 con sulfato amónico, ofrece un índice de amino del 28,5-32,5, mientras que la fracción obtenida de modo análogo a partir de suero de mamíferos manifiesta un índice de 19; por consiguiente, la acusada diferencia serológica entre los sueros de mamíferos y los de aves (véase pág. 109) se corresponde con una diferencia química considerable.

El camino abierto por OBERMAYER y WILLHEIM se continuó luego con la esperanza de encontrar, mediante una determinación exacta de los aminoácidos existentes en las proteínas de las diferentes especies, el fundamento químico de la especificidad de especie, incluso para especies no tan alejadas entre sí como los mamíferos y las aves. También se ha prestado atención a proteínas cuya especificidad de especie se acusa poco, estando en parte desplazada por la denominada especificidad de órgano (queratinas y proteínas del cristalino, por ejemplo). Al enjuiciar los resultados, por lo menos los de una serie de autores, hay que tener muy en cuenta que las proteínas deben obtenerse en estado de máxima pureza y sin que al aislarlas se desnaturalicen. Hay que señalar algunos resultados notables, entre los que se expondrán con alguna extensión los de las investigaciones sobre las proteínas del cristalino [E. E. ECKER y L. PILLEMER] y sobre la queratina de la lana, plumas y cabello [PILLEMER, ECKER y colaboradores, R. BLOCK (1935, 1938, 1939)].

ECKER y PILLEMER determinaron la cisteína contenida en diferentes cristalinós y obtuvieron los siguientes resultados: para el cristalino de oveja, el 5,20 por 100; para el de cerdo, el 5 por 100; para el de gallina, el 4,30 por 100, y para el del pez, el 8,50 por 100. Las reacciones serológicas cruzadas dieron el siguiente resultado:

TABLA 7.*

Antisuero contra	Antígeno (dilución 1 : 4000)			
	Cristalino de oveja.	Cristalino de cerdo.	Cristalino de gallina.	Cristalino de pez.
Cristalino de oveja.....	+++	+++	+	-
Idem de cerdo.....	+++	++++	+	-
Idem de gallina.....	++	++	++++	-
Idem de pez.....	-	-	+++	++++

Se ve que, por su contenido en cistina, los dos cristalinós de mamífero difieren entre sí muy poco, pero apreciablemente del cristalino de ave y en grado muy considerable del de pez, y que a estas diferencias corresponden las de especificidad serológica, como ya habían observado ECKER y PILLEMER [de acuerdo con los resultados de P. UHLENHUTH (1903), L. HERTOËN (1922), L. MARKIN y P. KYES (1939) y otros].

Según L. PILLEMER, E. E. ECKER, J. R. WELLS, las queratinas obtenidas de la lana de oveja, de las plumas de ave y de los cabellos humanos parecen casi idénticas en muchos respectos (N total, N aniónico, contenido en azufre y en cisteína, y punto isoeléctrico). Además, R. BLOCK (1935, 1938, 1939) descubrió que los tres aminoácidos básicos, histidina, lisina y arginina, se encuentran en la proporción constante de 1 : 4 : 12 tanto en estas sustancias como en las uñas de los dedos, en los cuernos de vaca y de rinoceronte, en las púas de erizo hormiguero y de puercoespín, y en la piel de serpiente; en cambio, el contenido de otros aminoácidos investigados difieren de unas sustancias a otras. En las pruebas de precipitinas cruzadas, PILLEMER y colaboradores comprobaron, en oposición a datos más antiguos de Fr. KRUSTUS, y coincidiendo con investigaciones recientes de D. R. GODDAR y L. MICHAELIS, que pueden diferenciarse fácilmente la queratina de los cabellos humanos, de las plumas de ave y de la lana de oveja, si bien pueden apreciarse también entre ellas, aunque con menor fuerza, reacciones de parentesco. PILLEMER, EC-

KER y J. R. WELLS interpretan sus resultados suponiendo que las queratinas tienen ciertas propiedades químicas comunes, en las que radica el carácter fundamental de queratina y que constituyen el núcleo de la molécula de queratina, y que sobre este núcleo se ordenan determinados grupos que condicionan la especificidad de especie.

En lo que respecta a la constitución química, a saber: a la proporción en que se encuentran los aminoácidos, tanto en las cristalininas de los cristalininos como en las queratinas, se aprecian sorprendentes analogías, y, por otra parte, junto a ellas determinadas diferencias; parece acertado relacionar esta combinación de analogías y diferencias con el comportamiento serológico, porque en ambos casos puede demostrarse una especificidad básica de cristalino (o de queratina) en cuyo marco se encuadran los caracteres específicos de especie. Análogo paralelismo entre espectro de aminoácidos y especificidad antigénica observaron, por lo demás, L. BERGMANN y C. NIEMANN en las hemoglobinas de caballo, oveja, vaca y perro, sustancias que contienen igual proporción de hierro, histidina, lisina y arginina (1), pero que difieren entre sí considerablemente por su contenido en cisteína y en S no cisteínico; estos autores observan que las hemoglobinas poseen, a diferencia de las restantes proteínas de la sangre, especificidad de órgano (especificidad de hemoglobina); pero, además, una acusada especificidad de especie [M. HEIDELBERGER y K. LANDSTEINER, F. OTTENSOOSER y E. STRAUSS]. Únicamente en las hemoglobinas de especies muy emparentadas (por ejemplo: de caballo y asno), casi no se aprecian las diferencias específicas de especie y en tales casos desaparecen también las diferencias entre los contenidos de cisteína y de S total; lo mismo observaron L. BIRKOFER y A. TAURINS entre las hemoglobinas de hombre y de mono, y entre las de perro, zorra y chacal. Aun debe mencionarse que, según R. BLOCK (1937), también son muy aproximadas las proporciones relativas en que las proteínas del cerebro de diferentes mamíferos contienen los distintos aminoácidos (consúltese la pág. 116).

Esta revisión, incompleta, como se ha señalado, permite esperar que, si se analiza con exactitud el contenido de aminoácidos en el mayor número posible de proteínas naturales de diferentes especies, pueden aclararse algunos puntos que tal vez permitan generalizaciones más importantes. (Consúltese, no obstante, la pág. 133.) Pero,

(1) Según R. BLOCK y colaboradores, en las tres hemoglobinas de caballo, oveja y perro, los contenidos de hierro, arginina, histidina y lisina son proporcionales a los números 1, 3, 8 y 9.

naturalmente, el espectro de aminoácidos no puede ofrecer más que una impresión indirecta, ser un índice del fundamento químico de la especificidad de las proteínas naturales. Por ejemplo: por la simple observación de que la hemoglobina del caballo no contiene sino un 2 por 100 de cisteína, mientras que la de perro contiene un 6 por 100 (BERCKMANN y NIEMANN), no puede afirmarse que las diferencias serológicas de ambas hemoglobinas dependan de su contenido de cisteína; seguramente habría que deducir de ello que las dos hemoglobinas poseen estructura diferente, que se refleja, entre otras cosas, en la concentración de la cisteína en sus moléculas. Y tampoco sabemos si estas estructuras son los determinantes immunoquímicos genuinos. En este respecto resulta muy oportuna la siguiente frase, no siempre citada correctamente, de J. R. MARRAK (1938, pág. 87): "There is no evidence that such proteins (*scil. natural proteins*) contain characteristic determinant groups such as those introduced in the artificial antigens." El motivo se comprende fácilmente: en los antígenos artificiales, por ejemplo, en las azoproteínas, conocemos con exactitud la estructura química de los determinantes que condicionan la especificidad; por el contrario, en las proteínas naturales, dado el estado actual de las cosas, tenemos que operar siempre con una incógnita, con la estructura de la gran molécula proteica, y, además, como se ha señalado, hay que contar también con las alteraciones que haya podido sufrir su configuración y, finalmente, con las fuerzas intra e intermoleculares, que a su vez dependen tanto de la estructura como de la forma de la molécula.

Al tratar de la estructura suponemos siempre que la proteína está formada por una *cadena de polipéptidos*. Ahora bien: como, teniendo en cuenta las reacciones de parentesco, no podemos aceptar que el soporte de la especificidad sea la molécula proteica completa, parece posible que pueda determinarse el carácter específico de ésta en trozos de la cadena. LANDSTEINER y van der SCHEER (1932 a) adujeron una prueba de esta posibilidad copulando, con ayuda del ácido p-aminobenzoico, una proteína antigénica con dipéptidos de constitución conocida (glicil — glicina; glicil — d,l-leucina; d,l-leucil — glicina, y d,l-leucil — d,l-leucina); pudieron comprobar que las cuatro peptid-azoproteínas obtenidas de este modo difieren serológicamente y que su especificidad depende, en primer lugar, del aminoácido terminal que contiene el carboxilo libre y, en menor proporción, del segundo aminoácido. Se ha señalado también que las proteosomas hidrosolubles fácilmente difusibles obtenidas por digestión péptica de suero de caballo o de oveja suministran, sin copulación

diazoica, sueros inmunes que dan una débil reacción de precipitinas con los antígenos inmunizantes, así como con otras proteosas de la misma procedencia e incluso con los sueros de partida, pero que no reaccionan con proteosas obtenidas del mismo modo a partir de sueros heterólogos [K. LANDSTEINER y J. van der SCHEER (1931 a), LANDSTEINER y M. W. CHASE]. Finalmente, LANDSTEINER (1942), considerando los resultados obtenidos con estas proteosas, se pregunta cuál es la menor porción de una molécula proteica que conserva la capacidad de fijarse específicamente a un anticuerpo, y cuál es la estructura química de este grupo determinante mínimo. Con este fin preparó un antisuero que daba un precipitado específico, con una disolución de la fibroína de la seda. Obtuvo después un producto del desdoblamiento de la fibroína por hidrólisis ácida que tenía un peso molecular de sólo 600-1000, estando constituido por cadenas de 8-12 aminoácidos; estos productos de desdoblamiento inhiben la reacción de precipitación entre la fibroína de la seda y su antisuero, lo que parece indicar que la fibroína de la seda contiene determinantes cuyo tamaño no excede al de estos péptidos aislados por hidrólisis. Estos experimentos son, indudablemente, más importantes que los efectuados por LANDSTEINER y van der SCHEER (1932 a) con dipéptidos copulados a azoproteínas. En tales combinaciones podría estar determinada la especificidad, como veremos (pág. 168), incluso por aminoácidos aislados, mientras que los antisueros obtenidos por inmunización con proteínas o péptidos de bajo peso molecular (proteosas), jamás poseen una especificidad condicionada por un aminoácido aislado.

Ahora bien: si se supone que los determinantes de la especificidad proteica natural son *grupos* de aminoácidos, un cálculo sencillo enseña que el número de combinaciones posibles, limitado por el número de grupos de aminoácidos, resultaba muy inferior a la ilimitada diversidad de la especificidad de los antígenos proteicos naturales. Aparte de esto, debe tenerse en cuenta que en los experimentos citados de LANDSTEINER y colaboradores se escinden porciones de la molécula proteica y se examina su comportamiento serológico. Resulta aventurado extender las conclusiones con tales porciones aisladas al efecto determinante en la molécula natural intacta. Es de suponer que muy probablemente la especificidad de la molécula natural no esté determinada por "determinantes mínimos" de los obtenidos por LANDSTEINER hidrolizando la fibroína de la seda, sino por estructuras más complejas y quizás por la acción sinérgica de varios determinantes interdependientes. No puede calcularse actualmente el tamaño máximo de

tales determinantes [LANDSTEINER (1945, pág. 58)]. Un límite superior parece ofrecernos el conocimiento de que las proteínas están constituidas por unidades inferiores cuyo peso molecular alcanza a 17.600, unidades que se agregan formando moléculas constituidas, lo más frecuentemente, por 2, 4, 8, 16, 24, 48, 192 y 576 de tales unidades (THE SVEDBERG). Estos agregados pueden disociarse por diversos métodos, algunos muy delicados (modificación del pH de la disolución, modificación de la concentración salina, simple dilución, tratamiento con vibraciones ultrasónicas, electroforesis, sometimiento al campo de la ultracentrífuga); también es posible reasociarlos, como han conseguido con diversas proteínas THE SVEDBERG (1937, 1939), S. P. L. SÖRENSEN, D. A. MACINNES y L. G. LONGWORTH, J. D. BERNAL, ERIKSON-QUENSEL y THE SVEDBERG, S. BROHULT y S. CLAESON incluso con proteínas de virus (consúltese R. DOERR, 1944, páginas 32 y sig.). Tales disociaciones y reagregaciones no destruyen ni modifican la especificidad de la función antigénica y, por tanto, los determinantes inmunquímicos deben estar contenidos en las unidades subordinadas. Por consiguiente, los determinantes no pueden ser mayores que ellas y se repiten en los agregados tantas veces como unidades se asocian para constituirlos en forma idéntica.

Naturalmente que no resulta satisfactorio un límite superior tan alto. De ello podría deducirse que, contra la vieja concepción de WELLS, la especificidad de las proteínas naturales depende de la estructura total de la molécula proteica. Esta renuncia a la hipótesis de los *determinantes en el interior de la molécula* entra inmediatamente en colisión con la concepción de que en la molécula proteica se repiten periódicamente determinados grupos de aminoácidos [W. P. ASTBURY, M. BERGMANN y C. NIEMANN, J. D. BERNAL y J. FANKUCHEN, A. C. CHIBNALL], concepción que se funda en la teoría de que las proteínas están constituidas por cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. A la vista del esquema de la pág. 74 parece evidente esta periodicidad; supuesta real resulta comprensible que la especificidad dependa del carácter de los grupos de aminoácidos que se repiten más que de la totalidad de la cadena peptídica. En todo esto lo hipotético excede con mucho a la base experimental; ante todo existen diversas opiniones con respecto al tipo de periodicidad (A. C. CHIBNALL).

Otra razón habla en favor de la existencia de los determinantes, *la configuración esférica o elipsoidal de la molécula de muchas proteínas*. En las reacciones *in vitro* de las proteínas con sus anticuerpos, decisivas para juzgar las relaciones de especificidad, no se pone en

contacto con el anticuerpo más que la superficie de la sustancia antigénica; esto parece señalar que deben existir estructuras parciales de la molécula proteica, situadas en la superficie, que condicionen el desencadenamiento de la reacción, es decir, que actúen como determinantes. Como ahora se imagina que la forma esférica o elipsoidal de la molécula proteica se produce por un plegamiento de las largas cadenas peptídicas, plegamiento que se mantiene en su posición por débiles fuerzas intramoleculares (véase pág. 75), los grupos situados en la superficie en virtud de tal plegamiento son los que han de decidir el desencadenamiento de las reacciones específicas [HSIEN WU, A. E. MIRSKY y L. PAULING]. Es cierto que pueden hacerse algunas objeciones; por ejemplo, que las proteínas extendidas en películas de un espesor de 8 A μ m., en cuyo estado no conservan sus plegamientos, pueden reaccionar específicamente con los anticuerpos (véase pág. 86) y que hay proteínas (queratina, seda) cuya molécula no es esférica, sino filamentosa, lo que no impide que posean funciones antigénicas específicas, que tampoco faltan en productos de la hidrólisis de las proteínas que han perdido sin duda los plegamientos de la molécula proteica original. Pero a estas objeciones puede replicarse que el hecho de que una cadena peptídica extendida aparezca con especificidad determinada no impugna la afirmación de que las moléculas proteicas esféricas no pueden participar como un todo al reaccionar con el anticuerpo, *sino sólo sus grupos situados en la superficie—sus zonas reactivas superficiales—, que es precisamente el punto debatido*. Otra cuestión a la que hasta ahora no ha podido responderse es cómo debe concebirse esta zona y, como consecuencia, los determinantes de las proteínas naturales en general. R. MARRACK (1938) plantea la posibilidad de que aminoácidos aislados sean los que determinen la afinidad con los anticuerpos de la zona activa de la superficie molecular, o, como otra posible alternativa, que influyan en cada zona activa conjuntamente varios aminoácidos. Las investigaciones, citadas en otro lugar, de LANDSTEINER y de van der SCHEER (1932 a), que hablan de la dependencia entre la especificidad de un dipéptido y el aminoácido terminal, permiten suponer que tales grupos polares se encuentren en la superficie de la molécula (véase página 126). Por otra parte, por el análisis del precipitado obtenido en la precipitación inmune, se sabe que la ovalbúmina, cuyo peso molecular es 44.000, puede cargarse con el quintuplo de su peso de anticuerpos, lo que permite deducir que en la molécula deben existir al menos cinco zonas de fijación; también se sabe que en las moléculas proteicas muy grandes, por ejemplo, en la hemocianina del *Helix*

pomalia, cuyo peso molecular es 6.700.000, las zonas de fijación pueden exceder a 100; esto coincide, naturalmente, con la suposición de que la especificidad de las proteínas está determinada por una *parte* de la molécula.

Hasta ahora no ha podido encontrarse una propiedad general de los determinantes químicos de la especificidad proteica natural. En las investigaciones concernientes con este problema se confunde a veces la especificidad con la capacidad de provocar la producción de anticuerpo. Por ejemplo: en apoyo de la hipótesis de que la especificidad de las proteínas está determinada por los anillos aromáticos, se ha aducido que la gelatina, que no posee aminoácidos aromáticos, es incapaz de producir anticuerpos. Sin embargo, la prueba se aduce de modo evidentemente erróneo, porque especificidad y producción de anticuerpos no son funciones, de ningún modo, idénticas. (Conviene recordar, al efecto, los ejemplos siguientes: las hemoglobinas de mamíferos forman anticuerpos con mucha más dificultad y en cantidad mucho menor que otras proteínas, y, sin embargo, poseen acusada especificidad de especie [M. HEIDELBERGER y K. LANDSTEINER, F. OTTENSOOSER y E. STRAUSS]; la albúmina del suero sanguíneo, mucho menos activa que las globulinas, posee, en cambio, una especificidad particular y de especie tan acusada como ellas (véase pág. 112), y los haptenos, sustancias incapaces de formar anticuerpos, manifiestan, no obstante, en sus reacciones *in vitro*, una especificidad que incluso sobrepasa los límites de la especie—polisacáridos de las bacterias—.) De que la gelatina carezca de aminoácidos aromáticos, todo lo más que puede deducirse es que esto sea la causa de la incapacidad de esta proteína para formar anticuerpos; pero en lo que concierne a la especificidad es imposible emitir conclusiones, ni positivas ni negativas, porque como no se conoce ninguna reacción serológica de esta proteína, no se puede establecer que exista o falte la especificidad.

La idea de que la especificidad de las proteínas está determinada por los aminoácidos aromáticos procede de FR. OBERMAYER y E. P. PICK. Pero, en general, el pensamiento de estos autores se expone de forma equivocada o incompleta, que corregiremos y completaremos aquí en interés de la veracidad de la exposición. En la primera de sus comunicaciones clásicas, el pasaje que concierne a esta cuestión (en el original subrayado en negritas) es, textualmente, el siguiente: "Por ello nos parece probable que la agrupación específica de especie de la molécula proteica esté fundamentalmente influida, en primer lugar, por grupos que dependan de los núcleos aromáticos de la proteína. Se entiende, sin necesidad de mención especial, que los

grupos aromáticos por sí solos no alcanzan, evidentemente, a explicar el enorme número de posibilidades de variación que la naturaleza ofrece; por consiguiente, concebimos la participación de los grupos aromáticos en la especificidad original suponiendo que el complejo aromático no constituye más que el punto central de cada agrupamiento, característico de especie, de las cadenas laterales; por la introducción de sustituyentes se nivelan después estas diferencias características de la especie." Sobre el sentido de la última frase volveremos al tratar de la especificidad química obtenida artificialmente.

Si consideramos en toda su amplitud esta exposición original de la hipótesis de FR. OBERMAYER y E. P. PICK, resulta claro que tiene en cuenta muchas de las objeciones que después se adujeron contra ella. Así, por ejemplo, K. LANDSTEINER (1945), entre otros autores, señala que los polisacáridos, que no contienen ningún grupo aromático, reaccionan con sus anticuerpos de modo tan específico como las proteínas. Ahora bien: OBERMAYER y PICK sólo se plantearon la cuestión de la especificidad de las proteínas, y como estas sustancias están constituidas por aminoácidos, parece probable que de un modo u otro estén implicados en la especificidad; la influencia especial de los anillos aromáticos no se debe sino a que pueden funcionar como centros de agrupaciones más amplias, cuya totalidad constituye el fundamento químico de la especificidad. Tampoco puede considerarse como una seria objeción el hecho de que la especificidad de las proteínas pueda modificarse por agentes químicos que no implican sustitución en los anillos aromáticos, como, por ejemplo, por esterificación o por copulación con isocianatos (S. J. HOPKINS y A. WORMALL); la modificación de las agrupaciones periféricas puede actuar del mismo modo que una modificación de su centro. El hecho de que la especificidad serológica de unas sustancias que, como los polisacáridos, poseen una estructura completamente distinta de los albuminoides, dependa de estructuras químicas de otro tipo de las que influyen en las proteínas, resulta evidente y no impugna que en estas sustancias dependa de los aminoácidos o de los núcleos aromáticos.

OBERMAYER y PICK señalaron ya que no todos los aminoácidos aromáticos influyen en el mismo grado sobre la especificidad de las proteínas. Investigaciones posteriores parecen corroborar esta opinión y ampliarla en el sentido de que los mismos aminoácidos actúan sobre la especificidad de modo distinto en diversas proteínas. Así, E. A. KABAT y M. HEILDELBERGER observaron que la especificidad de la ovalbúmina depende de agrupaciones en las que figura la tirosina y posiblemente la histidina, y que, en cambio, estos aminoácidos

poseen escasa importancia para la especificidad de la albúmina del suero de caballo. Si ambas albúminas se copulan con los mismos derivados azoicos, se observa que la azoseroalbúmina reacciona con las precipitinas obtenidas con la seroalbúmina natural, mientras que la ovalbúmina con la azotación pierde la capacidad de reaccionar con la precipitina antiovalbúmina. Como en los productos de copulación de ambas proteínas, el número de grupos disazo corresponde, aproximadamente, al número de grupos tirosina, hay que suponer que la copulación del hapteno y la proteína debe producirse en estos grupos o, posiblemente, en la histidina. Las modificaciones que la copulación provoca en los lugares donde se efectúa, en el caso de la ovalbúmina modifican considerablemente su especificidad, mientras que en el de la seroalbúmina casi no ejercen ningún efecto; debe, pues, admitirse que la especificidad originaria de la ovalbúmina está determinada por grupos distintos que los de la seroalbúmina (1).

R. BLOCK pudo comprobar que las proteínas de determinados grupos (hemoglobinas, queratinas, neuroproteínas) poseen un contenido molar constante de aminoácidos básicos (véase pág. 124), y que, en cambio, el contenido de aminoácidos aromáticos variaba de unas a otras. Dejándose llevar a especulaciones, este hecho parece confirmar la hipótesis de OBERMAYER y de PICK, según la cual la especificidad proteica depende de agrupaciones de la molécula en las que "el complejo aromático representa el punto central".

A pesar del enorme trabajo experimental efectuado, no estamos aún en condiciones de conocer la fórmula química del determinante inmunológico (o, en caso de que se trate de varios determinantes, el complejo que constituyan) de ningún antígeno proteico. La primera causa, dicho sencillamente, es que tampoco conocemos la fórmula de los antígenos proteicos. Se sabe que la albúmina y la globulina del suero de caballo o del suero humano difieren entre sí química y serológicamente; pero no podremos precisar en qué radican ambas diferencias hasta que no conozcamos exacta y completamente la constitución de los antígenos proteicos; en tanto no suceda esto (2), no

(1) Esta conclusión probablemente no es correcta de modo incondicional. De la experimentación sólo puede, en sentido estricto, deducirse que la copulación modifica grupos de la ovalbúmina que son importantes para la especificidad originaria de esta proteína, y que este resultado no se produce en la copulación de la seroalbúmina. Pero no es forzoso que la copulación haya modificado en ambas proteínas los mismos grupos (véase pág. 152).

(2) No se suele subrayar la realidad de que en muchos casos se continúa sin poseer datos del contenido de aminoácidos en las proteínas que posean la

podemos más que sustentar opiniones forzosamente imprecisas. Por ello parecía natural continuar el estudio del problema del antígeno-anticuerpo desde el punto de vista biológico y presentar en primer término el hecho de que las proteínas de las distintas especies vegetales y animales difieran serológicamente, incluyéndolo de modo provisional, o definitivamente si se le prejugaba fuera del alcance del progreso científico, entre los misterios de la naturaleza. La ruptura con esta opinión fué iniciada por FR. OBERMAYER y E. P. PICK, por H. G. WELLS y por K. LANDSTEINER, quienes extendieron, si no inmediatamente, en un período relativamente corto, la opinión de que la especificidad de los antígenos debe estar condicionada por su constitución química. Pero el enigma de la especificidad natural, como hemos dicho, permanece indescifrado. La causa de las innumerables especificidades de especie, el hecho de que la especificidad serológica de especie aparezca en general tanto más clara cuanto más distantes estén las especies en el sistema natural que se comparan, y, por otra parte, el que existan fracciones serológicas que permitan reconocer elementos comunes en los grandes grupos del sistema animal y descubrir, por el contrario, oposiciones entre ellos (mamíferos, aves, peces), todo permanece como *caput mortuum* en el crisol de la química.

B. LA ESPECIFICIDAD QUÍMICA, INDUCIDA ARTIFICIALMENTE

FUNDAMENTOS EXPERIMENTALES

I. Métodos de sustitución (Fr. Obermayer y E. P. Pick).

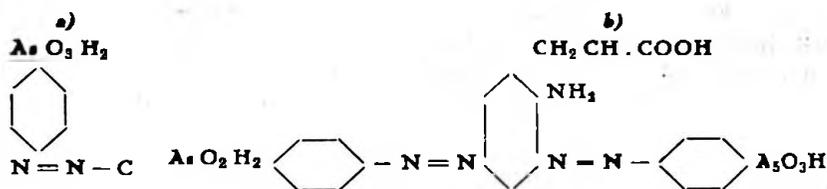
Inicialmente, OBERMAYER y PICK perseguían el propósito de "introducir ciertos grupos químicos por determinados procesos químicos en lugares previamente determinados de la molécula proteica" [E. P. PICK (1912, pág. 703)], o, como se dice en la primera publicación de estos autores, "aplicar determinados procesos químicos que im-

exactitud con que los últimos tiempos E. BRAND, B. KASSELL y L. J. SEIDEL los han determinado en el plasma sanguíneo humano. Cuando los citados autores establecen que la albúmina, incluso la de distintas especies animales, contiene muy poco triptófano, que en la albúmina de caballo falta la metionina y que la γ -globulina es rica en hidroxiaminoácidos, expresan sólo particularidades que no podemos poner en correspondencia precisa con la especificidad serológica de las seroproteínas.

priman a la proteína un sello nuevo por la introducción de determinados grupos en su molécula". Para esta finalidad se yodaron, nitraron o diazotaron antígenos proteicos naturales (sueros sanguíneos) y los derivados obtenidos se aplicaron en la inmunización de conejos. Se observó que los sueros obtenidos no daban la reacción de precipitinas con los antígenos proteicos intransformados, pero sí como los derivados utilizados en la inmunización, en los que, por consiguiente, se había "extinguido la especificidad de especie" y se había sustituido por una especificidad nueva determinada por el agente químico que había actuado sobre el antígeno. De acuerdo con esto, se observó que los antisueros obtenidos con proteínas yodadas, nitradas o diazotadas, reaccionan con las proteínas más distintas siempre que se hayan sometido a los mismos procesos, y la extinción de la especificidad de especie se manifiesta también en que, por la transformación, las proteínas propias de la especie pueden funcionar como antígeno; por ejemplo, la inmunización de conejos con suero de conejo yodado origina una precipitina que da un precipitado específico con el suero de conejo yodado, y también con otras proteínas yodadas. OBERMAYER y PICK observaron, además, que la diazotación de los antígenos proteicos ofrece la gran ventaja de "enlazar a la proteína diazotada diferentes sustancias como naftol y fenilendiamina, mediante las cuales pudiera estudiarse cómodamente la importancia para la especificidad de la proteína de su colocación en un posición determinada del complejo total, y en cierto modo en las cadenas laterales".

II. *La copulación de combinaciones de composición química conocida con antígenos proteicos.*—*Las azoproteínas (K. Landsteiner).*

La desaparición de la especificidad de especie hizo que OBERMAYER y E. P. PICK volvieran a estudiar al efecto de los procesos químicos que investigaron en sus primeros trabajos. Eligieron, por considerarlo más suave, el proceso descrito por P. EHRLICH y otros autores, de la copulación de las proteínas con diversos derivados diazoicos, que, según las investigaciones de H. PAULY, se debe a una reacción del grupo azo con determinados grupos aromáticos de la molécula proteica, más precisamente con los radicales de tirosina e histidina. Por ejemplo: si se mezcla atoxilo (a) con tirosina se produce una combinación de la forma (b):



En su primera publicación ya se ocuparon OBERMAYER y E. P. PICK (1906) de la inmunización con tales productos de copulación. Mediante una proteína copulada con diazobenzol obtuvieron un antisuero de "máxima especificidad contra proteínas diazobenzoiladas", que conservaba completamente la especificidad de especie. La siguiente tabla, publicada en un trabajo posterior de E. P. PICK (1912, página 709), enseña cómo debe interpretarse esto.

TABLA 8.^a

	Suero inmune obtenido mediante seroproteína de vaca diazobenzoilada.
1.—Seroproteína de vaca diazobenzoilada.....	++++
2.—Seroproteína humana diazobenzoilada.....	—
3.—Seroproteína de caballo diazobenzoilada.....	±
4.—Seroproteína de conejo diazobenzoilada.....	—
5.—Seroproteína de vaca natural.....	—
6.—Seroproteína de vaca calentada.....	+

NOTA.—Precipitaciones en el óptimo de la reacción: ++++ reacción fuerte; + reacción débil; ± reacción muy débil; — resultado negativo.

K. LANDSTEINER y H. LAMPL obtuvieron con las mismas "azoproteínas" [designación introducida por K. LANDSTEINER y H. LAMPL (1917 b)] resultados diferentes, ya que los antisueros correspondientes precipitaron con azoproteínas preparadas con albuminoides de especies distantes. Además, LANDSTEINER y LAMPL afirman en la publicación citada que una precipitina obtenida con suero de caballo nativo puede también reaccionar con una azoproteína de caballo "obtenida por determinado procedimiento", y que, recíprocamente, el suero obtenido con azoproteínas de caballo puede reaccionar con el suero de caballo nativo. Según esto, también observan la conservación de la especificidad de especie aunque se manifieste de modo distinto del observado en la tabla 8.^a; las diferencias entre los datos de OBER-

MAYER y PICK, por una parte, y de LANDSTEINER, por otra, pueden atribuirse a que unos y otros investigadores emplearon métodos distintos para obtener las azoproteínas; métodos que se detallan en las comunicaciones. Por lo demás, K. LANDSTEINER (1945, pág. 57), en la última edición de su obra sobre la especificidad de las reacciones serológicas, continúa atribuyendo una singular importancia al hecho de que las azoproteínas, aunque hayan modificado su configuración original, continúan en posesión de propiedades específicas de especie.

Posteriormente se demostró que diferencias de este tipo en los resultados carecen de trascendencia para el problema, considerado en su aspecto principal. Los resultados de la investigación convergieron cada vez más claramente en apoyo del pensamiento siguiente, intuído por R. DOERR (1929 b, pág. 795), quien lo expresó así: "*Actualmente cabe siempre plantearse la posibilidad de que en una molécula existan varios determinantes inmunquímicos, los cuales no son equivalentes, sino que unos poseen carácter dominante y otros recesivo para la determinación de la especificidad del antígeno; esta concepción, en cierto sentido, puede aplicarse para explicar el fenómeno de la "conurrencia de los antígenos"*".

K. LANDSTEINER no comenzó sus experimentos con azoproteínas, en colaboración con H. LAMPL, hasta varios años después de publicados los descubrimientos de OBERMAYER y PICK; la primera publicación de LANDSTEINER sobre azoproteínas apareció en 1917. Es cierto que LANDSTEINER había ya investigado la especificidad de los antígenos proteicos (seroproteínas), modificados por diversos agentes químicos, por ejemplo, por metilación o acilación [LANDSTEINER y JABLON, LANDSTEINER y E. PRÁŠEK, LANDSTEINER y LAMPL (1917 a)]; pero estos trabajos se efectuaron después de la comunicación que hizo época de OBERMAYER y PICK en la *Morphologisch physiologischen Gesellschaft*, de Viena (30 de enero de 1906), y desde 1917 LANDSTEINER no prosiguió con tales métodos, sino que utilizó casi exclusivamente la copulación de las proteínas con diazoderivados. Posteriormente, E. P. PICK no impulsó de modo importante el trabajo que inició con OBERMAYER, principalmente porque desvió su atención de la investigación inmunológica a la farmacología. LANDSTEINER, por el contrario, conoció las posibilidades que guardaba el método de copulación y las prosiguió durante decenios con admirable perseverancia, variando genialmente de diversos modos el planteamiento de los problemas. Son universalmente reconocidos los grandes y variados servicios de LANDSTEINER, a los que no regateamos su extraordinario valor. Pero, no obstante, hay que hacer constar que la

prioridad pertenece a FR. OBERMAYER y E. P. PICK, tanto en el aspecto más general, es decir, en la fecunda introducción de los métodos químicos en la investigación de la especificidad, que incluso en lo que respecta a la expresión científica supone un momento crítico, como en la aportación especial, ya que estos autores fueron los primeros en utilizar los métodos de copulación. Muchas publicaciones de los últimos años no mencionan esta verdad o no la aprecian debidamente.

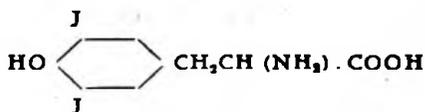
Crítica de los métodos llamados de sustitución.—Aunque no inmediatamente, sino después de un período de latencia de duración considerable, se fueron levantando objeciones contra la interpretación teórica de los resultados obtenidos en la primera serie de experimentos de OBERMAYER y E. P. PICK, en que aplicaron su método de la yodación, nitración y diazotación. E. P. PICK (1912, pág. 706) interpreta su descubrimiento admitiendo que por la yodación, nitración y diazotación se extingue la especificidad de especie original, y se reemplaza por una nueva especificidad, "determinada principalmente por el carácter de los grupos sustituyentes y por su posición en el núcleo aromático y por las alteraciones en la estructura global de la molécula que provocan los procesos de sustitución". Ahora bien: PICK no afirma que la especificidad artificial esté condicionada de modo directo y exclusivo por los grupos sustituyentes, de modo que pueda hablarse, en sentido estricto, de especificidades de los grupos yodo, nitro y diazo introducidos por el método que se utilice. Sin embargo él mismo comprobó que entre los productos nitrados y diazotados existe una cierta capacidad de reacción mutua, aunque limitada, lo que lleva a pensar en la " semejanza de los dos procesos de reacción "; también observa que si se combinan entre sí dos métodos, no resulta indiferente el orden en que se efectúen las sustituciones, manifestando, por ejemplo, una especificidad distinta, una xantoproteína yodada, que una yodoproteína nitrada, que difieren también de los derivados obtenidos por sustitución sencilla, como puede observarse en la tabla siguiente [E. P. PICK (1912, pág. 707)]:

TABLA 9.^a

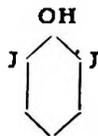
Antígeno.	Anticuerpo obtenido con			
	Xantoproteína yodada.	Yodoproteína nitrada.	Yodoproteína.	Xantoproteína.
Xantoproteína yodada...	++++	±	-	-
Yodoproteína nitrada...	+++	++++	+	-
Yodoproteína.....	+	++	++++	-
Xantoproteína.....	+	-	-	++++

En un pasaje muy sugerente, E. P. PICK (1912, pág. 708) señala las investigaciones de E. FISCHER sobre la "transposición de WALDEN", según las cuales, en determinadas condiciones, bastan los procesos de sustitución más insignificantes (por ejemplo, la sustitución de un grupo amino por un hidroxilo, o viceversa) para provocar, en cuerpos ópticamente activos, un cambio de configuración de toda la molécula. De que haya PICK señalado estos trabajos y de sus propias conclusiones acerca del mecanismo de las modificaciones de la especificidad conseguidas por yodación, nitración y diazotación, resulta claro que PICK de ningún modo pensaba en especificidades de I—, NO₂—, N=N—, sino que tenía en cuenta el efecto que la sustitución puede ocasionar tanto en la zona inmediata al lugar donde se produce, como en la totalidad de la molécula proteica.

En 1930 observó A. WORMALL que la especificidad de las proteínas bromadas y yodadas no está determinada por el yodo o el bromo, sino por los grupos tirosina, cuyas posiciones 3 y 5 pueden sustituirse por el halógeno, afirmación que pronto fué corroborada por John JACOBS (1932), utilizando la misma técnica (inhibición específica de la reacción con precipitinas). También se observó que se puede efectuar una sustitución por yodo (o bromo) en la molécula proteica, concretamente en un núcleo aromático (en el de la tirosina), sustitución responsable de la modificación de la especificidad y también, naturalmente, de la semejanza serológica entre todas las proteínas yodadas o bromadas; ahora bien: la nueva especificidad no debe atribuirse al halógeno como tal, sino al grupo de tirosina sustituida. Por lo demás, I. SNAPPER y A. GRÜNBAUM señalan que WORMALL y JACOBS no han precisado exactamente los determinantes de la proteína yodada. La 3,5-diyodotirosina tiene la fórmula:

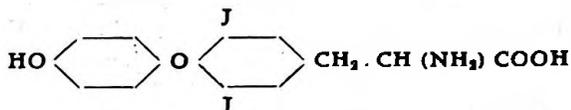


y la inhibición inespecífica de la precipitación de las proteínas yodadas por sus antisueros no sólo se logra por la halogenación de la tirosina en posición 3,5, sino que se debe al grupo 3,5-diyodo-4-oxi, en general.

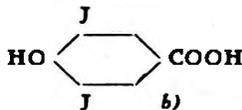
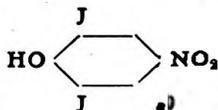


Grupo 3,5 - diyodo - 4 oxi.

La 3,5-diyodotironina, por ejemplo,



no inhibe; pero en cambio lo hacen, además de la 3,5-diyodotirosina, toda una serie de sustancias, entre ellas algunas que no contienen la cadena lateral de la tirosina, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, como, por ejemplo, el 3,5-diyodo-4-oxi-1-nitrobenzol (a) o el ácido 3,5-diyodo-4-oxi-benzoico (b):



Probablemente, el caso de las nitroproteínas resulta también más complicado, como opina W. MUTSAARS, quien intenta referir la especificidad de estos derivados antigénicos no a los grupos nitro, sino a los restos de nitrotirosina.

Las investigaciones sobre las proteínas yodadas han permitido comprender su determinabilidad inmunológica de modo más agudo que el que se conseguía por las suposiciones primitivas acerca de la entrada de yodo en un núcleo aromático de la molécula proteica (sin otros datos acerca del efecto de este proceso sobre el núcleo aromático mismo y sobre el conjunto de la molécula). Pero en este desarrollo tampoco se encuentra nada en que pueda apoyarse una

refutación de las opiniones de OBERMAYER y PICK. En todo caso, incluso en los últimos tiempos sigue sosteniéndose que la sustitución del yodo en "el núcleo aromático" (en el caso de las proteínas, en el grupo tirosina) es la causa inmediata de la modificación de la especificidad, habiéndose señalado como principio determinante especial únicamente la presencia de un hidroxilo en la posición 4 del anillo bencénico. Con el desarrollo gradual de los conocimientos de la determinación inmunoquímica de las proteínas yodadas ha ido abriéndose camino la noción de la debilidad de los resultados obtenidos por los métodos de sustitución. Actualmente se sabe que en la molécula del antígeno proteico pueden introducirse núcleos nuevos y conocerse el lugar en que estos procesos primarios se producen sin que por ello se conozcan más que las consecuencias serológicas, y esto en grandes rasgos, que provocan estas transformaciones químicas; sólo un análisis más exacto permitirá conocer los determinantes químicos.

También debe entenderse del mismo modo el parentesco entre las proteínas nitradas y las diazotadas, ya observado por E. P. PICK (véase pág. 137), quien lo atribuyó a la semejanza de los procesos químicos por que se obtienen los dos tipos de derivados. Experimentos posteriores efectuados por K. LANDSTEINER y E. PRÁSEK y por A. WORMALL corroboran que los sueros sanguíneos, nitrados y diazotados apenas ofrecen diferencias en las pruebas de precipitación; W. MUTSAARS (1939) observa incluso que si se absorbe un suero antinitro con estromas eritrocíticos nitrados pierde su capacidad de precipitar no sólo los sueros nitrados, sino los diazotados, de lo que deduce que el suero antinitro sólo contiene un tipo de anticuerpos que pueden reaccionar tanto con las proteínas nitradas, como con las diazotadas. Por ello, K. LANDSTEINER (1945, pág. 49) llega a la conclusión de que lo decisivo para la modificación de la especificidad no es la naturaleza de los grupos sustituyentes, ya que químicamente un grupo NO_2 — difiere mucho del grupo diazo $\text{N} = \text{N}$ —. LANDSTEINER supone que las semejanzas entre las proteínas nitradas y las diazotadas se basa probablemente en una modificación análoga de los grupos tirosina sobre los cuales actúa el ácido nitroso utilizado para la diazotación [K. LANDSTEINER (1945), A. MOREL y P. SISLEY]; H. EAGLE (1936, b), en cambio, fundándose en experimentos propios, atribuye la reactividad de las proteínas diazotadas, en su mayor parte, al contenido en las proteínas de triptófano, mientras que W. MUTSAARS (1930) refiere la especificidad de las nitroproteínas a un resto de nitrotirosina. Pero esto no explica el parentesco entre las proteínas nitradas y diazotadas, para lo cual hay que descubrir previa-

mente los determinantes químicos comunes. El fenómeno no permite sacar conclusiones generales de ningún tipo y queda al mismo nivel que las observaciones sobre la especificidad de las proteínas yodadas. No puede discutirse el hecho de que en la yodación, nitración y diazotación se producen sustituciones; la cuestión que ahora se plantea es dónde se producen estas sustituciones, cómo modifican la molécula proteica y si simultáneamente no se producen otras modificaciones por efecto del ataque químico. Por último, no debe olvidarse que ni en las más sencillas operaciones químicas de este tipo las propiedades de los productos de sustitución nunca dependen exclusivamente de la naturaleza de la sustancia sustituyente, sino de la sustancia en la que se efectúa la sustitución, del número de átomos que se sustituyen, de la posición recíproca de éstos y de su colocación con respecto a otros grupos de la molécula. No ha habido ninguna oportunidad de penetrar en particularidades más finas. La finalidad de las consideraciones anteriores era, en primer lugar, exponer un juicio objetivo de los trabajos fundamentales de OBERMAYER y E. P. PICK.

Ventajas del método de copulación.—La copulación de proteínas con combinaciones diazoicas resulta menos lesiva que los métodos de sustitución aplicados por OBERMAYER y PICK, y posee además la ventaja técnica de que se efectúa más fácilmente; utilizando una reacción adecuada, la mayor parte de las azoproteínas se obtienen a temperatura baja, sin más que mezclar la disolución del derivado diazoico con la disolución proteica y abandonar la mezcla durante algún tiempo [K. LANDSTEINER y H. LAMPLE (1917 b), M. HEIDELNERGER y F. E. KENDALL (1929 a)]. Además, el campo de aplicación del método de copulación es mucho más amplio que el de ninguno de los métodos de sustitución, y, *ante todo, el método de copulación permite realizar de modo claro e inequívoco un fin fundamental, a saber: la demostración de una especificidad serológica condicionada solamente por la configuración química*, lo que en los métodos de sustitución, como ya se ha dicho, no se consigue, al menos en la misma medida. Es cierto que con frecuencia los sueros inmunes obtenidos con azoproteínas siguen dando precipitaciones específicas con las proteínas, en estado nativo, utilizadas para su obtención, y que reaccionan de modo máximo con la azoproteína homóloga, es decir, con el preparado obtenido con la misma proteína o con una proteína próxima. Pero esta participación perturbadora del componente proteico puede eliminarse con facilidad si el antígeno inmunizador y el antígeno de la prueba *in vitro* se preparan con dos proteínas que difieran mucho entre sí, aunque naturalmente combinadas con el mismo

derivado diazoico; por ejemplo, puede obtenerse el suero inmune mediante una globulina de caballo copulada con atoxilo diazotado y observar la reacción de precipitinas con un suero de gallina copulado también con atoxilo diazotado. En lugar de suero de gallina pueden utilizarse, naturalmente, otras proteínas, siempre que se esté seguro de que posean reacciones de parentesco con la globulina de caballo; tomando estas precauciones previas entran en juego únicamente los componentes azoicos.

No existe duda alguna de que tanto en los métodos de sustitución como en los de copulación la modificación de la especificidad serológica de la proteína se produce mediante un proceso químico. Es cierto que la facilidad con que se forman las azoproteínas ha sugerido a A. KLOPSTOCK y G. E. SELTER la idea de que la simple mezcla de un diazoico (atoxilo diazotado) y suero sanguíneo en disolución neutra constituye un antígeno con la especificidad del diazoderivado; tal vez no sea, pues, necesario que se produzca una reacción química entre el diazoico y la proteína (véase pág. 134), dando lugar por su copulación a una nueva sustancia; tal vez la proteína no juegue en la mezcla más papel que el de "reforzador", que coloca al diazoico en el estado coloidal apropiado. No obstante, M. HEIDELBERGER y F. E. KENDAL (1929 a) han rechazado decididamente esta opinión, que consideran falta de suficiente base experimental. Pruebas posteriores efectuadas en las condiciones experimentales señaladas por KLOPSTOCK y SELTER indican que no se produce una reacción química propiamente dicha, que se acuse claramente por la formación del colorante, sino abandonando largo tiempo la disolución neutra, lo que coincide con los datos de KLOPSTOCK y SELTER, según los cuales su "mezcla" debe abandonarse largo tiempo antes de que se manifieste "la capacidad de reacción químicamente específica".

La función del componente proteico en la azoproteína.—Sin embargo, no está completamente claro, desde el punto de vista inmunológico, el papel que la proteína juega en los productos de copulación designados como "azoproteínas". En lugar de suero sanguíneo, que da lugar a una mezcla de varios antígenos (véase pág. 110), pueden utilizarse proteínas purificadas de origen animal o vegetal—lo que evidentemente carece de importancia—. Ahora bien: si la posee el que varios autores [M. ADANT (1930 a, 1930 b), S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1933 c), N. GUTMAN, A. MEDVECZKY y A. UROVITS, NATHAN y P. KALLOS] hayan conseguido sustituir proteínas provistas de función antigénica completa por gelatina o histona, sustancias que no actúan como antígeno ni *in vivo* ni *in vitro*, o como LANDSTEINER

expresó cautamente [véase LANDSTEINER (1945, pág. 158)], "cuya idoneidad para las reacciones serológicas es desconocida". Finalmente, R. F. CLUTTON, HARRINGTON y YUILL y HARRINGTON, HUMPHREY, YOILL y CLUTTON consiguieron obtener por la copulación de gelatina con O- β -glucósido-N-carbobenciloxtirosina o con O- β -glucósido-tirosina unas sustancias que provocan en los conejos la formación de precipitinas y de anticuerpos fijadores de complemento capaces de reaccionar con el grupo carbobenzoxitirosilo en función de hapteno.

No está clara la causa por la cual la gelatina y la histona por diazotación y la gelatina por la copulación descrita pueden transformarse en antígenos productores de anticuerpo. La gelatina, aparte de una pequeña cantidad de fenilalanina (1,4 por 100), no contiene ningún núcleo cíclico (1), y la activación de la misma por la fijación de un resto de tirosina parece indicar que no se trata sino de la corrección de un defecto químico, de la carencia de un grupo aromático, que se efectúa del modo dicho. Pero las histonas contienen tirosina, y, no obstante, en estado nativo no se comportan como antígeno, función que sólo adquieren al someterlas a la diazotación; en este caso, la falta de antigenicidad pudiera deberse a que el peso molecular, como el de otras protaminas no antigénicas, es demasiado pequeño (2), y al aumentarlo por la copulación se exalta la función antigénica que poseen en forma latente, hasta ponerla de manifiesto. En mi opinión hay que interpretar los hechos teniendo presente que tanto la gelatina como la histona son proteínas, aunque de las más sencillas, por lo que esconden una suerte de función antigénica latente, que se pone de manifiesto al formarse los antígenos químicos complejos. En favor de esta hipótesis puede, en primer lugar, aducirse que los antiseros obtenidos por la inmunización con derivados activos de gelatina, en algunas ocasiones no sólo reaccionan con el antígeno empleado en la inmunización, sino también con gelatina (M. ADANT), y, en segundo lugar, que la ovalbúmina, que ha perdido por racemización (transfor-

(1) W. DIRSCHERL (obra citada, pág. 368) señala que, según datos de GERNGROSS, también la gelatina posee el 1 por 100 de tirosina. Tal vez se trata de preparados designados como gelatina, pero impurificados con otras proteínas (R. BRUYNOGHE y P. VASSILLADIS).

(2) KOSSEL ya señaló el pequeño peso molecular de las protaminas; este autor fué el que estableció también el grupo de las histonas. Recientes investigaciones exactas, efectuadas por E. WALDSCHMIDT-LEITZ, ZIEGLER, SCHÄFFNER y WEIL y otros, dan para la clupeína un peso molecular de 2.000 aproximadamente (según otros autores, 4.000), y para la salmón, de 3.000.

mación en el albuminato alcalino) su capacidad antigénica, no la recupera por su copulación con atóxilo diazotado [R. DOERR y P. GIRARD]. Hay, pues, que admitir, en conclusión, que una proteína no antigénica no puede dar origen a un antígeno completo (inmunizante) con especificidad química, y, por consiguiente, que la gelatina y la histona poseen como el esbozo necesario para la función antigénica. Debe, sin embargo, corroborarse por investigaciones más extensas si este modo de pensar corresponde a la realidad. Los datos que se poseen actualmente, contradictorios en apariencia, impiden formarse un concepto general de los resultados experimentales; por ejemplo, la cupleína adquiere propiedades antigénicas al copularse con isocianato de fenilo [N. GUTMAN], y la gelatina, por el contrario, no lo hace [S. J. HOPKINS y A. WORMALL (1933 b)]. En relación con esto, K. LANDSTEINER (1945, pág. 63) aduce el descubrimiento de antígenos bacterianos muy activos que no contienen casi aminoácidos y que provocan la formación de anticuerpos sin que se les adicione una proteína [W. F. GOEBEL, SHEDLOVSKY, LAVIN y ADAMS]. Sin embargo, no se descubre cómo pueda relacionarse este hecho, indudablemente significativo, con la activación de la gelatina o de las histonas por los procesos de copulación; estas sustancias son proteínas, y por el desdoblamiento de este tipo de sustancias no se ha conseguido obtener, hasta la fecha, más que aminoácidos, a los que hay que hacer responsables, por consiguiente, tanto de su función antigénica, manifiesta o latente, como de su especificidad. El hecho de que la función antigénica pueda condicionarse de otro modo, no modifica estas conclusiones.

K. LANDSTEINER (1945, pág. 160) hace observar que en la obtención de antígenos complejos artificiales (azoproteínas) hay que evitar "la sobrecarga de las proteínas con grupos extraños", que puede impedir la capacidad de desencadenar la producción de anticuerpos; un compuesto de proteínas y ácido arsánico diazotado da un resultado óptimo cuando el producto contenga el 1-2 por 100 de arsénico. Estos datos han sido confirmados posteriormente por W. C. BOYD y E. R. WARSHAWER (1946). Estos autores observan que la función antigénica de un producto de copulación de suero de caballo con el séxtuplo de la cantidad de ácido arsánico teóricamente necesaria es tan reducida que ni uno de los 30 conejos que inmunizaron con este producto suministró más de indicios de un anticuerpo específico para el As; también resultó considerablemente escasa la producción de anticuerpos contra suero de caballo, en comparación con la conseguida con los conjugados de composición análoga sin sobresaturar. Como no se ha investigado la influencia que en el efecto ejerce la toxicidad del arsénico, estas observaciones no pueden aceptarse más que provisionalmente.

III. La inmunización de combinación.

Resulta muy difícil armonizar de un modo racional los métodos y resultados de los experimentos de OBERMAYER y E. P. PICK, y los de LANDSTEINER y su escuela, con el fenómeno denominado inmunización de combinación.

El punto de partida lo ofreció el hecho siguiente: en 1911, J. FORSSMANN observó que en los órganos de determinadas especies animales, por ejemplo, en los riñones de los caballos y cobayos, existe una sustancia a la que se debe la formación de hemolisinas para los hematíes de carnero, cuando se administra al conejo, por vía parenteral, extractos acuosos de tales órganos. Esta sustancia, que se designa en la literatura serológica como antígeno de Forssman, puede extraerse de los órganos por alcohol, como demostraron R. DOERR y R. PICK, por lo que en un principio se le atribuyó la naturaleza de lipóide hasta que posteriormente se demostró la de hidrato de carbono [K. LANDSTEINER y P. A. LEVENE, F. E. BRUNIUS]. En la forma del extracto alcohólico la sustancia posee carácter de hapteno, es decir, puede combinarse *in vitro* con los anticuerpos producidos por el extracto acuoso de los órganos, pero no provoca en los conejos la producción de hemolisinas para el carnero, al menos en cantidad apreciable [K. LANDSTEINER (1921), A. SORDELLI, H. FISCHER, R. WERNICKE y C. PICO, T. TANIGUCHI]. Ahora bien: K. LANDSTEINER (1921) [véase también LANDSTEINER y SIMMS], para su propia sorpresa, transformó este hapteno en un antígeno completo, inmunizante, por el sencillo procedimiento de añadirle un suero extraño al conejo; por ejemplo, suero de caballo; de este modo no se obtienen precipitinas para el suero de caballo, sino hemolisinas de carnero de título elevado. El principio metodológico fué designado por H. SACHS inmunización de combinación.

Resulta también notable que el suero extraño utilizado en el experimento de activación pueda sustituirse por otro antígeno (por ejemplo, por otra proteína, por un lisado de eritrocitos de otra especie, por extractos de bacterias o levaduras); pero no, en cambio, por sustancias no antigénicas (por suero de la misma especie, por extractos de órganos de la misma especie o por la peptona Witte) [R. DOERR y C. HALLAUER (1926)]. Esto recuerda la incapacidad de la ovalbúmina racémica en los experimentos de E. DOERR y P. GIRARD de copulación mencionados en la página 143, y parece señalar que la activación de la forma hapténica del antígeno de Forssman se deba

a la combinación del activador con el hapteno para formar un antígeno complejo, opinión ya expresada por K. LANDSTEINER y S. SIMMS (obra citada, pág. 136). Pueden interpretarse también en este sentido otras dos observaciones. En primer lugar, la de que la activación sólo se produzca si la sustancia que hay que activar y el hapteno se mezclan en el tubo de ensayo, pero no cuando los dos componentes se inyectan simultáneamente, pero por separado, por vía intravenosa; y en segundo lugar, la de que no actúen como activadores para el conejo eritrocitos de otra especie—es decir, antigénicos—cuando, sin disolverlos previamente, se adicionan al hapteno [R. DOERR y C. HALLAUER (1920)]. Hasta la fecha no se ha investigado la activación con gelatina o histonas, que puede resultar interesante con respecto a la supuesta función antigénica latente de estas sustancias (véase pág. 143).

Por el contrario, se ha adsorbido el hapteno en caolín o carbón animal y observado que tales combinaciones, evidentemente físicas, provocan la producción de hemolisinas de carnero; es decir, que se comportan como el antígeno de Forssman completo [P. GONALEZ y M. ARMANGUÉ, K. LANDSTEINER y J. JACOBS, F. PLAUT y H. RUDY]. Se tiene la impresión de que el hapteno adquiere una determinada forma que le capacita para ser captado por las células productoras de anticuerpos; su activación por suero de otra especie también debe atribuirse, al parecer, no a la creación de la función antigénica en sí misma, sino a que favorece el íntimo contacto entre el hapteno y el lugar de la formación de anticuerpos; este es el contenido de la teoría formulada por H. SACHS (1928-1929), que la denominó *teoría del remolque (Schleppertheorie)*. Sin embargo, la suposición previa que esta teoría exige, a saber, que el hapteno de Forssman, administrado intravenosamente, no alcanza las células formadoras de anticuerpos, es meramente hipotética y, por consiguiente, arbitraria. Por otra parte, K. LANDSTEINER y J. JACOBS demostraron que fracasa la activación física por adsorción cuando se emplea un hapteno de Forssman suficientemente purificado y que no da tampoco siempre resultado la activación mediante un suero de otra especie. LANDSTEINER (1945, pág. 105) supone que la activación por adsorción debe tener lugar por un mecanismo distinto al de la inmunización de combinación. En el primer caso pudiera tratarse de un estímulo inespecífico de la formación de anticuerpos análogo al observado por distintos autores, en parte trabajando con antígenos de escasa actividad (heteroalbumosas, fracción proteica de tuberculina vieja, extractos del polen de la *Ambrosia artemisiifolia*) [G. RAMON y P. DESCOM-

BEY, K. LANDSTEINER y W. CHASE, LANDSTEINER y J. JACOBS, GLENNY, BUTTLE y STEVENS, F. B. SEIBERT, A. H. W. CAULFIELD, EROWN y WATERS, etc]. Por el contrario, LANDSTEINER atribuye siempre la activación por adición de proteínas a la producción de un antígeno complejo teniendo en cuenta, entre otros, el hecho de que puede provocarse la función antigénica formadora de anticuerpos en sustancias muy sencillas, desde el punto de vista químico, por su combinación con antígenos proteicos, pero no mediante la ayuda física de un adsorbente.

En todo caso no se trata aquí sino de opiniones, en tanto que en la producción de nuevos antígenos complejos a consecuencia de procesos químicos siguiendo los métodos de sustitución y de copulación, se enfocan hechos comprobados. También continúa problemática la índole del proceso químico que se supone que actúa en la inmunización de combinación, así como la naturaleza del producto de la reacción hipotética entre el hapteno y el antígeno proteico activador. En tanto que sólo se discutía el antígeno de Forssman, pudo señalarse que este agente se encuentra en los órganos y en los extractos acuosos de éstos no como hapteno, sino como antígeno completo, y que adquiere el estado de hapteno en los productos artificiales obtenidos por extracción con alcohol; la activación de este hapteno por adición *in vitro* de un antígeno proteico podría considerarse como el restablecimiento de su estado natural.

Pero la inmunización de combinación se extendió a otras sustancias a las que no convenía la consideración anterior; por ejemplo, a lipoides (fosfátidos y esterinas), en ocasiones de constitución química conocida, como lecitinas de diversa procedencia, entre ellas la diestearyl-lecitina sintética de GRÜN y LIMPÄCHER, el [fosfátido cefalina, la colessterina y alguno de sus derivados (hidróxicolessterina, dihidrocolessterina y ergosterina irradiada y sin irradiar). Según los autores que se ocupan en estas investigaciones, se obtienen resultados positivos; es decir que por la inmunización de conejos mediante mezclas de las sustancias nombradas y de proteínas se obtienen antisueros que reaccionan con los lipoides utilizados y que, en determinados experimentos, incluso poseen una sorprendente especificidad [H. SACHS y A. KLOPSTOCK, SACHS, KLOPSTOCK y A. J. WEIL, G. E. SELTER, P. A. LEVENE, K. LANDSTEINER y van der SCHEER, A. J. WEIL y F. BESSER, V. BISCEGLIE, F. PLAUT y RUDY, H. MAIER, C. TROPP, y A. BASERGA, F. PLAUT y H. KASSOWITZ, E. BERGER y H. SCHOLER, F. HAHN y A. HAZATO, R. BRANDT y H. GOLDHAMER, L. M. KOPELOFF y L. KOPELOFF y otros]. De éste modo, por ejemplo, pueden

diferenciarse serológicamente la colessterina de la dihidrocolessterina (WEIL y BESSER), la colessterina de la ergosterina y la ergosterina irradiada de la ergosterina sin irradiar (E. BERGER y H. SCHOLER).

Hubo un tiempo en que la literatura inmunológica aparecía sobrecargada con comunicaciones de este tipo, no solamente por el interés del tema en sí, sino también porque el método primitivo de obtener antígenos combinados permitía la colaboración de autores sin orientación química.

Frente a los resultados positivos se observaron también algunos negativos, debidos en muchos casos a la utilización de preparados que aunque llevaran el mismo nombre (por ejemplo, "lecitina") diferían en el grado de pureza [LEVENE, LANDSTEINER y van der SCHEER, FLAUT y RUDY, A. WADSWORTH, E. F. MALTANER]. En la investigación serológica de la especificidad de los antisueros también se tuvo poco en cuenta la existencia de reacciones inespecíficas. La desviación del complemento, de modo especial está sujeta, por su misma naturaleza, a numerosas causas de error, de las que no cabe protegerse por los testigos habituales; y precisamente en toda la investigación de lipoides se usó predominantemente la reacción de fijación del complemento porque en estas sustancias fallan la mayoría de las restantes reacciones (precipitación), o simplemente por atribuir a la fijación de complemento mayor sensibilidad. Por estas causas aparecen datos singulares. G. E. SELTER (1930), por ejemplo, comunicó que por la inmunización de conejos con antígenos complejos químicamente específicos (preparados a partir de ácido metanílico o de atoxilo diazotado y suero) había obtenido antisueros que daban la reacción de fijación del complemento con "lipoides ampliamente difundidos por el reino animal, especialmente con lecitina". En estos trabajos suele introducirse una posible causa de error admitiendo sin discriminación que la porción fundamental de cualquier extracto alcohólico de órganos ha de ser un lipóide o una mezcla de lipoides. H. SACHS (1929, pág. 434) expone esta suposición de modo inequívoco en las siguientes frases: "Se ha señalado que *todo extracto alcohólico de órganos*, cuando sus componentes se mezclan en el tubo de ensayo con una proteína extraña (por ejemplo, con sueros sanguíneos), da lugar a la formación de anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos de este modo poseen un modo de actuar tal que dan la reacción de fijación del complemento o la de precipitación (floculación) con extractos de órganos de cualquier procedencia." "*Por consiguiente, aquí se produce, evidentemente, la formación de anticuerpos frente a lipoides muy difundidos, que se encuentran en los extractos alcohólicos de*

todos los órganos." Sin embargo, el hapteno de Forssman, cuya actividad como antígeno completo ha constituido el punto de partida de todas las inmunizaciones de combinación, en contra de lo que se pensó en un principio, no es un lipóide, sino que de su hidrólisis resulta glucosamina (un aminoazúcar), que existe en él probablemente en forma acetilada (F. E. BRUNIUS); es decir, que este hapteno está relacionado serológicamente con los polisacáridos de ciertas bacterias (bacilos de Shiga, determinados tipos de neumococos) y con la sustancia A de los eritrocitos humanos. Por consiguiente, cuando se obtengan anticuerpos mediante extractos alcohólicos de órganos que reaccionen serológicamente con estos extractos, hay que demostrar previamente en cada caso que se trata de reacciones entre lipóide y antilipóide.

Sin corroboración experimental adecuada, que necesariamente tendrá que cubrir un campo muy vasto, no puede, naturalmente, tomarse posición entre opiniones muchas veces contradictorias; es indiscutible que aún queda por separar el trigo de las granzas.

En las mezclas naturales de antígenos (antígenos complejos), ni la capacidad de inmunización ni la especificidad dependen del componente lipídico. En el suero sanguíneo existen también lipóides que son especialmente abundantes en las globulinas α y β (consúltese el esquema de la página 27), y, no obstante, cuando se desengrasan la seroalbúmina o las seroglobulinas con éter o alcohol, no se modifican sus especificidades de fracción (St. WENT y K. LISSAK). En los pulmones existe una lipoproteína tromboplástica que puede desdoblarse tratándola con heparina, con lo que se libera el lipóide y la heparina queda ligada a la proteína (E. CHARGAFF, M. ZIFF y S. S. COHEN); la proteína de la heparina, después de privarla del lipóide, sigue reaccionando con un antisuero obtenido con la lipoproteína intacta (S. S. COHEN y E. CHARGAFF). El antígeno específico de los bacilos de la paradiesentería del tipo Z (bacilos de Flexner) es un complejo de un fosfolipóide, de un polisacárido acetilado y de una proteína tóxica; el lipóide puede separarse sin que se destruya la función antigénica de los otros dos componentes (F. BINGLEY, W. F. GOEBLE y F. PERLMAN). Es cierto que P. HARTLEY (1925) observó que no se produce precipitado cuando se han extraído con éter el antígeno y el suero precipitante; pero simultáneamente comprobó que por este método lo único que se afecta es la floculación, ya que el antígeno y el anticuerpo siguen combinándose entre sí de modo específico. A la misma categoría pertenecen las observaciones de F. L. HORSFALL y K. GOODNER (1938 b) relativas a la supresión de

los fenómenos visibles de la aglutinación y la precipitación al desengrasar los sueros inmunes con alcohol y éter, fenómenos que reaparecen si se adiciona a los sueros inmunes lecitina o cefalina (según que los sueros inmunes procedan de caballo o de conejo); tampoco se trata en este caso de una modificación o supresión de la función antigénica, sino únicamente de la participación física de los lipoides en el modo de exteriorizarse las reacciones entre antígeno y anticuerpo. La falta de influencia de los lipoides, cuando están contenidos en compuestos naturales, sobre la función antigénica y sobre la especificidad, hace todavía más enigmática la inmunización de combinación.

Resulta sorprendente que sólo se hayan conseguido inmunizaciones de combinación cuando se opera con haptenos extraíbles por alcohol y con lipoides definidos químicamente (fosfátidos y esterinas) (1). Como LANDSTEINER (1936, pág. 166; 1945, pág. 113) señala, esta limitación resulta discutible por dos razones: en primer lugar, no se comprende por qué la activación por simple adición de un antígeno proteico no es posible más que con estas sustancias, y, en segundo lugar, también parece poco clara la causa que equipara, en cuanto a la activación, a unas sustancias que difieren químicamente tanto como los fosfátidos y las esterinas.

También hay que considerar la circunstancia de que en la inmunización de combinación se producen dos anticuerpos, uno para la proteína activadora y otro para el lipóide activado. Incluso pudiera ser que siempre se añada excesiva cantidad de proteína; pero F. HERMANN y E. WEIL, que investigaron las condiciones cuantitativas para la activación de la lecitina y del extracto alcohólico de corazón de conejo por el suero de cerdo, seguían obteniendo resultados positivos con diluciones del suero entre el 1 y el 0,1 por 100. Puede objetarse que la proteína y el lipóide aparentemente no reaccionan sino *in vitro*, pero que *in vivo* vuelven a disociarse; dónde y cómo, como tantas otras cosas, no puede precisarse.

En todo caso, la inmunización de combinación contrasta actual-

(1) Parece dudoso que deban interpretarse como inmunizaciones de combinación las observaciones de H. HAXTHAUSEN (1934, 1936, 1940) de que los hombres pueden sensibilizarse por sales de metales pesados mezcladas con suero de especies extrañas. Este autor ha provocado estados alérgicos con sublimado (1934) y con sales de níquel y cobalto (1936), que en unos casos se limitan al lugar de sensibilización, pero que en ocasiones se extienden a toda la piel. Las cantidades de suero de caballo son mínimas. Los individuos sensibilizados para el níquel reaccionan en muchos casos también frente al cobalto; sin embargo, resultan más intensas las reacciones frente al metal utilizado para sensibilizar.

mente con los métodos de sustitución y con los de copulación. El desarrollo de esta inmunización no nació de una cuestión planteada racionalmente que debiera rebatirse por experimentación, sino que fué debida a una observación fortuita, siendo por ahora un producto del azar, lo que también puede aducirse en sentido paliativo.

* * *

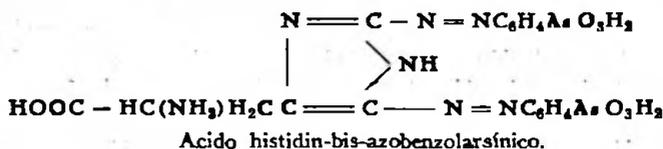
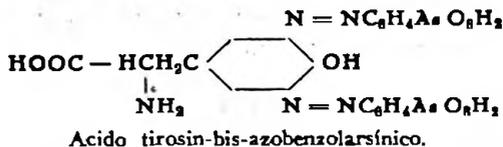
Con lo anterior se ha terminado el estudio de la esencia y de los resultados que pueden esperarse de los métodos experimentales de sustitución, de copulación entre combinaciones diazotadas y antígenos proteicos y de inmunización de combinación. Los resultados experimentales obtenidos con los métodos de sustitución y de inmunización de combinación se han expuesto con suficiente extensión. Los resultados mucho más importantes obtenidos mediante antígenos copulados exigen un capítulo especial, que se expone a continuación, donde se estudiarán desde puntos de vista fundamentales.

LOS ANTICUERPOS DE ANTÍGENOS ARTIFICIALES OBTENIDOS POR COPULACIÓN

En otro lugar se han expuesto las dificultades que ofrece el progreso de nuestros conocimientos relativos a los determinantes químicos de las proteínas naturales. Casi todo cuanto conocemos en fórmulas químicas con respecto a la determinación inmunoquímica de los anticuerpos se funda en resultados experimentales obtenidos mediante azoproteínas. Estas azoproteínas se obtienen por la reacción química entre derivados diazoicos y proteínas naturales. Son, por consiguiente, productos constituidos por un componente de fórmula conocida y otro conocido de modo insuficiente. Por tanto, la primera cuestión que se plantea consiste en discriminar en qué forma se encuentran ambos componentes en el producto (es decir, si se modifican por la reacción); la segunda, en qué grado influyen ambos componentes en el carácter de un anticuerpo obtenido por el producto.

Estudiaremos primeramente las modificaciones que sufre la proteína en el proceso de copulación. Como los productos de copulación resultan coloreados de rojo oscuro, H. PAULY investigó cuáles son los aminoácidos que dan esta reacción al combinarse con el diazoderivado, y observó que los únicos que lo hacen son la tirosina y la histidina, dando los restantes productos amarillos. H. PAULY esta-

bleció además la fórmula química de las combinaciones obtenidas de la reacción entre tirosina (o la histina) y el ácido diazobenzolarsínico, que son:

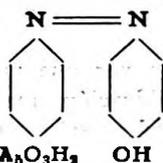


Desde entonces se supone, generalmente, que en la obtención de las azoproteínas sólo participan los grupos tirosina e histidina. Pero en 1936, R. KAPPELLER-ADLER y G. BOXER consiguieron obtener derivados bis-azobenzolarsínicos por la reacción entre el ácido diazobenzolarsínico y los aminoácidos fenilalanina, triptófano, prolina y oxiprolina, derivados que, según su análisis, poseían fórmulas análogas a los derivados de la tirosina e histidina que investigó H. PAULY. Dichos autores investigaron además el contenido de As y N en las azoproteínas obtenidas con el ácido diazobenzolarsínico y con caseína, fibroína, zeína y gelatina; el elevado contenido en arsénico desmiente la teoría de PAULY, según la cual sólo poseen la capacidad de copulación la histidina y la tirosina. De las dos series de experimentos se llega a la conclusión de que, "además de la tirosina e histidina, otros aminoácidos cíclicos también poseen capacidad de copularse", opinión a que ya se inclinaban en 1934 W. C. BOYD y S. B. HOOKER (1934 a), fundándose en investigaciones acerca del contenido de N y de As en azoproteínas obtenidas con ácido arsánico diazotado.

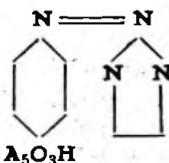
Por otra parte, no se trata de investigar simplemente los aminoácidos de la molécula proteica capaces de copularse, sino los aminoácidos que efectivamente intervienen en la copulación. Se ha señalado que el número de aminoácidos que participan en la copulación puede oscilar entre amplios límites, y depende del método aplicado y de las condiciones elegidas para efectuar la copulación. En la copulación con ácido arsánico diazotado puede determinarse dicho número fácilmente por el contenido de arsénico en la azoproteína obtenida. Este contenido puede elevarse hasta el 10,6 por 100 e incluso

14,8 por 100 [F. HAUROWITZ (1936), KAFELLER-ADLER y BOXER]; sin embargo, una sobresaturación tan elevada perturba la función antigénica de formar anticuerpos (véase pág. 126), y K. LANDSTEINER y H. LAMPL (1918), así como F. HAUROWITZ (1936), determinaron de modo empírico que el contenido de As óptimo para dicha función es de un 1-2 por 100. Estas azoproteínas, obtenidas con ácido arsánico, son, pues, consideradas desde el punto de vista puramente cuantitativo, productos de composición variable, afirmación que puede extenderse a otras azoproteínas.

A lo anterior hay que añadir que en la copulación pueden intervenir aminoácidos *diferentes*, por lo que dentro de la misma clase de azoproteínas los productos pueden diferir por la proporción en que hayan reaccionado los diversos aminoácidos. Estas diferencias no carecen de alcance, como se deduce de las investigaciones de S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1933 b, 1933 c), que haciendo reaccionar, por una parte, proteínas antigénicas (ovalbúmina, caseína); y, por otra, gelatina con ácido arsánico diazotado, pudieron preparar dos tipos de azoproteínas, mediante las cuales obtuvieron por inmunización las correspondientes precipitinas. Además obtuvieron dos compuestos sencillos a partir de fenol (T) y de iminazol (H) y de ácido arsánico diazotado, de los cuales el primero posee estructura semejante a la tirosina y el segundo a la histidina.



T (Acido fenol-diazo-arsánico).



H (Iminazol-diazo-arsánico).

Para la inhibición específica de la precipitación del antisuero contra el ácido casein-diazo-arsánico con su antígeno homólogo se necesita una cantidad de T tres veces mayor que la de H, mientras que para inhibir la reacción del antisuero contra el ácido gelatin-diazo-arsánico con el antígeno homólogo se necesita emplear once veces más T, que H. HOOKER y BOYD interpretan su descubrimiento suponiendo que en el antisuero nombrado en primer lugar existen dos "antihaptenos", en uno de los cuales predominan grupos de ácido-tirosin-diazo-arsánico y en el otro los de ácido histidin-diazo-arsánico; en cambio, el segundo antisuero sólo debe contener uno de estos antihaptenos, lo que, por otra parte, concuerda con que la gela-

tina posee histidina, pero no contiene, o contiene muy poca cantidad, de tirosina (véase la nota al pie de la pág. 143). Esto parece indicar que la copulación de un mismo diazoderivado puede actuar de modo distinto según se produzca sobre tirosina o sobre histidina.

Parece probable, aunque tampoco esté establecido con seguridad y menos demostrado en detalle, que en el proceso de la copulación, por lo menos cuando la molécula proteica sólo se carga con una cantidad moderada de grupos diazoicos, intervengan determinados aminoácidos, por ejemplo, tirosina e histidina, con preferencia a otros capaces también de copularse. El *mínimo de copulación* fué investigado por HOOKER y BOYD (1932), BOYD y HOOKER (1935), así como por F. HAUROWITZ (1936), en lo que respecta, por razones técnicas (véase pág. 144), al ácido diarsalínico diazotado. Según HAUROWITZ, basta la presencia en la molécula de un antígeno complejo de un solo grupo con arsénico, para conseguir un anticuerpo específico con respecto al ácido arsánilico; pero, para descubrir estos anticuerpos *in vitro* por la reacción de precipitinas, debe utilizarse un antígeno que contenga en su molécula al menos 10 determinantes con As, porque el producto de la reacción sólo se precipita cuando cada molécula del antígeno fija 10 moléculas de la globulina inmune, adquiriendo el compuesto el tamaño necesario para flocular. Hay que comprobar si estos datos están bien establecidos; en todo caso parece dudoso que sean válidos para todos los diazo-derivados capaces de copularse con proteínas y para todas las proteínas.

Lo anterior es suficiente para hacernos ver que aunque estamos informados, en general, del tipo de modificación que las proteínas experimentan al copularse con diazoderivados, sabemos poco de las particularidades de tales transformaciones. Lo único indudable es que el proceso de la copulación puede transcurrir de diversos modos y no sólo cuando el diazoderivado o la proteína difieren de un compuesto a otro, sino incluso siendo idénticos ambos componentes (KABAT y HEIDELBERGER).

A este respecto resultan significativas las manifestaciones de K. LANDSTEINER (1945, pág. 159); que ha aportado la máxima contribución experimental en este campo. Este autor escribe: "No es de ningún modo fácil y puede exigir un gran número de animales la obtención de sueros inmunes específicos para los componentes azo y, con frecuencia, según sean las reacciones individuales de los animales de experimentación y la naturaleza de los grupos introducidos, se obtienen sueros que precipitan intensamente con las azoproteínas utilizadas para la inmunización y con otras combinaciones con proteí-

nas semejantes, pero que no precipitan, o sólo lo hacen débilmente, con azoantígenos preparados con proteínas muy diferentes. Tales sueros, naturalmente, no resultan apropiados para las investigaciones de que aquí tratamos (1) acerca de las relaciones entre la especificidad serológica y la composición química, punto al que con frecuencia no se presta la debida atención."

No se necesitan pruebas de que los derivados azoicos se combinan químicamente con las proteínas produciendo nuevas sustancias; ahora bien: de las observaciones que acaban de aducirse se deduce que en dichas combinaciones el componente proteico se modifica de modo imprevisible; es cierto que en la inmunización con proteínas naturales juega un gran papel la variación individual de los animales de experimentación; sin embargo, no puede atribuirse exclusivamente a esta circunstancia la variabilidad que, como antígeno parcial, presenta en las azoproteínas el componente proteico. Las proteínas de alto peso molecular, a pesar de alteraciones parciales, deben conservar su estructura en rasgos generales durante el proceso de la copulación, como se deduce de que en las azoproteínas se observe siempre un residuo de especificidad de especie. Un antisuero obtenido con una azoproteína de suero de caballo precipita con estas azoproteínas con más intensidad que con otras azoproteínas que posean el mismo componente azoico, pero obtenidas por copulación con otros sueros, observándose, por ejemplo, que la cantidad de precipitado disminuye en la serie caballo, vaca, hombre, ave y conejo (2) [citado por K. LANDSTEINER (1945), pág. 158].

La circunstancia de que por la copulación resulte una sustancia con carácter antigénico no permite asegurar nada con respecto al estado de la proteína en la azoproteína. De copulaciones con gelatina o con histonas, sustancias éstas incapaces en estado nativo de producir anticuerpos (véase pág. 133); pueden obtenerse sustancias diazoicas con capacidad antigénica; asimismo, si el derivado diazoico se combina con una sustancia que en estado nativo posea escasa actividad antigénica [como comprobaron en la insulina LOWELL (1942), J. H. LEWIS (1937), C. BERNSTEIN, KIRSNER y TURNER; véase también M. HARTEN y M. WALZER] se refuerza considerablemente tal actividad [R. F. CLUTTON, HARRINGTON y YUILL].

(1) Precisamente el autor alude a las investigaciones con antígenos complejos artificiales.

(2) En esta serie el conejo se encuentra en último lugar, porque los antisueros se obtuvieron por la inmunización de conejos; es decir, porque el suero de conejo es, en este caso, el suero de la propia especie.

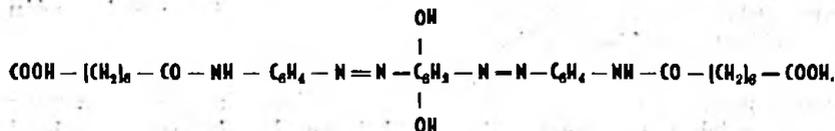
Investigación más importante que la de las modificaciones experimentadas por la proteína al copularse es, naturalmente, la del destino del derivado diazoico que se copula; las conclusiones generales, deducidas de los experimentos efectuados con azoproteínas, concernientes a las relaciones entre la especificidad serológica y la constitución química, se fundan en la suposición previa de que los derivados diazoicos, única entidad de estructura química conocida en todas las "ecuaciones antígeno-anticuerpo", permanecen inalterados. Se ha intentado la demostración de esta premisa por dos caminos distintos.

1. Un antisuero adaptado de modo bastante estricto a un determinado componente azoico (véase pág. 154) reacciona con todas las azoproteínas que contengan el mismo derivado diazoico independientemente de que la proteína a que éste se copula sea suero sanguíneo, eritrocitos o estromas de eritrocito, caseína, una proteína vegetal (teína, legumina) o gelatina o histona [K. LANDSTEINER y H. LAMPL (1918), K. LANDSTEINER y J. van der SCHEER (1934 a, 1939), PRESMAN, CAMPBELL y PAULING, M. ADANT (1930 d), GLUTTON, HARRINGTON y YUILL, N. GUTMAN y otros]. Por ello puede copularse el mismo componente azoico con dos proteínas distintas que no ofrezcan reacciones de parentesco (por ejemplo, con suero de caballo y suero de gallina o con seroglobulinas y ovalbúmina), y utilizarse una de las azoproteínas obtenidas para efectuar la inmunización y la otra como antígeno en la reacción *in vitro*; de esto parece deducirse que lo decisivo para la reacción entre antígeno y anticuerpo en el tubo de ensayo es el componente azoico, mientras que, serológicamente, la proteína queda excluida.

2. La inhibición específica de la reacción de precipitinas atestigua una exclusión aun más completa del componente proteico al operar *in vitro*. J. HALBAN y K. LANDSTEINER ya establecieron en 1902 que un exceso de antígeno inhibe la precipitación inmune. Si en la reacción de una azoproteína con su antisuero, el factor que determina la especificidad del antígeno fuera el derivado diazoico copulado a la proteína (véase el punto primero), sería posible, como deduce K. LANDSTEINER, mediante la saturación del anticuerpo por el componente azoico, inhibir la reacción de precipitación o de fijación del complemento entre la azoproteína y su anticuerpo. Esta hipótesis se ha comprobado experimentalmente por las más variadas combinaciones [K. LANDSTEINER (1920), LANDSTEINER y van der SCHEER (1928, 1929, 1932 a, 1931 b), F. HAUROWITZ y F. BREINL (1933), L. PILLEMER, ECKER y MARTIENSEN].

En las pruebas de inhibición, la fijación específica del derivado

azoico en el suero antiazoproteína se observa sólo de modo indirecto, por la inhibición de reacciones serológicas apreciables a simple vista. Ahora bien: LANDSTEINER y van der SCHEEN (1932 b, 1933) consiguieron también obtener reacciones serológicas directas (precipitaciones, desencadenamiento del choque anafiláctico) utilizando colorantes azoicos de constitución conocida; por ejemplo, un derivado del ácido córohico, que posee la siguiente fórmula:



algunos derivados análogos de los ácidos pimélico y adípico, y otros colorantes azoicos.

Pero, en todo caso, el éxito de las reacciones serológicas, tanto directas como indirectas, con colorantes azoicos de constitución química conocida y relativamente sencilla, está siempre ligada a la existencia del suero inmune correspondiente, que no puede obtenerse de otro modo que por la inmunización por una azoproteína. Lo anterior también es cierto, naturalmente, para los experimentos de anafilaxia activa; la sensibilización no se consigue más que mediante la azoproteína; con el derivado azoico exento de proteínas no se consigue sino desensibilizar, como previó, en 1922, R. DOERR y comprobó en 1924 K. LANDSTEINER, o, en determinadas circunstancias (véase luego), desencadenar el choque, que en resumidas cuentas es una reacción producida en el organismo entre el anticuerpo preexistente y el antígeno administrado en ese momento.

En la azoproteína, con la que ha de obtenerse el antisuero, el determinante químicamente conocido está combinado con la molécula proteica por intermedio del grupo azoico $\text{N} = \text{N}$, copulado con determinados aminoácidos de la cadena peptídica. De los experimentos de S. B. HOOKER y W. C. BOYD, citados en la página 153, así como de la circunstancia de que los antisueros obtenidos con azoproteínas manifiesten aún un resto de especificidad de especie, se deduce que, tanto el lugar en que se verifica la copulación, como el conjunto de la molécula de la azoproteína, participan no sólo en la formación del anticuerpo, sino en la determinación de los detalles de su especificidad. Con lo anterior están relacionados los resultados de experimentos de K. LANDSTEINER (1920), según los cuales las sales sódicas de los

aminoácidos aromáticos inhiben la reacción entre las azoproteínas (de dichos aminoácidos) y los antiseros correspondientes de un modo menos intenso que las combinaciones azoicas de los aminoácidos con tirosina; también está relacionado con ello las observaciones de E. BERGER y H. ERLNMEYER (1933), según las cuales los anticuerpos contra una azoproteína (de suero de cerdo y ácido sulfanílico diazotado), que circulan en la sangre de un conejo inmunizado, no se consiguen saturar por la inyección intravenosa de ácido sulfanílico o de una sustancia que contenga el grupo SO_3H , pero sí por la inyección de ácido tirosin-bis-azosulfanílico.

Así pues, si el antisuero obtenido con una azoproteína también reacciona *in vitro* con el derivado diazoico, sin duda existe una reacción parcial, que no comprende el vaciado en el anticuerpo de todo el antígeno, sino tan sólo el de una parte, que ciertamente puede ser tan grande que no permita la determinación serológica del resto. Esta opinión no modifica en nada, naturalmente, el alcance que la investigación con azoproteínas posee para demostrar que la especificidad del anticuerpo puede determinarse por estructuras químicas sencillas del antígeno y para el establecimiento del efecto determinante de determinadas configuraciones químicas. Sin embargo, para esclarecer la especificidad de los anticuerpos obtenidos por inmunización con antígenos naturales, estas investigaciones no pueden aplicarse sino de modo indirecto y sus resultados han sido, sin duda, sobrepasados ampliamente por los del análisis de los antígenos bacterianos y de sus anticuerpos (véase el volumen de "Antígenos"). Teniendo en cuenta estas circunstancias, basta con lo expuesto si nos limitamos a informar de los resultados de la investigación con azoproteínas, a los que cabe atribuir una importancia general, especialmente en lo que respecta al conocimiento de la formación y naturaleza de los anticuerpos.

INFLUENCIA DEL COMPONENTE QUÍMICAMENTE CONOCIDO DE LOS ANTÍGENOS COPULADOS SOBRE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS

I. Determinaciones múltiples.

En un mismo componente azoico pueden coexistir varios determinantes, por sencilla que sea la estructura de dicho componente.

El antisuero obtenido con ácido m-aminobenzosulfónico diazotado, reacciona de modo máximo con el ácido m-aminobenzosulfónico; también reacciona de modo intenso con el ácido o-aminobenzosulfó-

nico, y manifiestamente con el ácido 4-amino-2-toluosulfónico; en cambio reacciona débilmente con el ácido 4-cloranilin-3-sulfónico y no reacciona en absoluto con el ácido p-aminobenzosulfónico ni con el m-aminobenzoico (véanse págs. 162 y ss.). A la primera ojeada se aprecia, pues, que funcionan como determinantes el ácido benzosulfónico (el grupo SO_3H , fijado en el anillo bencénico) y, por otra parte, la posición meta de la inserción.

Hay otros muchos ejemplos análogos. También es importante que se haya demostrado serológicamente la existencia en los antígenos proteicos de una múltiple determinabilidad de constitución química desconocida. S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1934) pudieron convencerse, por los resultados de reacciones cruzadas entre ovalbúminas cristalizadas de gallina y pato que en una molécula antigénica deben existir determinantes diversos, cualitativamente hablando; en sus experimentos se pusieron a cubierto de las impurezas existentes en ambos preparados proteicos, de cuya homogeneidad molecular se aseguraron previamente por otros métodos.

II. Concurrencia mutua de determinantes.

Los determinantes existentes en la molécula de un componente diazoico pueden influir mutuamente, como había previsto R. DOERR (véase pág. 136), de modo que intervengan en la formación de los anticuerpos en distinta proporción. En este principio descansan las propiedades de los antisueros frente a azoproteínas, en cuya formación domina, en mayor o menor grado, el componente azoico del antígeno a la proteína en que va copulado. Está indudablemente justificado hablar de una "*concurrencia de los determinantes*" y de *diversos grados de actividad*, o, aplicando la terminología usada al estudiar los problemas de herencia, de *determinantes dominantes y recesivos*.

Como en otro lugar se ha expuesto, la influencia recíproca de los determinantes existentes en una misma molécula antigénica puede compararse con el fenómeno, conocido de antiguo, de la concurrencia entre dos o más antígenos. Como no se trata de una simple comparación, sino de una relación estrecha, intercalaremos aquí algunas aclaraciones, siguiendo una comunicación de R. DOERR (1929 b, página 808 y siguiente).

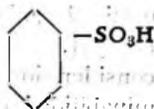
Se sabe que para la obtención de precipitinas, aglutininas, anti-toxinas, etc., resulta decisivo no sólo la especie y la individualidad del animal que suministra el suero, sino también las propiedades par-

ticulares de la sustancia utilizada como antígeno en la inmunización. Existen antígenos que regularmente y en breve plazo rinden anticuerpos de elevado título, mientras que otros fallan con frecuencia, obligando a emplear procedimientos de inmunización forzada para lograr únicamente antisueros de escasa actividad. Las diferencias resaltan claramente en los ensayos de anafilaxia activa en cobayos; los antígenos activos los sensibilizan a dosis mínimas y tras un período de incubación breve, mientras que los antígenos "débiles" deben administrarse en gran cantidad o ser inyectados reiteradamente para provocar el estado de anafilaxia, y esto sólo al cabo de un período largo.

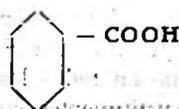
Si sobre el mismo organismo se hacen actuar simultáneamente dos antígenos de actividad distinta, puede observarse una inhibición total o parcial del más débil. Por ejemplo, los cobayos, que reciben simultáneamente 0,01 ml. de suero de vaca y 1,0 ml. de suero de caballo, tardan más en sensibilizarse frente al suero de vaca, y lo hacen más débilmente que los animales testigo, preparados exclusivamente con 0,01 ml. de suero de vaca. En este experimento un antígeno influye en la dosis efectiva del otro. Este efecto no contradice los resultados del experimento de R. DOERR y W. BERGER (1922 c), quienes sensibilizaron cobayos con una mezcla de euglobulina y albúmina (obtenida de la misma muestra de suero de caballo). La euglobulina inhibió por completo la aparición de la anafilaxia contra la albúmina, mientras que se administra una dosis de albúmina cien veces mayor no se impide en absoluto la sensibilización frente a la euglobulina. En este caso, por consiguiente, no se trata de una diferencia cuantitativa (de dosificación), sino cualitativa; la euglobulina se comporta como un antagonista inmunológico de la albúmina que posee un dinamismo mucho más enérgico e independiente.

Relaciones análogas se observan entre los determinantes de las azoproteínas: relaciones que ya se manifiestan entre el grupo azoico y la proteína, aunque en este caso podría objetarse que la reducción de actividad que se observa en la proteína pudiera deberse a que sufre modificaciones al copularse con el diazoico.

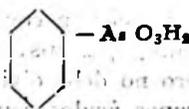
El fenómeno aparece con más claridad en la distinta actividad de los grupos químicos que se comportan como determinantes inmunológicos dentro del grupo diazoico mismo. La especificidad de los antisueros con respecto a las azoproteínas está condicionada de modo particularmente intenso por los grupos ácidos fijados al anillo benzenico [LANDSTEINER y H. LAMPL (1918) y K. LANDSTEINER (1920)]: Si se diazotan los tres ácidos



Acido benzoisulfónico.



Acido benzoico.



Acido benzarsínico.

y cada uno de estos tres ácidos diazotados se copula a una proteína, se obtienen azoproteínas, que producen anticuerpos de distinta especificidad. Los antisueros obtenidos con el ácido sulfónico no reaccionan, o reaccionan débilmente, con los antígenos que poseen el ácido carboxílico y, recíprocamente, los antígenos obtenidos con derivados de los ácidos carboxílicos sólo excepcionalmente reaccionan con los antígenos que contienen ácido sulfónico. Por el contrario, los antisueros obtenidos con derivados de ácido sulfónico manifiestan una especie de "especificidad dominante de ácido sulfónico" que les permite reaccionar con diversas sustancias con carácter de ácido sulfónico. La especificidad del ácido arsínico es aún más acusada, ya que los antisueros obtenidos con derivados del ácido benzarsínico reaccionan con un número mayor o menor de antígenos que poseen los grupos AsO_3H_2 , pero no con otros antígenos (LANDSTEINER y LAMPE (1918); K. LANDSTEINER (1920), H. ERLÉNMEYER y E. BERGER (1933 a), A. ERLÉNMEYER y E. BERGER (1933 a) han señalado que el cambio del grupo SO_3H por el SO_2H (de ácido benzolsulfónico por ácido benzolsulfínico) modifica la especificidad.

En oposición a lo que sucede con los grupos ácidos, las sustituciones con los grupos halógeno, metilo, metoxilo o nitro no influyen más que en corto grado en la especificidad de los anticuerpos producidos. LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1927) obtuvieron antisueros con anilina diazotada y observaron que tales antisueros reaccionan no sólo con anilina, sino con o-toluidina, o-cloranilina, m-toluidina, m-bromanilina, p-bromanilina, p-yodanilina, 3-nitro-4-metilanilina; en una palabra, con todas las combinaciones benzólicas mono o bi sustituidas de este tipo; tan sólo el grupo NO_2 posee un carácter algo más dominante, como también demuestran las reacciones del antisuero obtenido con p-nitranilina.

También se pone de manifiesto de modo muy característico el contraste entre el comportamiento de los grupos ácidos y el de los sustituyentes que no influyen más que débilmente sobre la especificidad, en la observación de que los sueros anti-anilina no dan reacción de precipitinas con antígenos que contienen grupos ácidos, ni, recíprocamente, los antisueros obtenidos con antígenos con grupos

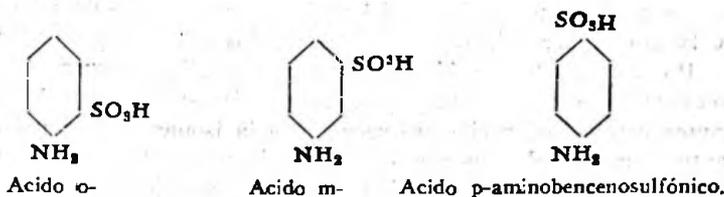
ácidos reaccionan con las azoproteínas obtenidas a partir de anilina o p-toluidina [LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1927)].

Pero no debe olvidarse que en todos los casos considerados tanto los grupos ácidos como los sustituyentes con determinabilidad escasa se encuentran fijados en un anillo bencénico o en un núcleo aún más complicado, y que por ello su acción no se acusa de modo independiente, sino que todo el componente azoico debe considerarse como una gran molécula influida por ellos. Por consiguiente, al hablar del efecto de un grupo ácido sobre el antígeno o sobre la especificidad del anticuerpo se emplea una expresión abreviada; análogamente, los grupos ácidos no se pueden comparar con los hológeno, metilo, metoxilo y nitro más que sustituyendo un átomo de hidrógeno del anillo bencénico.

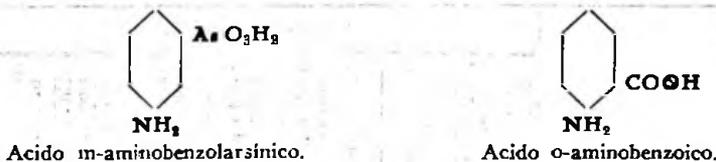
Por lo demás, las dos categorías de sustituyentes ácidos y neutros no pueden separarse entre sí de modo acusado. El efecto determinante de un grupo ácido, por ejemplo, del SO_3H , puede inhibirse por otro determinante, como puede observarse en el conocido ejemplo (página 158) del distinto comportamiento como antígeno de los ácidos o-aminobenzosulfónico y p-aminobenzosulfónico. Asimismo, K. LANDSTEINER y H. LAMPL (1918) y LANDSTEINER y VAN DER SCHEER (1927) pudieron demostrar, mediante diversos experimentos, que precisamente en los antígenos que poseen grupos ácidos la especificidad puede influirse de modo mucho más intenso que en los antígenos neutros por la introducción de sustituyentes nuevos. A su vez, entre los grupos neutros, el grupo carbonilo [$>\text{C}=\text{O}$] y el grupo CONH- se comportan de modo excepcional, ya que los anticuerpos obtenidos con anilina, o-cloranilina o p-toluidina, a pesar de su amplio campo de reacción, no reaccionan o lo hacen muy débilmente con las azoproteínas obtenidas con acetil-p-fenilendiamina o p-aminoacetofenona [LANDSTEINER y VAN DER SCHEER (1927)].

III. *La especificidad de los productos de disustitución del benceno isómeros.*

Si se diazotan las formas o-, m- y p- del ácido aminobenzosulfónico y se copula cada uno de los tres derivados diazotados con



proteínas, se obtienen tres azoproteínas, e inmunizando conejos con ellas se preparan los tres antisueros precipitantes correspondientes. El o-antisero, como puede designarsele abreviadamente, reacciona únicamente con la o-azoproteína y débilmente con la m-azoproteína (así como con el ácido 4-bromanilin-2-sulfónico), pero no con la azoproteína del ácido p-aminobenzosulfónico. El m-antisero no solamente reacciona con el antígeno obtenido del ácido m-aminobencenosulfónico (es decir, con el antígeno homólogo), sino también con la combinación orto, con el ácido m-aminobenzolarsínico y con el ácido 4-aminotoluol-2-sulfónico. Finalmente, el p-antisero reacciona fuertemente con la azoproteína homóloga y con la azoproteína obtenida con el ácido 6-aminotoluol-3-sulfónico, también sustituido en posición para; reacciona débilmente con el ácido m-aminobenzosulfónico y no reacciona en absoluto con el o-aminobenzosulfónico [K. LANDSTEINER y H. LAMPL (1918), K. LANDSTEINER y J. VAN DER SHEER (1936)].



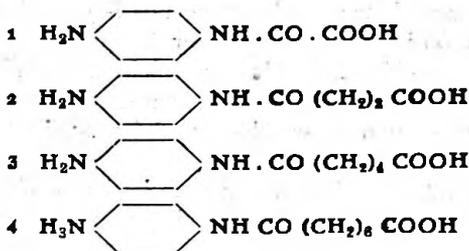
Observando estas reacciones, como también, por ejemplo, las de los m-antisueros con los ácidos m-aminobenzosulfónico y m-aminobenzolarsínico, se recibe la impresión de que lo que condiciona la formación de anticuerpos no es la naturaleza del derivado azoico copulado con la proteína, es decir la combinación aromática diazotada, sino la isomería de posición, esto es, la posición recíproca de las cadenas laterales en el anillo bencénico o, en expresión de M. MACHEROEUF (1993, pág. 125), la "configuración geométrica". Esto se manifiesta muy claramente en el hecho de que un antisuero para el ácido o-aminobenzoico reacciona con el antígeno homólogo con la misma

fuerza que con un antígeno del ácido o-aminobenzosulfónico, a pesar de la gran diferencia de los grupos ácidos (COOH y SO_3H).

Por otra parte, también se observan reacciones cruzadas entre las combinaciones orto, meta y para cuando la estructura de los determinantes copulados, hecha abstracción de la isomería, es igual o semejante, como puede observarse en los ejemplos citados de la reacción entre un antisuero para el ácido o-aminobenzosulfónico, con el isómero meta. La isomería de posición en ciertas circunstancias puede presentar el carácter de determinante inmunológico; pero de ningún modo lo hace siempre; en general, determina con tanta más energía cuanto más alejados estén ambos sustituyentes en el anillo bencénico; es decir, el efecto determinante crece con la serie orto, meta y para. También puede darse el caso, tratándose de reacciones con antígenos heterólogos, pero con sustituyentes del mismo tipo, de que la isomería de posición sólo aparezca cuando se cumplan determinadas condiciones independientes de la isomería. Esto puede observarse en la tabla 10, que resume los resultados de las investigaciones de K. LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1934 a) en un esquema publicado por K. LANDSTEINER (1945, pág. 171). Cuanto más largas sean las cadenas laterales alifáticas que poseen los antígenos con que se inmuniza, tanto más numerosas son las reacciones con las combinaciones para heterólogos (véase pág. 169).

TABLA 10

Antisuero.	Antígeno de									
	Acido p-aminooxantrónico.....	Acido p-aminofenilbutrico.....	Acido p-aminofenilacetico.....	Acido p-aminosuberanilico, n = 6.....	Acido p-aminoadiponilico, n = 5.....	Acido p-aminodipantilico, n = 4.....	Acido p-aminoglutaranilico, n = 3.....	Acido p-aminosuccinilico, n = 2.....	Acido p-aminonatanilico, n = 1.....	Acido p-aminooxantrilico.....
Acido p-aminooxantrónico ¹	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido p-aminosuccinilico ²	0	0	++++	+	0	0	0	0	0	0
Acido p-aminoadiponilico ³	0	0	+	+	+++	++	+	+	+	+
Acido p-aminosuberanilico ⁴	0	0	+	++	+++	+++	+++	+++	+	++

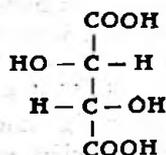


Observaciones: En los antígenos se señalan con n el número de grupos CH_2 que las cadenas laterales correspondientes poseen en la fórmula general $\text{NH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot (\text{CH}_2)_n \text{COH}$.—Los antígenos, que encabezan las columnas, obedecen todos a la fórmula general $\text{HN}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$ (ácido aminobenzoico) o $\text{NH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot (\text{CH}_2)_n \cdot \text{COOH}$.

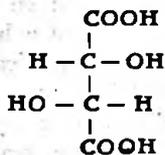
IV. La especificidad de los compuestos estereoisómeros.

La especificidad que ofrecen los isómeros de posición, con frecuencia muy acusada (véase pág. 162), encuentra una réplica en las diferencias de especificidad que manifiestan los compuestos estereoisómeros, es decir, las sustancias cuya isomería radica en las diferencias de configuración espacial de sus moléculas.

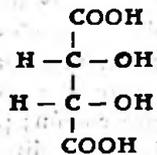
Los primeros ejemplos fueron dados a conocer por K. LANDSTEINER y VAN DER SCHEER (1928, 1929), y se refiere a dos colorantes isómeros, los ácidos d- y l-paraaminobenzoilfenilaminopácético y a los tres ácidos tartáricos isómeros.



Acido l-tartárico.



Acido r-tartárico.

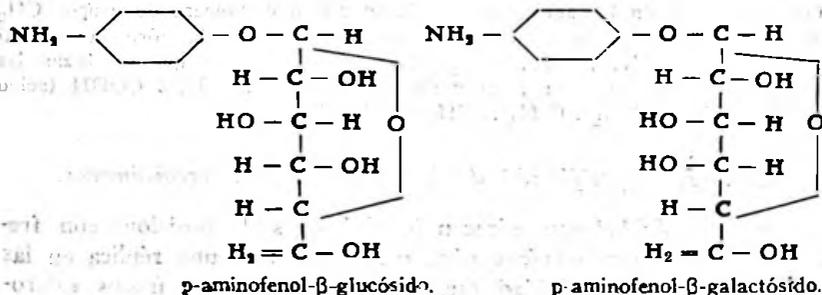


Acido m-tartárico.

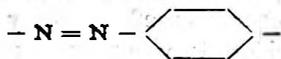
Por su transformación en los ácidos aminotartránicos, por la diazotación de éstos y, finalmente, por su copulación en proteínas se obtienen tres antígenos y los tres antisueros correspondientes. Efectuando las reacciones *in vitro* homólogas y cruzadas se observa que el l-antisuero reacciona fuertemente con el l-antígeno, pero muy débilmente con los r- y m-antígenos, y que de modo análogo se comportan los r- y m-antisueros. Además, los antisueros l- y r- manifiestan

tan capacidad de reaccionar con los antígenos l- y r- obtenidos a partir del ácido málico ópticamente activo, por lo que parece que la rotación determina específicamente la especificidad antigénica, y, como sucede con la isomería de posición, la configuración actúa como determinante, incluso cuando se observa diferencia en la estructura química.

En la misma categoría hay que incluir la diferenciación serológica entre el p-aminofenol- β -glucósido y el p-aminofenol- β -galactósido:



Mediante la diazotación se introduce en el anillo bencénico el grupo diazo



que permite la copulación con una proteína, dando origen a un compuesto capaz de formar anticuerpos; en una serie de experimentos, ambos derivados diazoicos se copulan a la misma proteína, y en otra serie, a proteínas distintas, tanto química como serológicamente. En el segundo caso, las glucoproteínas muestran una especificidad serológica común; pero en el primero se comportan como serológicamente diferentes, diferencia que, mediante reacciones de inhibición específica, se acusa incluso para glucósidos no enlazados a proteínas, si se practica la reacción de inhibición (precipitación) con una glucoproteína y su antisuero [O. T. AVERY y W. F. GOEBEL (1929)]. Los glucósidos esteroisómeros α - y β - no se comportan siempre como antígenos totalmente equivalentes, pero presentan reacciones de parentesco [W. F. GOEBEL, BABERS y AVERY, AVERY, GOEBEL y BABERS]. El acetyl- β -glucósido no da sino una débil reacción de precipitación con un suero anti- α -glucósido y no reacciona en absoluto con un suero anti- α -galactósido [W. F. GOEBEL y colaboradores, AVERY,

GOEBEL y BABERS], de lo que se deduce que la influencia determinante del grupo acetilo predomina energicamente sobre el factor nacido de la estereoisomería.

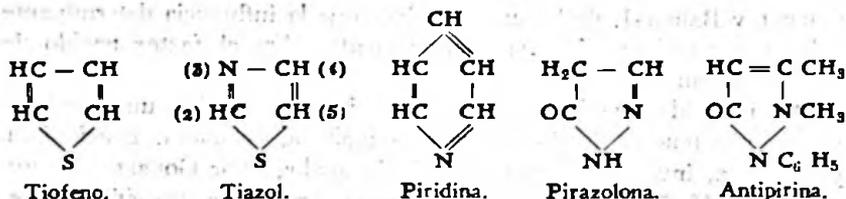
Es probable que la estereoisomería juegue también un papel en los p-aminofenoles de los disacáridos maltosa, celobiosa, genciobiosa y galactosa, investigados por un método análogo por GOEBEL, AVERY y BABERS (J. Exp. Med. 60, 599 (1934), ya que la especificidad de los anticuerpos obtenidos parecía más acusada cuando la hexosa terminal pertenecía al tipo β que cuando pertenecía al α . Sin embargo, la especificidad de los disacáridos puede estar influida por otros factores en grado muy intenso (configuración del total de la molécula, naturaleza de la hexosa terminal y modo de enlazarse las dos unidades de hexosa en el disacárido).

V. Combinaciones isósteras.

H. ERLÉNMEYER y E. BERGER (1932 a) observan que las azoproteínas preparadas con tres compuestos isósteros (1), es decir, con sustancias que poseen igual actividad de campo (p-aminodifeniléter, p-aminodifenilamina y p-aminodifenilmetano), se comportan serológicamente de modo tan semejante que no pueden distinguirse por este procedimiento; en cambio, con los sueros inmunes de las sustancias isósteras citadas no reacciona la p-aminodifenilcetona, sustancia química semejante, pero no isóstera. Un suero inmune obtenido con una proteína copulada con ácido sulfanílico reacciona, en pruebas de inhibición, con el ácido benzolsulfónico y con el ácido, de campo análogo, benzolselenónico (2), pero no con el ácido benzolsulfínico [ERLÉNMEYER y BERGER (1933 a)]. Los autores citados observan entre el benzol y el tiofeno una identidad o semejanza serológica fundada en el mismo principio [ERLÉNMEYER y BERGER (1933 b)]; asimismo, la reacción de precipitación entre un antisuero obtenido con 2-amino-tiazol y su antígeno se inhibe casi con la misma fuerza por amino-tiazol y por aminopiridina [E. BERGER].

(1) Con el nombre de compuestos isósteros se designan sustancias muy semejantes en estructura química y en propiedades físicas, por lo que con frecuencia se reemplazan mutuamente en los cristales.

(2) Ácido sulfanílico = $H_2N \cdot C_6H_4SO_3H$; ácido benzolsulfónico = $C_6H_5SO_3H$; ácido benzolselenónico = $C_6H_5SeO_3H$, y ácido benzolsulfínico = $C_6H_5SO_2H$.



Por último, H. ERLÉNMEYER y E. BERGER (1934), a partir de la 1-fenil-2,3-dimetil-4-amino-5-pirazolona (amidoantipirina), obtuvieron una azoproteína y el antisuero correspondiente y comprobaron el efecto inhibitor de diferentes derivados pirazolónicos sobre la reacción entre la azoproteína y su antisuero; observaron que sólo la inhiben los derivados que poseen el grupo $\text{C}_6\text{H}_5\text{.N-N.CH}_3$, al que también se atribuye la acción farmacológica de la antipirina.

VI. Longitud de la cadena lateral alifática del anillo benzoico.

K. LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1934 a) han señalado que, serológicamente, se distinguen entre sí el ácido benzoico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$) y el ácido fenil acético ($\text{C}_6\text{H}_5\text{.CH}_2\text{COOH}$), mientras que ya no se diferencian los ácidos fenilbutírico ($\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$) y fenilcaprónico ($\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$). Es decir, que la prolongación por un solo átomo de carbono de la breve cadena lateral del ácido benzoico ejerce una influencia manifiesta, mientras que carece de efecto el salto de cuatro a seis átomos.

De modo análogo se comportan las sustancias que se recogen en la tabla 10. Los antisueros obtenidos con los ácidos anílicos inferiores (ácidos oxanílico y succinánílico) no reaccionan más que con los antígenos homólogos, y no con antígenos que sólo difieran de ellos en poseer en la cadena lateral un átomo de carbono más o menos. Por el contrario, los ácidos anílicos superiores resultan mucho menos sensibles a este respecto, ya que sus antisueros reaccionan con un gran campo de sustancias emparentadas.

VII. Las azoproteínas obtenidas a partir de péptidos.

Las primeras investigaciones que se efectuaron en este campo fueron emprendidas por K. LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1932 a, 1934 a, 1939), que utilizaron para este fin cuatro péptidos sencillos: glicil-glicina, glicil-d,l-leucina, d,l-leucil-glicina y d,l-leu-

cil—d,l-leucina. Para conseguir antígenos a partir de estos dipéptidos se trataron primero con cloruro de p-nitrobenzoilo y después los grupos NO_2 se redujeron a NH_2 , de modo que se obtuvieron sustancias de la fórmula



(p-aminobenzoil-glicil-glicina); estas sustancias pueden diazotarse y copularse con proteínas (para efectuar inmunizaciones, en general, con suero de caballo, y para efectuar reacciones *in vitro* [precipitación e inhibición específica] con suero de gallina). Las reacciones de precipitación se exponen en la tabla siguiente, tomada de LANDSTEINER y VAN DER SCHEER (1932 a):

TABLA II (1)

Suero inmune contra	Antígeno de			
	Glicil-glicina.	Glicil-leucina.	Leucil-glicina.	Leucil-leucina.
Glicil-glicina	+++	o	o	o
Glicil-leucina	o	+++	o	turbidez
Leucil-glicina	+	o	+++	o
Leucil-leucina	o	+	o	++

Los resultados de la tabla señalan que la especificidad está determinada, en primer lugar, por el aminoácido terminal, cuyo carboxilo está libre, y, en segundo lugar, por el otro aminoácido.

A esta afirmación sigue inmediatamente la consecuencia de que los componentes de los dipéptidos, los aminoácidos, deben también poseer especificidad serológica, lo que confirmaron J. VAN DER SCHEER y LANDSTEINER con auxilio de la misma técnica; sólo se pueden observar reacciones de parentesco entre aminoácidos de estructura muy semejante, como, por ejemplo, entre glicocola y alanina, valina y leucina, asparragina y ácido glutámico.

Por otra parte, estos autores ampliaron también sus investigaciones, dirigiéndolas hacia los péptidos superiores (1934 b, 1939), utilizando antisueros contra tri- y pentapéptidos que constaban exclusi-

(1) Cinco gotas de antisuero + 0,2 ml. de antígeno (1 : 500); las lecturas se efectúan a las dos horas de mantener la mezcla a la temperatura del laboratorio.

vamente de glicina y tirosina, contra el tripéptido glutation, constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina, y contra dos pentapeptidamidas, efectuando con ellos pruebas de precipitación y de inhibición con una serie de péptidos de estructura análoga. También aquí se observa la influencia que sobre la especificidad ejerce al aminoácido terminal, influencia que se pone de manifiesto por la mayor frecuencia de las reacciones cruzadas con antígenos, en los que sea idéntico este miembro de la cadena peptídica. La transformación de los pentapéptidos en pentapentidamidas da lugar a un completo cambio de la especificidad, evidentemente debido a la transformación de los carboxilos terminales en grupos amínicos; en sentido análogo habla la observación de que las reacciones dominantes en las amidas no estén condicionadas por el grupo amídico terminal, sino por otras partes de la molécula. Por último, en los tri y pentapéptidos constituidos exclusivamente por glicina y leucina, un fuerte desplazamiento de un aminoácido en la molécula provoca una modificación de la especificidad; esto se observa, por ejemplo, al comparar el comportamiento de los tripéptidos glicil-glicil-leucina, glicil-leucil-glicina y leucil-glicil-glicina.

VIII. *La especificidad del anticuerpo como función del proceso de inmunización*

Si está justificado admitir que los determinantes de una molécula de antígeno dependen unos de otros y además que difieren entre sí, especialmente en su dinámica, parece *a priori* bastante verosímil que pueda influirse sobre la especificidad del anticuerpo, variando la duración e intensidad del proceso de inmunización, influencia debida a que al prolongar su acción se consigue que actúen también los determinantes más débiles, es decir, menos activos, con la consecuencia de disminuir la especificidad o, dicho de otro modo, de extender el campo de reacción. Así sucede, efectivamente.

La primera observación de este tipo fué efectuada por MAGNUS (1908) en experimentos de inmunización con extractos vegetales. Con sus resultados coincidieron los de los experimentos efectuados por WELLS y OSBORNE (1913, 1916) con proteínas vegetales, y G. MEISNER, en 1923, observó que el suero de conejo conseguido por inmunización prolongada con sueros de vaca o de hombre contiene precipitinas para sueros de otras especies, precipitinas cuyo título en muchos casos es considerablemente elevado. También hay que mencionar las experiencias de H. RÖSLI (1929), según las cuales los cobayos

sensibilizados por inyecciones repetidas de diversos antígenos (sueros de especies extrañas) terminan por responder con choque anafiláctico a la inyección de antígenos con los que nunca habían sido previamente tratados.

Años más tarde volvió a insistirse sobre este tema, utilizando como antígenos, en unos casos, proteínas animales purificadas, y en otros, azoproteínas [S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1933 b, 1934, 1936 b, 1939, 1941 c), M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 d); S. MALKIEL y W. C. BOYD, A. M. PAPPENHEIMER (1937), K. LANDSTEINER y VAN DEL SCHEER (1936, 1931 b, 1940)]. Los resultados de estos experimentos coinciden con los de las experiencias anteriores, en que en el curso de la inmunización con un mismo antígeno se va modificando la reactividad de los antisueros, entre otros en el sentido de ampliarse el campo de reacción. Merecen especial mención los experimentos de S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1939, 1941 c), quienes prepararon azoproteínas con el ácido p-aminobenzoico; para la inmunización copularon el ácido p-aminobenzoico diazotado con una hemocianina (de un *Limulus*), y como antígeno testigo emplearon la p-aminobenzoico-caseína e investigaron cuáles eran los compuestos, más o menos emparentados con el ácido p-aminobenzoico, que inhibían la precipitación entre el antisuero y el antígeno testigo. Según sus resultados, los antisueros obtenidos en las últimas sangrías se inhiben por determinados haptenos heterólogos (ácido ciclohexanocarboxílico) que no inhibe, en cambio, la reacción entre los antisueros de las primeras sangrías con el antígeno homólogo testigo.

Se ha intentado explicar de diversos modos este ensanchamiento del campo de reacción. Se han emitido las siguientes hipótesis:

1.º El antígeno, químicamente unitario, posee determinantes dominantes y otros con menor actividad; al principio se forman anticuerpos contra los grupos dominantes, y sólo posteriormente anticuerpos contra los determinantes de actividad menos energética.

2.º Al antígeno unitario corresponde un anticuerpo también unitario, cuyos grupos reactivos ("anti-determinantes") aumentan durante el curso de la inmunización de modo que las sangrías posteriores rinden una cantidad creciente de anticuerpos polivalentes.

3.º No es forzoso que el anticuerpo unitario contenga en su molécula *varios* grupos capaces de fijar el antígeno (anti-determinantes); bastaría *un* solo grupo capaz de fijarlo (de reaccionar con él) siempre que se admita que este grupo se modifica durante el curso de la inmunización, volviéndose mayor y más complicado en el sentido de adaptarse más perfectamente al antígeno. En los anticuerpos de las san-

grias posteriores el antígeno homólogo reacciona con la totalidad del grupo que lo fija, mientras que los antígenos o haptenos heterólogos sólo con una parte del mismo.

En el caso especial investigado por HOOKER y BOYD, estos autores se inclinaron hacia la tercera hipótesis; pero suponen que en otros casos, a saber, cuando el hapteno sea más sencillo que el ácido p-aminobenzoico, puede producirse el mecanismo señalado en primer lugar.

El ensanchamiento del campo de reacción producido por una inmunización forzada parece más considerable con las proteínas naturales que con las azoproteínas. Pero como en aquéllas (especialmente en las seroproteínas) se trata de modificaciones de la especificidad de especie, sobre cuyos fundamentos químicos no estamos suficientemente informados, no se puede hacer ninguna comparación conveniente entre los antígenos naturales (específicos de especie) y los antígenos complejos artificiales. En mi opinión, no se ha investigado suficientemente cómo se modifica la especificidad del anticuerpo por una inmunización prolongada con di, tri, tetra, pentapéptidos, etcétera, copulados.

Por lo demás, la hiperinmunización no sólo influye sobre la amplitud del campo de reacción del anticuerpo, sino sobre su capacidad de enlace [M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 d), HEIDELBERGER, H. T. TREFFERS y M. MAYER, A. M. PAPPENHEIMER jr. (1940), S. MALKIEL y W. C. BOYD], y también puede dar lugar a modificaciones físicas, por ejemplo, a la destrucción de las moléculas pesadas de anticuerpos (E. A. KABAT) y al cambio de la localización de los anticuerpos en las fracciones de globulina del antisuero [J. van der SCHEER, J. B. LAGSDIN y R. W. WYCKOFF, S. RAFFEL, Ch. F. PAIT y M. C. TERRY, S. RAFFEL y M. C. TERRY].

IX. Resumen de los resultados obtenidos con azoproteínas.

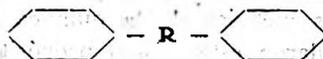
Además de los expuestos en la literatura inmunoquímica se encuentra aún una magnífica serie de otros resultados importantes. Se deben a experimentos que, desde el punto de vista químico, se variaron con arreglo a un plan, pero de los cuales, considerados biológicamente, no se esperaba sino un provecho empírico, por lo que los experimentadores mismos, y muchos autores, al referirse a tales resultados han de exteriorizar su asombro sobre el carácter del fruto de la experimentación.

Sólo posteriormente se ha procurado deducir de los descubri-

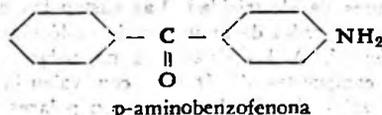
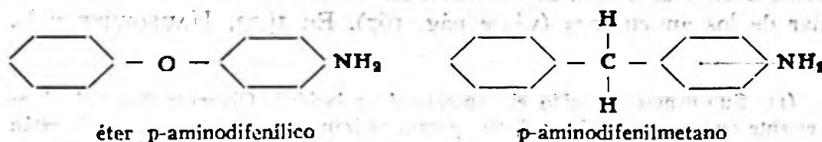
mientos serológicos el motivo genuino de la actividad de los determinantes. Inicialmente, K. LANDSTEINER (1920), registrando los hechos más que interpretándolos, apreció el predominio dinámico de los grupos ácidos sobre los neutros; HAUROWITZ (1942, 1943) comunicó posteriormente que podía obtenerse un antígeno por la diazotación de una base amónica fuerte (hidróxido de m-aminofeniltrimetilamonio) y su ulterior copulación con suero de oveja, antígeno en que la base de amonio actúa como determinante. Según HAUROWITZ (1943), no es la acidez en sí misma lo que decide el efecto determinante, sino su carácter polar (1), bajo cuya influencia se forman en el organismo las globulinas inmunes (los anticuerpos), o, dicho con más precisión, los antideterminantes (grupos reactivos) de las globulinas inmunes correspondientes a los grupos polares del antígeno, con los que pueden reaccionar. Los grupos ácidos deben su efecto determinante a su polaridad; por consiguiente, convendría sustituir las denominaciones "ácido" y "neutro" por las de "polar" (heteropolar) y "no polar" (homeopolar). Los trabajos citados de HAUROWITZ no han sido los primeros en que se ha intentado interpretar, a la luz de las nuevas concepciones sobre la estructura del átomo y de la molécula, los resultados obtenidos con los métodos de la química clásica; hacia 1932, diversos autores abordaron este mismo propósito con independencia y simultaneidad. ERLÉNMEYER y BERGER (1932 a, 1932 b), por ejemplo, señalan que "para relacionar los antígenos y la especificidad de los anticuerpos con la nueva química estructural hay que tener en cuenta los nuevos conceptos de campos atómicos y moleculares" (1932), ya que no pueden diferenciarse entre sí serológicamente las sustancias que poseen igual acción de campo, mientras que las diferencias en esta acción se traducen en los diversos modos de reaccionar de los anticuerpos (véase pág. 167). En 1933, HAUROWITZ y F.

(1) Suponemos conocido el concepto de polaridad. Observaremos sólo brevemente que las sustancias polares se caracterizan porque en estado sólido están constituidas por una red de iones y que en estado líquido se disocian por completo en iones, conductores de electricidad. Las sustancias no polares en estado sólido están constituidas por redes de átomos o de moléculas y en estado líquido no conducen la electricidad. A las sustancias no polares pertenecen aquellas cuyas moléculas están compuestas de átomos con valencia del mismo sentido (H_2 , O_2 , N_2 , Cl_2). Las sales ($Na + Cl^-$, etc.) son polares. La polaridad puede ofrecer *grados*. La medida de la polaridad de una molécula es su momento dipolar $\mu = e \zeta$, en cuya fórmula e significa la carga eléctrica, ζ la distancia entre las cargas positiva y negativa del dipolo (de las dos cargas opuestas que posee la molécula) (véase E. RIESENFELD, pág. 133).

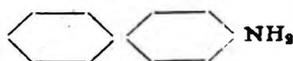
BREINL (1933) señalaron las diferencias entre el As y Sb (diferencias que también habían observado ERLÉNMEYER y BERGER (1932 b) en sus investigaciones con los ácidos p-aminofenilarsínico y p-aminofenilstibínico), y entre el arsénico trivalente y el pentavalente. En 1938 se había avanzado tanto en esta dirección, que J. R. MARRACK (1938) pudo ofrecer en su conocida monografía una exposición de conjunto de la influencia que la polaridad ejerce sobre el poder determinante de los grupos químicos del antígeno; en este trabajo también aporta como argumentos los antiguos trabajos de LANDSTEINER y su escuela, no sólo con el fin de aducir más pruebas experimentales de la importancia de las fuerzas físicas que se manifiestan en la polaridad y en la acción de campo, sino también con el de coordinar en la nueva teoría todo el material experimental reunido en trabajos conducidos por hipótesis distintas. En ambas direcciones consiguió efectuar un trabajo constructivo, estableciendo que las reacciones serológicas observadas en el tubo de ensayo justifican en general las consideraciones físico-químicas. Sin embargo, en algún caso particular también se observan contradicciones. Por ejemplo, las combinaciones de la forma



en las que R significa O, CH₂ ó NH, presentan un comportamiento inmunológico semejante y difieren netamente de las combinaciones en las que en el lugar de R figura el grupo CO [H. ERLÉNMEYER y E. BERGER (1932 a)]. Sin embargo, JOHN JACOBS, en experimentos efectuados con el éter p-aminodifenílico, el p-aminodifenilmetano y la p-aminobenzofenona,

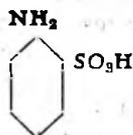


observa que las tres sustancias presentan (en contra de lo previsible) reacciones cruzadas y que un antisuero obtenido con p-aminodifenilo

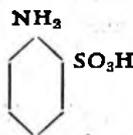


reacciona con las tres sustancias citadas casi con la misma intensidad. J. R. MARRACK (1938, pág. 119), al referir este descubrimiento de JACOBS, estima probable que la especificidad de estas reacciones serológicas esté determinada no sólo por el campo eléctrico en las proximidades de R, sino por otros factores.

Se observa otra discordancia en el descubrimiento de K. LANDSTEINER y H. LAMPL (1918), de que el antisuero obtenido a partir del ácido o-aminobenzosulfónico (es decir, de la azoproteína preparada



I



II



III

a partir de éste) no reacciona con azoproteínas obtenidas con dicho ácido sustituido en posición meta con respecto al grupo SO_3H , por Cl ó por CH_3 . Por consiguiente, tales antígenos tienen en común el anillo bencénico, los grupos NH_2 y SO_3H y su posición recíproca orto; también es idéntico el lugar en que se introduce el Cl en un caso y de CH_3 en el otro; ahora bien, la introducción de los sustituyentes *no polares* Cl ó CH_3 cambia profundamente la especificidad. Por el contrario, no se observan diferencias entre los productos de sustitución, designados en el esquema anterior por II y III; de modo que el antisuero obtenido con el II reacciona con una azoproteína obtenida con el III, y recíprocamente; es decir, que ambos grupos no polares resultan equivalentes en su efecto modificador de la especificidad del ácido o-aminobenzosulfónico. Al faltar el grupo SO_3H , las sustancias resultantes, anilina, p-cloranilina y p-toluidina, difieren poco entre sí en los ensayos de reacción cruzada [K. LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1927)], de modo que el efecto determinante de los Cl y CH_3 , situados en posición para con respecto a NH_2 , depende de la presencia del grupo SO_3H , o al menos está intensamente influido por ella. El mecanismo de este comportamiento permanece completamente oscuro.

Puede decirse que actualmente *no es posible predecir, sino en muy contados casos, la especificidad de un anticuerpo frente a un*

antígeno aún no investigado, a pesar de la suma de conocimientos de detalle en casos particulares que se ha ido amontonando. La situación, no obstante, ha progresado en que antes, cuando se operaba con fórmulas químicas transcritas del modo habitual, sólo podía indicarse, en unos casos, la identidad o semejanza serológica, a pesar de las grandes diferencias de la composición química, o inversamente; en otros, lo acusado de la especificidad en combinaciones químicamente análogas; pero no se podía aducir una explicación general para estos hechos. La aplicación de la concepción electrónica de la estructura del átomo y de la molécula, así como la de las ideas actuales acerca de las fuerzas intra e intermoleculares, a los fenómenos de la especificidad serológica pueden suministrarlos el lazo buscado entre todos los hechos de observación aparentemente inconexos, aunque hasta la fecha sólo se haya estudiado desde este punto de vista una mínima parte de lo observado.

Ahora bien: en la nueva dirección no pueden emprenderse más que experimentos en que se varíen los antígenos, para de la modificación de la reactividad de los anticuerpos obtenidos sacar conclusiones relativas a la naturaleza y actividad de los determinantes de los antígenos. En lo que concierne a los *antideterminantes*, es decir, a los grupos de los anticuerpos que condicionan sus reacciones con los antígenos, lo que sabemos se reduce a los siguientes puntos, que consideramos suficientemente confirmados: 1.º *Los antideterminantes deben producirse bajo la influencia de los determinantes*; en este punto sólo es problemático el "cómo" (véase pág. 78). 2.º *Los antideterminantes y los determinantes deben atraerse mutuamente*, ya que sólo esta hipótesis explica que los anticuerpos se eliminen cuantitativamente de los antisueños por la adsorción en células antigénicas (bacterias, eritrocitos, etcétera); y 3.º *Los anticuerpos son globulinas inmunes de molécula grande, que no poseen configuración lineal, sino que se apilatan formando ovillos elipsoidales*; al ponerse en contacto el anticuerpo con el antígeno actúan en primer lugar, y probablemente del modo más fuerte, los determinantes que se encuentran en la *superficie* de la molécula elipsoidal de la globulina inmune, que pueden ponerse, por su posición, en contacto más íntimo con los determinantes del antígeno.

L. PAULING (1940, 1945) intentó componer en una teoría congruente estos tres puntos con la representación de los fundamentos físico-químicos de la especificidad de los antígenos, teoría a la que ya había señalado con ocasión de su hipótesis acerca de la producción de anticuerpos bajo la influencia del antígeno (véanse pág. 80 y siguientes). En una de sus publicaciones más recientes, PAULING (1945) con-

sidera principalmente las fuerzas que actúan entre las grandes moléculas (antígeno proteico y sus globulinas inmunes) y que permiten la fijación del antígeno al anticuerpo. Según PAULING, estas fuerzas (atracción de los electrones, según VAN DER WAALS; los denominados enlaces de hidrógeno (1); la atracción entre grupos con cargas eléctricas opuestas) no son en sí mismas específicas; la especificidad sólo se produce porque la superficie de las moléculas que se ponen en contacto mutuo poseen estructura complementaria; es decir, porque las estructuras superficiales de ambas moléculas se complementan recíprocamente. Esta "complementaridad" puede extenderse a una porción mayor o menor de la superficie de ambas moléculas, debido a lo cual se acusa más o menos la especificidad de las reacciones. Según PAULING, dados nuestros actuales conocimientos de la estructura de la molécula y de las fuerzas intermoleculares, no cabe atribuir la especificidad de las reacciones serológicas más que a fuerzas intermoleculares no específicas que actúan tanto mejor cuanto más complementaria sea la superficie de la molécula del anticuerpo con respecto a la superficie de la molécula del antígeno. Hay que preguntarse cómo se debe interpretar que la *complementariness* de la estructura superficial tan pronto se extiende a un grupo ácido del antígeno como a las cadenas laterales alifáticas del anillo benzólico, a las isomerías de posición y estéricas, al comportamiento isótero o a diferentes combinaciones de estos factores (véase el ejemplo expuesto en la página 175), y apenas puede esperarse que en un próximo futuro se esclarezca cómo al originarse las globulinas inmunes aparece esta estructura simétrica a la del antígeno, ya en sí misma enigmática.

LOS ANTICUERPOS EN LAS REACCIONES DE PARÉTESCO

La investigación con azoproteínas nos obliga a volver a insistir sobre un tema antiguo: sobre las denominadas *reacciones de parentesco*.

En primer lugar, al utilizar la aglutinación con fines de diagnóstico se observó que los sueros de pacientes tíficos no sólo aglutinan los bacilos tíficos, sino también otras bacterias del grupo *Salmonella*

(1) "El enlace de hidrógeno" se produce cuando un átomo de H ligado a un átomo negativo atrae un par de electrones no compartidos de otro átomo o electronegativo. Los enlaces entre dos cadenas extendidas de polipéptidos, que se representan en la figura 12, son enlaces de hidrógeno de este tipo.

(el antiguo grupo *tifus-coli*), y asimismo que los antisueros artificiales de gran concentración, como los que se utilizan para la identificación de bacterias, no poseen una especificidad estricta, sino que contienen "coaglutininas" (*Mitagglutinine*). DURHAMS (1900) dió para este fenómeno la explicación de que el aglutinógeno contenido en las bacterias no tiene carácter unitario, sino que consta de un gran número de componentes (a, b, c, d, e, f, etc.), a los que corresponden un número igual de aglutininas parciales (A, B, C, D, E, F, etcétera), coexistentes en la aglutinina. Si, por ejemplo, los aglutinógenos de cuatro especies bacterianas poseyeran las composiciones representadas esquemáticamente en I-IV, un antisuero que poseyera la composición expresada en V flocularía con las tres primeras (de ellas con la I del modo más intenso), pero en cambio no lo haría con la IV.

I	II	III	IV	V
a, b, c, d, e, f,	c, d, e, f, g, h,	e, f, g, h, i, k,	g, h, i, k, l, m,	A, B, C, D, E, F,

No necesitamos insistir en este lugar en que esta concepción no armoniza con el estado actual de nuestros conocimientos, especialmente con el reconocimiento de la existencia de varios antígenos en la misma especie bacteriana. Para las consideraciones que siguen sólo es importante la disyuntiva entre dos hipótesis:

1.^a Que en un antígeno considerado como sustancia independiente existan antígenos parciales que actúen de modo individual en la producción de anticuerpos y en la reacción de éstos con el antígeno total.

2.^a Que en el anticuerpo considerado como una unidad sustancial existan aglutininas parciales, las cuales, sin perjuicio de su pertenencia estructural al anticuerpo total, puedan actuar con independencia, tanto genética como reactiva.

La hipótesis de DURHAMS no pudo sostenerse mucho tiempo. Aún se sostenía sin modificación en el artículo de R. KRAUS, N. KOVACS y R. PALTAUF jr. (1929); y K. LANDSTEINER, en 1933, en la edición alemana de su libro *Die Spezifität der serologischen Reaktionen*, todavía considera posible, aunque no seguro, que para formar varios anticuerpos sean necesarios varios individuos químicos (antígenos).

De los experimentos efectuados con azoproteínas se estableció con seguridad que en una molécula de antígeno pueden coexistir varios grupos o estructuras (los determinados inmuoquímicos) que influyen sobre la especificidad, es decir, sobre el campo de reacción del anticuerpo. Estos hechos hacían probable y concretaban químicamente, aunque con ciertas limitaciones, la mitad del esquema de DURHAMS.

Pero de ello, naturalmente, no se deduce que un antígeno unitario, aunque con varios determinantes, dé lugar a un anticuerpo también unitario y provisto de las mismas reactividades, en el sentido en que DURHAM consideraba el problema. Después de aplicar azoproteínas a la investigación en este campo hubo de pasar algún tiempo antes de establecer lo que también parece más racional, desde el punto de vista de la economía del pensamiento. Al fin, en el año 1935 y 1936 se revolucionó la concepción de este punto con apoyo de las investigaciones casi simultáneas de K. LANDSTEINER y J. van der SCHEER (1936), F. HAUROWITZ (1936), M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 a, 1935 b).

Como ejemplo aduciremos un experimento de HAUROWITZ, en el que se utilizó como antígeno complejo un producto de copulación entre atoxilo diazotado y seroglobulina de caballo. La inmunización de conejos con este antígeno da lugar a un antisuero que contiene, al menos, tres anticuerpos precipitantes, a saber: 1. Anticuerpos contra el determinante que contiene As. 2. Anticuerpos contra los grupos con especificidad de especie de la globulina de caballo; y 3. Anticuerpos contra los "grupos As-caballo". Los anticuerpos de la primera categoría precipitan con globulinas de conejo que contengan As, y los de la segunda con globulina de caballo normal (carentes de As); ambas precipitaciones se producen con independencia, dando análogo resultado cualquiera que sea la forma en que se sucedan. La seroglobulina de caballo con As, que se utilizó para la inmunización precipita con los tres tipos de anticuerpos, y el líquido sobrenadante no precipita con la globulina de conejo con As, ni con la seroglobulina de caballo normal, ni, por último, con la globulina de caballo con As.

Para completar lo anterior mencionaremos un experimento de LANDSTEINER y VAN DER SCHEER, que LANDSTEINER aduce en otro lugar [LANDSTEINER (1945, pág. 270)]. Este experimento se distingue de los anteriores en que sólo considera los determinantes de los derivados azoicos, químicamente conocidos, lo que resulta de fundamental importancia. Como antígeno emplea una azoproteína obtenida a partir del ácido metanílico ($\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_3\text{H}$). El antisuero dió precipitado con los ácidos o-aminobenzosulfónico, m-aminobenzosulfónico, m-aminobenzoico (y con las azoproteínas correspondientes), y, naturalmente, con los antígenos homólogos. Por la adsorción con azoproteínas heterólogas se consigue, principalmente, reducir la capacidad de reacción con cada uno de estos antígenos, mientras permanece intacta la reacción con el antígeno *homólogo* (véase la tabla 12, reproducción abreviada de la original).

TABLA 12 (1)

Antisuero del ácido metanílico, adsorbido con	Ácido o-aminobenzosulfónico.	Ácido metanílico.	Ácido meta-aminobenzolar-sínico.	Ácido meta-aminoben-zoico.
Ácido o-aminobenzosulfónico.....	0	+++	±	+
Ácido m-aminobenzolar-sínico.....	++	+++	0	+
Ácido m-aminobenzoico.	++	+++	±	0
Antisuero no adsorbido..	++	+++	+	++

Cuando se utilicen reacciones serológicas con fines de diagnóstico hay que comprobar inmediatamente si los métodos y los resultados obedecen a las siguientes reglas establecidas en los conocidos experimentos de saturación de CASTELLANI (obra citada, pág. 17): "1. El suero de un animal inmunizado para un determinado microorganismo pierde, al adicionársele el mismo microorganismo, tanto su capacidad de aglutinar éste como todos los restantes sobre los que dicho suero influya; 2. Si se le añade otro microorganismo, pierde su capacidad de aglutinarlo, pero no, en modo apreciable, la de aglutinar el primero; 3. Cuando se le adicionan microorganismos en los que no influye, permanece perfectamente intacta su capacidad de aglutinación." Según la segunda regla de CASTELLANI, un antisuero obtenido por la inmunización con dos especies bacterianas distintas, A y B, por la adsorción con A o B, sólo pierde la capacidad de aglutinar A o, en su caso, B; para separar por completo la sustancia aglutinante de los sueros de este tipo debe tratárselos simultánea o sucesivamente con A y B.

Vamos a ver en qué se diferencian estos experimentos de los anteriormente citados con azoproteínas, enteramente análogos en lo que respecta al planteamiento del problema y a los resultados.

Ante todo salta a la vista una diferencia objetiva. Las azoproteínas son individuos *químicos*, y las bacterias, *morfológicos*. En el primer caso la multiplicidad de las funciones antigénicas puede atribuirse a la coexistencia en la molécula antigénica de varios determinantes de

(1) En la tabla no se expresa la observación de qué si se adsorbe con el antígeno homólogo (ácido metanílico = ácido m-aminobenzosulfónico), se eliminan tanto las precipitinas para el mismo, como para todos los antígenos heterólogos.

la especificidad. Las bacterias, en cambio, pueden contener no sólo un único antígeno "específico de la especie", sino una pluralidad de proteínas, polisacáridos, endotoxinas, antígenos O, H y Vi, los cuales, aunque en su mayor parte no puedan obtenerse actualmente en estado de completa pureza, pueden separarse entre sí. Y, sin embargo, cuando se adsorbe con bacterias homólogas y heterólogas un antisuero obtenido mediante una sola especie bacteriana, no se comporta como si estuviera producido por una pluralidad de antígenos, sino exactamente como lo hace el suero anti-ácido metanílico cuando se le adsorbe por el antígeno con que se obtuvo y por azoproteínas heterólogas. *A priori* parece racional soslayar este conflicto, aceptando la suposición de que la célula bacteriana no contiene un enjambre de antígenos completamente independientes, sino que, al menos, una parte de los mismos, están combinados entre sí, constituyendo un complejo de mayor tamaño con grupos determinantes. Existen puntos de apoyo para esta suposición. Los polisacáridos específicos de tipo de los neumococos pueden aislarse en forma de hapteno; pero con toda probabilidad en las bacterias se encuentran combinados con proteínas [O. F. AVERY y M. HEIDELBERGER, W. T. J. MORGAN (1944, 1943), MORGAN y S. M. PARTRIDGE]; en todo caso, W. F. GOEBEL y O. T. AVERY [véase también AVERY y GOEBEL (1931)] consiguieron transformar el polisacárido específico de tipo de los neumococos del tipo III, en un antígeno completo mediante su diazotación y copulación con una seroglobulina (1). También mencionaremos el cuidadoso análisis del antígeno específico del tipo Z del *Shigella paradysenteriae* (B. Flexner), por F. BINKLEY, GOEBEL y F. PERLMAN. Este antígeno parece ser un complejo constituido por un fosfolipoide, un polisacárido acetilado, un componente tóxico y una proteína; el fosfolipoide no posee carácter antigénico, el polisacárido se comporta como un hapteno, el componente tóxico, tanto en estado aislado como en combinación con la proteína, origina en el conejo anticuerpos que no sólo reaccionan con ambos factores (es decir, con el componente tóxico y con la proteína), sino también con el antígeno intacto, sin desdoblarse.

K. LANDSTEINER y J. VAN DER SCHEER (1934 a, 1934 b, 1939) intentaron tender un puente entre los antígenos sintéticos (véanse los experimentos con el anticuerpo para el ácido metanílico en la pág. 179)

(1) La "inmunización de combinación" más sencilla, es decir, la simple mezcla de los hidratos de carbono bacterianos con el suero, fracasa en este caso (S. M. PARTRIDGE y W. T. J. MORGAN).

y los antígenos proteicos naturales con sus experimentos con péptidos. En relación con lo que nos ocupa en este lugar, resultan dignas de especial mención las pruebas de adsorción publicadas por K. LANDSTEINER (1945, pág. 269). Preparó un suero inmune por inmunización con aminoisofaliglicinleucina y lo adsorbió por separado con azoestroma-glicina y con azoestroma-leucina. En la tabla 13 se resumen los resultados obtenidos:

TABLA 13

	Adsorción reiterada con «G».			Adsorción reiterada con «L».		
	Antígeno testigo.			Antígeno testigo.		
	GIL	G	L	GIL	G	L
	+++±	o	+++±	++±	+	o
Antisuero no adsorbido...	+++±	+	+++±			

Con GIL se presenta el antígeno empleado para inmunizar (véase arriba), con "G" y con "L", respectivamente, los azoestromas de glicina y de leucina. Se señalan las reacciones obtenidas con los líquidos sobrenadantes después de una adsorción reiterada con el antígeno homólogo y con las azoproteínas de glicina (G) y de leucina (L).

Como se ve, el antisuero agotado con glicina o con leucina deja de reaccionar con estos antígenos (determinantes) parciales, mientras que se conserva enteramente, o casi por completo, la capacidad de reaccionar con el antígeno homólogo.

La segunda diferencia entre los experimentos de saturación de CASTELLANI y las precipitaciones fraccionadas de los sueros azoproteínicos (véase el ejemplo consignado en la página 180) radica en la interpretación teórica de ambas series de experimentos. DURGHAM, a la pluralidad de grupos específicos existente en el antígeno hace corresponder una pluralidad de los grupos reaccionantes del anticuerpo, opinión que fué sostenida posteriormente por diversos autores [KURT MEYER, K. MEYER y A. PIC] y que fué aducida especialmente para explicar el aumento del campo de reacción de los antisueros por la inmunización prolongada [M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 d), A. M. PAPPENHEIMER (1939), M. HEIDELBERGER, H. P. TREFFERS y M. MAYER; véase también pág. 170]. Se ha hecho, sin

embargo, la objeción de que al inmunizar simultáneamente con varios antígenos, en lugar de formarse anticuerpos polivalentes, habitualmente se producen anticuerpos en un número correspondiente al de antígenos, reaccionando cada uno de ellos con el correspondiente antígeno. Esta objeción no es convincente, porque no es lo mismo inmunizar con varios antígenos que con una única sustancia química que posea varios determinantes inmunoquímicos en su molécula. Entretanto, hasta la fecha, los experimentos con azoproteínas no parecen significar más que la inmunización con un antígeno definido como individualidad química rinde varios anticuerpos, e incluso, como F. HAUROWITZ (1936, 1938, 1943) afirma, es forzoso que los produzca. Toda esta dirección de la teoría se apoya en la hipótesis de que los anticuerpos son globulinas modificadas, cuya especificidad radica en su conformación sobre la matriz del antígeno. El modelado sobre el patrón del antígeno o la adaptación de la globulina al antígeno, según HAUROWITZ, puede efectuarse de modo más o menos perfecto, de modo que sobre la molécula de la globulina-anticuerpo puede dejar su impresión un único determinante o dos o más, pero nunca, en general, todos. K. LANDSTEINER (1945, pág. 271), en la discusión de las reacciones del antisuero para el ácido metanílico (pág. 179) expresa la opinión de que los resultados de estos experimentos apenas pueden explicarse de otro modo que aceptando la hipótesis de una pluralidad de anticuerpos que, además, no corresponden a grupos especiales del antígeno homólogo (ácido metanílico = ácido m-aminobenzosulfónico); una multiplicidad de reacciones serológicas no corresponde forzosamente a un mosaico concordante de estructuras químicas del antígeno; debe concebirse más bien que *los anticuerpos que se formaron como reacción a un único determinante antigénico*, aunque sean semejantes entre sí, como se deduce de las reacciones cruzadas con los antígenos heterólogos, no son idénticos. Lo que comúnmente se designa como "anticuerpo" es habitualmente una mezcla de diversas variantes de una muestra principal. Y cuanto más complicados sean los determinantes del antígeno, tanto mayor será, según LANDSTEINER, la tendencia a la producción de múltiples anticuerpos. Sin embargo, LANDSTEINER admite que en un antígeno pueden coexistir varios determinantes claramente distintos y que hay que considerar la diferencia entre un determinante complicado y una pluralidad de determinantes. LANDSTEINER cree probable que ofrezcan pluralidad de determinantes las moléculas de los antígenos proteicos naturales y particularmente las de los polisacáridos bacterianos [en este último caso, fundándose en las investigaciones de KENNETH GOODNER,

W. T. J. MORGAN (1937 b), P. B. WHITE, M. HEIDELBERGER, KABAT y M. MAYER]. Al principio, la opinión de que un antígeno unitario, desde el punto de vista químico, puede producir varios anticuerpos que difieren entre sí por su campo de especificidad se tuvo como tan probable como la hipótesis de que no se produce más que un solo anticuerpo, en el que el total de especificidades (determinantes del antígeno homólogo) estaban representadas por reactivas parciales (antideterminantes). Pero con los resultados de la adsorción por antígenos homólogos y heterólogos concuerda mejor la hipótesis de la pluralidad de los anticuerpos que suponer que de una molécula de anticuerpo puedan separarse por adsorción todos o algunos de los grupos reactivos. Pero si se acepta la hipótesis expuesta en primer lugar, hay que ser consecuente y admitir también las pruebas de saturación de CASTELLANI, válidas para los casos en que los antígenos no son individuos químicos, sino bacterias u otras células; si se admite que en las células existen diversos antígenos independientes o antígenos con varios determinantes que difieren entre sí de modo acusado y, además, que de acuerdo con la opinión anterior, a cada antígeno o a cada determinante corresponden varios anticuerpos (las variantes del motivo fundamental específico de LANDSTEINER), se llega a la consecuencia, difícilmente admisible, de que los antisueros obtenidos por inmunización con células contendrán todo un enjambre de diversos anticuerpos. En lo que concierne a los antígenos artificiales, especialmente cuando se trata de sustancias de constitución tan sencilla como los ácidos m-aminobenzosulfónico o p-aminobenzoico, la explicación hipotética de las reacciones dominantes tropieza con dificultades menores que en los antígenos naturales, incluso cuando éstos no se presentan en forma de células, sino de sustancias disueltas como las seroproteínas.

CRÍTICA DE LAS RELACIONES SEROLÓGICAS ENTRE ANTÍGENO Y ANTICUERPO, EN CUANTO FUENTE DEL CONOCIMIENTO DE LAS PROPIEDADES DEL ANTICUERPO

La serología determina las propiedades inmunológicas de los antígenos mediante los anticuerpos producidos por aquéllos y las propiedades de los anticuerpos por su comportamiento frente a los antígenos a que deben su formación. No utiliza ningún otro medio de estudio, lo que, desde el punto de vista de la teoría del conocimiento, resulta peligroso, y tanto más si se concede que en un antígeno definido como

individualidad química pueden coexistir varios determinantes con diversa actividad, con distinta colocación en el espacio y con dependencias mutuas variables, y que un solo antígeno determinado monovalente puede dar lugar a una serie de anticuerpos.

Como ejemplo se expone el experimento de F. HAUROWITZ, ya mencionado en otro lugar, sobre el que se harán las consideraciones pertinentes.

Por la inmunización con la azoproteína obtenida con atoxilo diazotado y globulina de caballo (As-Cb) se obtienen, según F. HAUROWITZ, tres anticuerpos que pueden designarse esquemáticamente como "Anti-As", "Anti-Cb" y "Anti-AsCb". De esta mezcla de anticuerpos, que debe existir en el antisuero, se precipita mediante el antígeno As sólo el Anti-As; por el antígeno Cb, sólo el Anti-Cb; pero ninguno de ellos precipita el Anti-AsCb, aunque este anticuerpo debe haberse producido por la cooperación de los determinantes As y Cb. Con el antígeno AsCb, por el contrario, se precipitan tanto el anticuerpo Anti-AsCb, como los Anti-As y Anti-Cb. HAUROWITZ (1943) explica estos hechos suponiendo que la fuerza precipitante de un antígeno aumenta con el número de determinantes, e intenta demostrarlo por la determinación del peso de los precipitados obtenido en la precipitación fraccionada de un antisuero cuando se la ordena, comenzando con antígenos de pocos factores determinantes, se sigue con antígenos de mayor número de determinantes y se termina con el antígeno homólogo que posee todos los determinantes. Ahora bien: "fuerza precipitante" es un concepto en el que no está contenido el criterio de especificidad, y todas las precipitaciones introducidas transcurren de modo específico y, dentro de su campo específico, de modo cuantitativo. La escasa fuerza precipitante del antígeno As o Cb no explica que carezcan de toda influencia, por pequeña que sea, sobre los anticuerpos homólogos (Anti-AsCb).

La debilidad de una teoría se descubre casi siempre porque la orientación experimental va exigiendo nuevas hipótesis auxiliares. Esto es lo que sucede con la mencionada explicación de la precipitación fraccionada por antígenos heterólogos y de la precipitación total del anticuerpo por el antígeno homólogo.

Con respecto a esto hemos de decir que F. HAUROWITZ y T. P. SCHWERIN también analizaron especialmente precipitaciones que se comportaban exactamente como las descritas, pero con la única diferencia de que los antígenos heterólogos, cuando se añadían previamente al antisuero impedían la precipitación por el antígeno homólogo. Expresado de modo esquemático, el antígeno ab da lugar a un anti-a, a un anti-b y a un anti-ab; el anti-ab no puede precipitar con a ni con b, pero no reacciona con su homólogo ab si previamente se le ha adicionado a o b. Hay que hacer la nueva suposición de que el anticuerpo anti-ab "está tan mal adaptado a ambos determinantes que

para su precipitación son necesarios ambos factores, por lo que sólo se produce la precipitación por el antígeno homólogo ab" [F. HAURWITZ (1943, pág. 265)]. En las reacciones de precipitinas la producción del floculado se hace depender, por consiguiente, por una parte de la fuerza precipitante del antígeno, que a su vez debe estar determinada por el número de determinantes contenidos en la molécula del antígeno, y, por otra parte, de la precipitabilidad del anticuerpo (de la globulina inmune), precipitabilidad que, sin embargo, no se define, o al menos no se define de modo exclusivo, como una función de la existencia de antigrupos específicos, sino por una nueva propiedad, a saber: *por el grado de adaptación a los determinantes del antígeno*. Esta adaptación puede manifestarse en todos los grados imaginables. M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 a, 1935 d) establecieron el concepto de *low-grade antibodies*: anticuerpos que por sí solos no floculan, sino que participan en la formación de precipitados provocados por otros anticuerpos; HAURWITZ no hace mención especial de estos anticuerpos, sino que tiene por probable (1943, página 275) que puedan existir en un antisuero *todos los grados intermedios imaginables entre anticuerpos bien adaptados, anticuerpos de adaptación moderada, anticuerpos desvalorizados y, por último, seroglobulinas normales*, por lo que quiere hablar de *espectros de anticuerpos de los antisueros*. En este espectro distingue tres categorías [HAURWITZ (1942)], a saber:

1.^a Los *low-grade antibodies*, ya postulados por HEIDELBERGER y KENDALL (véase antes), cuya adaptación al grupo determinante del antígeno es tan imperfecta que sólo se produce un enlace reversible, al que no sigue ninguna precipitación directa; sin embargo, son capaces, como atestiguan HAURWITZ y colaboradores, de incluirse en el volumen de precipitado provocado por la reacción simultánea de precipitinas de un grado de actividad más elevado.

2.^a *Anticuerpos incompletos o indiferenciados* que, aunque estén adaptados a los determinantes del antígeno de modo imperfecto, lo están suficientemente para precipitar con el antígeno homólogo.

3.^a *Anticuerpos diferenciales o especiales*, que se observan mejor adaptados a un determinante especial del antígeno, aunque en general no siempre estén adaptados por completo; estos anticuerpos no sólo precipitan por los antígenos homólogos, sino también por determinados antígenos heterólogos.

HAURWITZ y colaboradores consiguieron demostrar la presencia de anticuerpos indiferenciados y especiales en cada uno de los doce antisueros que examinaron. Asimismo encontraron puntos de apoyo

para admitir como probable que habitualmente existen *low-grade antibodies*. Por el contrario, no pudieron establecer nunca la existencia de un anticuerpo *perfectamente adaptado*; bajo esta designación entendiendo HAUROWITZ un anticuerpo que se adapte a todos los determinantes del antígeno empleado para la inmunización, de modo que pueda precipitarse cuantitativamente por cualquier antígeno heterólogo experimental, aunque no contenga más que uno solo de los determinantes del antígeno empleado en la inmunización. El agotamiento con uno de tales antígenos defectuosos debería inhibir la precipitación con cada uno de los demás antígenos testigos que contienen otros determinantes, caso que nunca pudo observar HAUROWITZ. HAUROWITZ ve en el resultado negativo de esta prueba, en el corto número de ejemplos considerados, un argumento decisivo en favor de la teoría de que los anticuerpos son globulinas conformadas por las fuerzas polares de la molécula del antígeno. Como los aminoácidos son rígidos, tal conformación sólo puede consistir en una modificación del orden de los mismos o en una deformación de las cadenas peptídicas; pero como estos procesos no pueden pasar de ciertos límites, la adaptación del anticuerpo al antígeno sólo muy excepcionalmente llega a ser la ideal.

Todas las afirmaciones aducidas fueron confirmadas por numerosas y concienzudas pruebas experimentales. Tampoco puede dudarse de la exactitud de los resultados experimentales, en tanto que éstos estén determinados por las condiciones experimentales elegidas. Pero otra cosa cabe decir de la generalización teórica de los resultados.

Ya fué señalado que el cúmulo de elementos hipotéticos que pretenden esclarecer las relaciones de dos sustancias que sólo pueden reconocerse y medirse una con respecto a la otra, tropieza con incertidumbres de índole general.

En particular señalaremos que en este caso la precipitación y la inhibición específica de esta reacción serológica constituyen el único objeto de la investigación. La aparición de una precipitación visible se ha hecho depender únicamente de la acción del antígeno sobre el anticuerpo y de la adaptación del anticuerpo al antígeno. Sin embargo, K. LANDSTEINER y J. van der SCHEER (1932 b, 1933) efectuaron experimentos en los que, como antígenos *in vitro*, utilizaron colorantes azoicos relativamente sencillos no copulados a proteínas; los antisueros se prepararon con las azoproteínas obtenidas mediante estos colorantes. Si por la mezcla de ambos componentes se producía una floculación específica era debido, químicamente, a que el colorante que funcionaba como antígeno poseía una cadena lateral alifática

suficientemente larga y, físicamente, al grado de dispersión del colorante en su disolución, porque su precipitabilidad por el antisuero aumenta paulatinamente con el tiempo de almacenamiento de las disoluciones. Como la floculación no es una expresión inmediata de la reacción entre antígeno y anticuerpo, sino una consecuencia secundaria de ella, parece natural que influyan en el resultado final diferentes factores, entre ellos algunos inespecíficos.

Entre los "determinantes" de los antígenos se cuentan objetos inadecuados y, por ejemplo, se incluyen en la misma categoría el arsénico en el atoxilo diazotado, el yodo en la yodoalbúmina, lo ajeno de la especie en el suero de caballo (en la globulina del caballo) para el conejo, la posición *para* de un grupo ácido en un azoderivado copulado a una proteína, etc.; y, además, a estos determinantes se les atribuye una independencia que no poseen en absoluto, ya que sólo adquieren la capacidad de actuar de modo específico una vez enlazados en la molécula, e incluso, con frecuencia, sólo cuando se enlazan en determinados lugares de ella.

Debemos añadir a lo anterior que todas estas propiedades de las azoproteínas, que no juegan ningún papel en el metabolismo normal de los animales de sangre caliente, pueden conseguir formar de las globulinas tipos de anticuerpos de ilimitada diversidad y de las más distintas combinaciones, mientras que, por otra parte, parece ser muy acusada la limitación de la plasticidad de las globulinas. Dicho con otras palabras, existe una *contradictio in adjecto* entre la deficiente adaptabilidad de las globulinas al antígeno y la innumerable cantidad de anticuerpos de las más diversas especificidades, tanto naturales como artificiales.

Cabría esperar que el *ictus immunisatorius*, inducido por una única y mínima dosis de antígeno, debiera ocasionar anticuerpos particularmente mal adaptados, y que por la posterior acción del mismo antígeno se fueran consiguiendo anticuerpos mejor adaptados. Pero la experiencia demuestra justamente lo contrario (véase pág. 170).

Finalmente, no se ha efectuado ningún intento para relacionar lo anterior con los resultados de las pruebas de saturación de CASTELLANI.

Al efectuar un examen retrospectivo de los progresos en la investigación de la especificidad serológica, cabe designar como momento crucial la introducción de los antígenos modificados químicamente y de la concepción que ellos aportan de determinantes inmuoquímicos. Parece, sin embargo, que al afirmar la influencia de las estructuras

antigénicas químicamente conocidas sobre la especificidad del anticuerpo se ha vencido el sostenido hasta la fecha por el modo de considerar el problema místico-vitalista. Pero esta esperanza sólo se ha cumplido en parte, pues en el balance que hoy puede presentarse se contraponen el activo de la consolidación química de las funciones antigénicas, frente a la imposibilidad de comprender la esencia y modo de acción de los anticuerpos.

CAPÍTULO VII

LAS REACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO "IN VITRO"

A. MÉTODOS PARTICULARES PARA OBTENER LOS PRECIPITADOS INMUNES

Es sabido que las reacciones de los antígenos con sus anticuerpos se designan según las modificaciones que se producen en la mezcla reaccionante. En muchos casos estas alteraciones pueden observarse a simple vista, lo que, naturalmente, simplifica el análisis del proceso de la reacción. Un ejemplo notable es el que ofrece la precipitación, por lo que desde C. v. DUNGER, que comprendió sus posibilidades, hasta la actualidad, ha sido objeto preferido de la investigación serológica. También este capítulo comenzará por el estudio de esta reacción, lo que se justifica además por la circunstancia, cuyo conocimiento debemos a G. RAMÓN (1922), de que la reacción entre toxina y antitoxina puede también transcurrir como una precipitación inmune, por lo que la introducción adquiere desde el primer momento una validez más general.

Si se inyecta a un conejo por vía parenteral ovalbúmina pura, aparecen en el plasma sanguíneo (suero) del animal anticuerpos que precipitan con la ovalbúmina, y que por este motivo se designan como *precipitinas*. Para apreciar la medida en que participan el antígeno y el anticuerpo en el proceso, pueden seguirse dos caminos: 1. Se puede añadir el antígeno, o el antisuero que contienen los anticuerpos, en cantidades decrecientes y observar si la disminución del antígeno, o la reducción del suero inmune puede proseguirse sin que se impida la producción del precipitado; aquel componente de la reacción cuya cantidad no pueda reducirse o sólo pueda disminuirse en pequeña proporción, debe ser el que participe de modo predominante en la formación del precipitado. 2. Se puede investigar el precipitado con arreglo a determinados criterios y deducir de los análisis su composición cuantitativa en antígeno y en anticuerpo (es decir, en la globulina inmune del antisuero).

I. Efecto de la modificación cuantitativa de ambos componentes en los ensayos con precipitinas.

Este experimento conduce al conocido resultado de que se puede disminuir considerablemente la cantidad del antígeno sin impedir la formación de un precipitado manifiesto. Por ejemplo: si se utilizan precipitinas de "valencia elevada", la ovalbúmina reacciona positivamente, incluso a diluciones de 1 : 100.000 (F. S. JONES y R. B. LITTLE) y los polisacáridos específicos del neumococo pueden descubrirse como "sustancias precipitables" incluso a concentraciones de 1 : 6.000.000 (O. T. AVERY y M. HEIDELBERGER). Por el contrario, la cantidad de suero inmune no puede reducirse mucho. Si se mezclan las disoluciones del antígeno con el antisuero, de modo que el volumen total de la mezcla sea de 1,1 ml., suele necesitarse habitualmente 0,1 ml. de antisuero, y la precipitación no se produce cuando no se añade más que 0,01 ml. La conclusión, por consiguiente, de que el precipitado procede de modo preponderante del antisuero parece estar bien fundada.

II. Diferencias cuantitativas entre la precipitación inmune y otra reacción serológica de floculación, la aglutinación.

Las relaciones cuantitativas necesarias para que se produzca la reacción de precipitinas se invierten en otra reacción de precipitación: en la aglutinación. En estas reacciones, la cantidad del antígeno, a saber: la de las células aglutinables (bacterias, hematies), no puede reducirse por debajo de una determinada cantidad; en cambio, los sueros aglutinantes pueden diluirse mucho, en ocasiones hasta 10.000-100.000 veces, sin que se perjudique su efecto. Ahora bien: el precipitado que se observa en la aglutinación está formado por las células antigénicas, como demuestra el examen microscópico; cuando el número de células, por ejemplo, de bacterias incoloras, es sumamente pequeño, el producto de la floculación puede dejar de ser apreciable a simple vista. De lo anterior se deduce la necesidad de la existencia de una cantidad suficiente de partículas con contenido antigénico. Lo que ya no se comprende tan fácilmente es por qué bastan cantidades tan ínfimas de globulinas inmunes para conseguir una aglutinación; y tampoco se comprende la causa de que en las precipitaciones inmunes pueda diluirse tanto el antígeno, sobre todo teniendo en cuenta que en este caso las partículas antigénicas precipitables son de tamaño

mucho menor que las células (en ocasiones del orden de dimensión molecular), por lo que, en contra de lo que sucede, al aumentar la dilución del antígeno parece que los precipitados deberían resultar invisibles con mucha mayor rapidez.

III. *Aglutininas y precipitinas de las bacterias.*

Ya en 1897 R. KRAUS observó que un antisuero obtenido por inmunización con bacterias reaccionaba de modo específico, formando un precipitado con los extractos de estas bacterias; el descubrimiento de estas "precipitinas bacterianas" era precursor del reconocimiento de que la reacción con precipitinas no se limita a sustancias bacterianas, sino que puede extenderse a proteínas extrañas al animal inmunizado de procedencia animal o vegetal. En esta generalización y en su significación biológica se funda la especial importancia teórica de estas precipitinas bacterianas. Se observó, además, que un mismo antisuero aglutina las bacterias intactas y precipita los extractos de las mismas; parece, pues, probable que precipitinas y aglutininas no sean sino una doble designación de los mismos anticuerpos (1); una consecuencia inmediata de esta hipótesis es que la diferencia de los fenómenos observados en la precipitación y en la aglutinación no se debe más que a la distinta forma de la partícula antigénica. Ahora bien: tal punto de vista "unificador" que sustentaron algunos autores tuvo poca resonancia. Se había hecho habitual designar cada forma particular de las reacciones entre antígeno y anticuerpo, así como los antígenos y anticuerpos correspondientes, con un nombre especial alusivo a la apariencia del fenómeno (aglutinación y aglutininas, precipitación y precipitinas, neutralización de toxinas y antitoxinas, etcétera), de modo que no carecía de justificación la observación satírica de LE DANTEC, de que el mundo conceptual de los inmunólogos era el reino de las "fenomeninas".

(1) R. KRAUS (*Wien. Klin. Wschr.*, 1898) había supuesto inicialmente, "que las sustancias de los filtrados bacterianos debían ser idénticas a las sustancias aglutinables de las bacterias"; pero se retractó, en parte, posteriormente de este pensamiento y, fundándose en las pruebas de combinación y en las investigaciones de E. P. PICK (1901) y O. BAIL (*Arch. f. Hyg.*, 1902), adoptó la hipótesis de compromiso de que los filtrados de los cultivos bacterianos contienen, además de "sustancias *sui generis* aglutinables específicamente", "sustancias precipitables específicamente" [R. KRAUS y C. v. PIRQUET (1902)].

IV. *Estudio experimental de la influencia que sobre las relaciones cuantitativas entre antígeno y anticuerpo ejerce la modificación del tamaño de la partícula del antígeno.*

De ser cierto que la precipitación y la aglutinación sólo se distinguen por la forma de la partícula del antígeno, parece posible transformar una precipitación en aglutinación si se consigue dar al antígeno de la precipitación la configuración de los elementos aglutinables. Apoyándose en algunos experimentos anteriores, F. S. JONES (1925, 1928 b) consiguió este fin sin más que tratar bacterias con suero vacuno y lavarlas luego hasta que en las aguas de lavado no pudieran demostrarse indicios de dicho suero; las bacterias así tratadas resultaban aglutinables por una precipitina para suero vacuno, incluso a las elevadas diluciones de 1 : 200 ó 1 : 500. El mismo resultado se consiguió en ensayos efectuados con partículas de colodión que previamente habían sido agitadas con suero vacuno o con ovalbúmina y luego lavadas a fondo, cuando se mezclaban con los antisueros precipitantes correspondientes a dichas proteínas; también en estos casos se observa la aglutinación de las partículas, y bastan, asimismo, concentraciones mínimas de antisuero que oscilan entre 1 : 500 y 1 : 1.000. JONES explicó su observación admitiendo que las bacterias o las partículas de colodión retienen por adsorción una película de la proteína precipitable y que la floculación se produce después, a cian la reacción a simple vista. Este autor consideró sus resultados pesar de la gran dilución del suero inmune, simplemente porque el enorme aumento de tamaño de la partícula de antígeno permite apreciar como una corroboración de la hipótesis de O. T. AVERY y M. HEIDELBERGER, de que la aglutinación es un proceso que se produce en la superficie de las bacterias. Asimismo JONES y R. B. LITTLE afirmaron en una comunicación que el volumen de las células bacterianas aumenta en la aglutinación y tanto más, en general, cuanto mayor sea la concentración del suero aglutinante que se les adiciona; sin embargo, la explicación de este aumento de volumen tropezó con dificultades porque era mayor que lo que podría esperarse de la cantidad de proteína del antisuero que han adsorbido las células.

También se ha observado que las partículas de colodión o las bacterias muertas en cuya superficie se hayan absorbido determinadas especies de virus (virus de la gripe, fiebre amarilla, encefalitis de San Luis, poliomiélitis, peste porcina) se aglutinan de modo específico por los antisueros correspondientes [K. GOODNER (1941), E. C. ROBERTS y L. R. JONES (1941 b, 1942 a, 1942 b),

A. J. WEIL (1942), E. C. ROBERTS (1945)]. Las especies de virus señaladas se distinguen por sus dimensiones especialmente pequeñas, por lo que la consecuencia visible de su reacción inmune con los anticuerpos correspondientes no puede considerarse más que como una precipitación; la transformación en aglutinación resulta, pues, en este caso convincente, sobre todo si se considera que también se produce la floculación cuando se emplea antisuero muy diluido. Se ha presentado la objeción de que no actúan todos los tipos de antisueros (K. GOODNER, 1941); por otra parte, H. E. PEARSON (1944) no consiguió sino resultados negativos al operar con algunos tipos de virus a pesar de haber variado varias veces su técnica. Probablemente juega cierto papel la circunstancia de que en general no se opera con suspensiones puras de virus, sino que se utilizan suspensiones de los tejidos que los contienen; también pudiera ser errónea la suposición de que todas las especies de virus pueden adsorberse en las partículas de colodión o en las bacterias muertas, como es posible hacerlo con todos los antígenos proteicos (seroproteínas).

Después de exponer la sugerencia señalada acerca de la influencia del tamaño de la partícula, JONES no se ha extendido más en su investigación sobre las causas de las diferencias cuantitativas en las proporciones entre el antígeno y el anticuerpo que se observan en la precipitación y en la aglutinación. Esta laguna intentó llenarla por primera vez M. H. MERRILL en 1936.

V. La teoría de M. H. Merrill.

MERRILL se preguntó por qué solían dar resultados negativos los intentos de efectuar reacciones serológicas con virus, e hizo responsable de los fracasos a la circunstancia de aplicarse los elementos de virus en concentraciones insuficientes. De diferentes datos acerca de las dosis mínimas de antígeno necesarias para conseguir una precipitación positiva (10^{-8} mg. de ovalbúmina, 2×10^{-4} mg. de polisacáridos del neumococo, etc., por ml. de disolución antigénica) calculó que la masa mínima necesaria para una floculación visible es de 0,001 mg. por ml., cifra que debe representar el producto del número N de partículas por la masa M de cada una de ellas:

$$N \cdot M = 0,001 \text{ mg.} \quad \text{ó} \quad N = \frac{0,001}{M}$$

Si se comprueba esta igualdad empleando elementos antigénicos de dimensiones crecientes (moléculas de colorantes diazoicos, ovalbúmina, hemoglobina, diferentes especies de virus, bacterias, eritrocitos), se aprecia bastante coincidencia entre lo establecido de modo experimental (apoyado en la constante de 0,001 mg. de antígeno

por ml.) y los valores calculados (véase fig. 15). No obstante, en los valores experimentales obtenidos con las partículas más pequeñas se observa en la constante admitida de 0,001 mg. una tendencia a dismi-

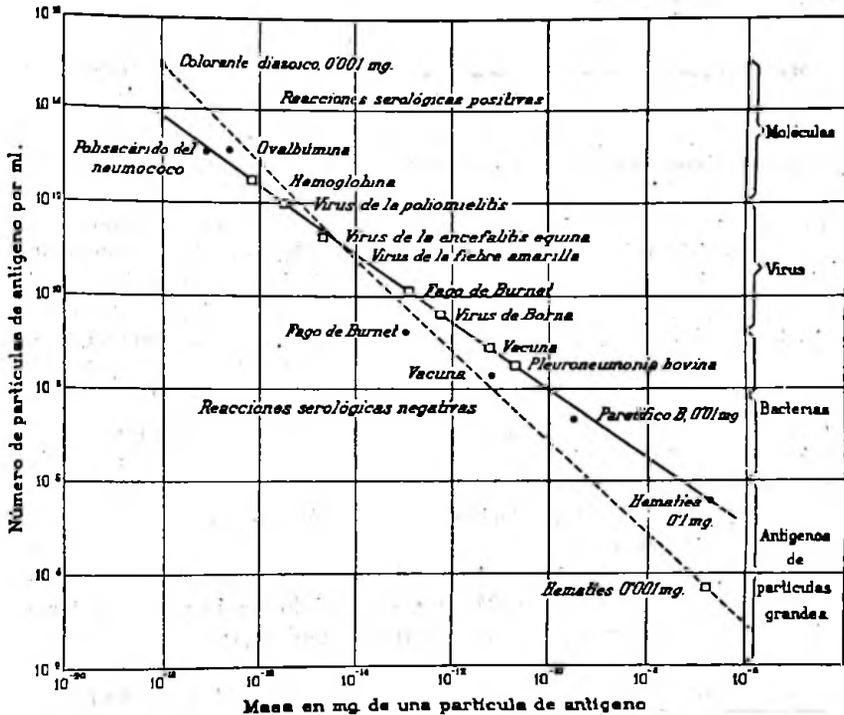


FIG. 15 (según MERRILL) Los círculos pequeños negros corresponden a los valores experimentales, y los cuadrados blancos, a los valores teóricos. La línea llena une los valores teóricos de las reacciones serológicas positivas basados en el número básico de 0,001 mg. de masa antigénica por ml. de suspensión del antígeno; por encima de esta línea se encuentra el campo de las reacciones serológicas positivas, y por debajo de él, el de las reacciones negativas; la línea punteada separa ambos campos según los datos obtenidos experimentalmente.

nuir, mientras que para las partículas mayores tiende a sobrepasar dicho valor; por ejemplo, en los bacilos paratíficos alcanza a 0,01 y en los eritrocitos incluso a 0,1 mg. MERRILL buscó el motivo de estas desviaciones regulares en la dependencia que existe entre la participación del suero inmune en la formación de los agregados visibles y el tamaño de las partículas. Para una determinada masa de antígeno;

al reducirse el tamaño de las partículas la superficie total de las mismas debe crecer de modo muy considerable, como manifiestan los pares de valores extremos determinados por MERRILL, que se exponen a continuación:

<i>Masa antigénica mínima necesaria para una reacción visible.</i>	<i>Superficie de esta masa antigénica.</i>	
Eritrocitos	0,1 mg.	80 mm ²
Colorante diazoico (molécula).....	0,001 mg.	5300 mm ²

Pero cuanto mayor sea la superficie total de las partículas tanto más proteínas del antisuero pueden anclarse en ella, con el aumento consiguiente de las dimensiones de cada partícula. La superficie total necesaria para que se forme un agregado visible varía, pues, en los distintos antígenos entre 80 y 5.300 mm² por ml. (véase antes), y a esto hay que atribuir, según MERRILL, que el valor de $N \cdot M = 0,001$ mg. no sea constante, sino que experimente desviaciones entre 0,1 y 0,001 mg. Por consiguiente, hay dos relaciones que determinan la posibilidad de un resultado experimental apreciable a simple vista: 1.ª La relación entre el número de partículas y la masa de cada una de ellas; y 2.ª La relación entre el número de partículas y la superficie de éstas.

Según el número de partículas de antígeno necesarias para conseguir una reacción visible, MERRILL clasificó los antígenos considerados en la figura 15, en los cuatro grupos siguientes:

<i>Tipo de antígeno.</i>	<i>Número mínimo de partículas por ml.</i>
I. Moléculas.	$10^{12} - 10^{15}$
II. Virus.	$10^9 - 10^{12}$
III. Bacterias.	$10^8 - 10^9$
IV. Elementos de tamaño mayor que las bacterias.	$\cong 4 \times 10^5$

Estos grupos no se distinguen entre sí nítidamente, sino que se superponen en parte. En el primer grupo, la reacción "in vitro" se produce en forma de precipitación; en el tercero y cuarto, en forma de aglutinación, y en el segundo pueden observarse ambas formas, según se trate de virus de tamaño mayor o menor; por ejemplo, de fagos o de los corpúsculos de la vacuna.

Crítica de la teoría de Merrill.—Pudiera objetarse simplemente que las investigaciones y reflexiones de MERRILL no hacen sino conducir a

la proposición que sigue, aceptada desde mucho antes: en la aglutinación, el floculo está constituido principalmente por las células, es decir, por los antígenos, mientras que en la precipitación lo está de modo predominante por las proteínas inmunes del antisuero (es decir, por los anticuerpos). Este juicio sería inexacto. MERRILL se deja llevar a un modo de enfocar el problema puramente fenológico e inexacto, y señala que *para conseguir una floculación es necesario que existan en cada ml. de la suspensión del antígeno un determinado número de partículas de éste, tanto si estas partículas son moléculas como si son células*. Este número mínimo de las partículas antigénicas es, según MERRILL, *función de la dimensión de la partícula*, ya que aumenta regularmente al disminuir la dimensión de las partículas. La dependencia funcional entre el número mínimo de partículas y el tamaño de éstas implica que para una cantidad constante de antígeno la superficie en que puede fijarse la proteína inmune (el anticuerpo) crece a medida que las partículas del antígeno se hacen más pequeñas y numerosas. Es cierto que cuanto mayor sea la partícula del antígeno más visible resulta el producto de la floculación (véase pág. 193); pero la reacción de precipitinas la concibe también MERRILL suponiendo que en ellas la partícula del antígeno actúa como "centro de cristalización", alrededor del cual se agrupan las moléculas de proteína.

Antes de MERRILL no se admitía una interpretación tan estrecha y extraviada, que rechaza, entre otros hechos, la participación predominante de las proteínas inmunes en las reacciones de precipitinas. de la que parece deducirse que lo esencial en estas reacciones es la precipitación del anticuerpo provocada por el antígeno y que, por consiguiente, no deben tenerse las "precipitinas" como la sustancia "precipitable".

Para terminar, hay que decir que MERRILL ha edificado su hipótesis basándose en la suposición de que la cantidad de proteína inmune adsorbida (ligada) sólo depende de la superficie total que integran las partículas de antígeno contenidas en cada ml. de la mezcla de reacción, lo que indudablemente no es cierto. Además de la superficie del antígeno capaz de adsorción hay que tener en cuenta otros factores: en primer lugar, la concentración del suero inmune (véase F. S. JONES y R. B. LITTLE) y la cantidad de globulina inmune que contenga el suero inmune a una concentración dada; la duración de la reacción, la temperatura a que se produce y, probablemente, otras influencias que determinan las propiedades que se designan como valencia y como "avidéz" del antisuero. Estas circunstancias actualmente pueden comprobarse también de modo óptico.

VI. Análisis cuantitativo de los productos de la floculación.

Cuando se efectúa una precipitación inmune con el propósito de sacar conclusiones afirmativas, puede procederse manteniendo constante la cantidad del suero inmune y variando la concentración del antígeno comenzando con la máxima, que se diluye sucesivamente hasta que no se formen flóculos visibles (este es el procedimiento llamado α). G. RAMÓN (1922), para precipitar la toxina diftérica por la antitoxina diftérica (de caballo), siguió el camino contrario; es decir, añadió a una cantidad constante de toxina cantidades decrecientes de antitoxina (método llamado β).

Después de formado el precipitado pueden investigarse los líquidos sobrenadantes. En principio pueden obtenerse los siguientes resultados: 1. Que el líquido sobrenadante contenga antígeno. 2. Que contenga anticuerpo; y 3. Que no contenga ni antígeno ni anticuerpo. En el primer caso puede sacarse la conclusión de que en la mezcla reaccionante el antígeno estaba en exceso, ya que parte de él no participó en la formación del precipitado; por un razonamiento semejante puede deducirse que en el segundo caso el anticuerpo estaba en exceso; el tercer caso la mezcla está en la *zona de equivalencia*, que puede ser más ancha o más estrecha, sin que, como lo indica el nombre, se reduzca nunca a un punto.

La investigación de líquido sobrenadante puede completarse y vigilarse por el *análisis del precipitado*. La participación del antígeno en el precipitado puede demostrarse fácilmente cuando se opera con antígenos "marcados", por ejemplo, con azoproteínas que contengan As, con yodoproteínas, con hemoglobina (Fe) o con hemocianina (Cu). La participación del anticuerpo en el precipitado puede determinarse por sencillos análisis de N en el caso de que el antígeno carezca de él (polisacárido de las bacterias) o mediante el empleo de anticuerpos puros (es decir, no de antisueros, sino de globulinas inmunes aisladas de los mismos) que contengan un elemento isótopo, por ejemplo, N¹⁵ (véase pág. 65). Puede también procederse a determinar el N total del precipitado y restar de este valor el N correspondiente al antígeno; si se conoce la cantidad de antígeno (expresado por su contenido en N) que se hizo reaccionar con el antisuero, y si el antígeno se ha precipitado por completo (hay que vigilar el líquido sobrenadante), puede determinarse fácilmente el N del anticuerpo.

Si se plantea un ensayo según la ordenación del procedimiento α o del β , y si además la serie de cantidades del factor variable (del

antígeno en el procedimiento α y del antisuero en el β) no se disminuyen de modo muy paulatino, se observa que la floculación aparece antes en un determinado tubo de ensayo; en el líquido sobrenadante no suele, en general, encontrarse ni antígeno ni anticuerpo, o, a lo más, mínimos indicios de uno de los dos componentes de la reacción; es decir, las proporciones de la mezcla en el primer tubo que flocule corresponden a la zona de equivalencia. H. R. DEAN y R. A. WEBB, en experimentos en que utilizaron como antígeno suero de caballo y como anticuerpo un suero inmune de conejo, y efectuaron la valoración por el procedimiento α , pudieron establecer que la proporción entre el antígeno y el anticuerpo, que da lugar a una velocidad de floculación máxima, resultaba constante en todas las series de ensayos, por lo que propusieron la designación de *optimum proportion*. Los datos de DEAN WEBB fueron corroborados por otros autores, entre ellos por J. R. MARRACK y F. C. SMITH para las azoproteínas, por G. L. TAYLOR, G. S. ADAIR y M. E. ADAIR, para la ovalbúmina, por J. T. DUNCAN (1932 b) para un polisacárido gomoso de levaduras y por W. SMITH para el polisacárido de los neumococos del tipo III.

Al multiplicarse las investigaciones orientadas en este sentido se encontraron casos en que el óptimo de floculación no correspondía exactamente con la zona de equivalencia; es decir, que en el líquido sobrenadante se observaba unas veces un ligero exceso de antígeno, como en las valoraciones de hemocianina (S. MALKIEL y W. C. BOYD), o, en otros casos, de anticuerpos, como describe F. M. BURNET (1931 a, 1941) en sus determinaciones de la toxina estafilocócica mediante el antisuero de conejo correspondiente (1).

Análogos resultados se obtuvieron valorando toxina mediante antitoxina siguiendo el método propuesto por G. RAMÓN (método β). A. M. PAPPENHEIMER y E. S. ROBINSON ordenan la valoración efectuando una serie de mezclas entre una cantidad constante de toxina diftérica y cantidades crecientes de antitoxina; observan que en el líquido sobrenadante del tubo de ensayo en que aparezca primero la floculación no se puede descubrir ni toxina ni antitoxina, aunque se compruebe el resultado negativo practicando la sensibilísima prueba de la inyección intracutánea en conejos. Por otra parte, existen ob-

(1) J. R. MARRACK (1938) pone en duda los resultados de BURNET porque los preparados que designa como toxina estafilocócica contienen varios antígenos a los que pudieran corresponder varios anticuerpos. Los anticuerpos que participaron en el óptimo de floculación pudieran ser distintos de los anticuerpos que se acusaran en el líquido sobrenadante.

servaciones aisladas según las cuales el óptimo de floculación obtenido por el procedimiento β puede experimentar un desplazamiento en el sentido del exceso de anticuerpos (J. T. DUNCAN (1932 a), G. L. TAYLOR, G. S. ADAIR y M. E. ADAIR).

VII. *Masa del precipitado y óptimo de floculación.*

Quando se emplea el procedimiento α (es decir, volumen de anti-suero constante, adición de cantidades crecientes de antígeno), la masa del precipitado, expresada en miligramos, no alcanza su valor máximo precisamente en el tubito en que aparezca antes la floculación. Hay que sobrepasar la zona de equivalencia, aunque en esta zona no se observen anticuerpos en el líquido sobrenadante. El motivo consiste, probablemente, en que el precipitado primario formado es capaz de ligar una nueva cantidad de antígeno de modo secundario. Antes de alcanzar la zona de equivalencia va aumentando la masa del precipitado al crecer la cantidad de antígeno añadida; después de pasar de la zona de equivalencia puede seguir aumentando algo la masa del precipitado, pero pronto se reducen los incrementos, que, finalmente, se anulan. Al disminuir la masa total del precipitado se modifica la proporción en que participan en él antígenos y anticuerpos, en el sentido de reducirse la proporción de anticuerpo a antígeno. Una representación gráfica de estas relaciones entre la masa de precipitado y la composición de éste en anticuerpo y antígeno se encuentra en M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 b, 1935 c, 1935 d) y J. R. MARRACK (1938, pág. 159), la ha reproducido en su conocida monografía. Diversos sistemas de antígeno y anticuerpo investigados por el método α , muestran un comportamiento, aunque análogo, no absolutamente idéntico; sobre este punto nos extenderemos más en el apartado siguiente.

VIII. *Composición de los precipitados en anticuerpo y antígeno.*

Como ya se mencionó en la página 198, la investigación en los líquidos sobrenadantes de la presencia o ausencia de antígeno y anticuerpo sólo constituye la mitad del análisis de las reacciones serológicas de floculación; esta investigación representa, en cierto sentido, el "negativo" de dicho proceso, o, dicho con más precisión, informa de las cantidades usadas o sin usar de antígeno y de anticuerpo a partir de disoluciones de estos productos de concentración conocida. En química, lo natural es no darse por satisfecho con conclusiones

obtenidas de este modo, sino tenerlas en cuenta más bien para completar o verificar los datos obtenidos por el análisis directo del producto de la reacción. El hecho de que la determinación directa del precipitado, que naturalmente debía ofrecerse al investigador en primer plano haya pasado a un segundo lugar se debe a que la determinación del antígeno o del anticuerpo en el líquido sobrenadante era mucho más sencilla que el desdoblamiento exacto del precipitado en sus componentes, para lo que se necesitaban unos conocimientos previos que sólo se adquirieron pasado algún tiempo. Por tal motivo, las investigaciones acerca de la composición de precipitados lavados sólo se emprendieron por primera vez por H. WU, L. H. CHENG y C. P. LI (1927) y por WU, P. P. T. SAH y C. P. LI (1928 b), que utilizaron como antígenos hemoglobina y yodoalbúmina y determinaron en los precipitados el contenido de N. hemoglobina y yodo.

Actualmente se han efectuado determinaciones muy exactas acerca de la composición de los precipitados de antígeno y anticuerpo por M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1929 b, 1935 a, 1935 b, 1935 d), que emplearon como antígeno un polisacárido del neumococo del tipo III, ovalbúmina pura y una azoproteína de albúmina, y por F. BREINL y F. HAUROWITZ (1930) y F. HAUROWITZ y BREINL (1933), que emplearon como antígeno en su primer trabajo hemoglobina y en el segundo, una azoproteína coloreada del ácido p-aminobenzol-arsínico, cuya participación en el precipitado pudieron determinar de modo colorimétrico y por el análisis del contenido de As.

En los últimos años han tenido lugar las investigaciones de S. MALKIEL y W. C. BOYD (hemocianina), A. M. PAPPENHEIMER y S. ROBINSON (floculación de la toxina diftérica por el procedimiento de RAMON), A. M. PAPPENHEIMER, H. P. LUNDRGREN y J. W. WILLIAMS (investigaciones sobre el peso molecular de la toxina diftérica, sobre al antitoxina diftérica y sobre el producto de reacción de ambos componentes), así como las expuestas por M. HEIDELBERGER (1939) y por W. C. BOYD (1943) en su obra *Fundamentals of Immunology*.

Los resultados pueden resumirse del modo siguiente:

I. Al examinar una serie de mezclas preparadas según el método α (cantidad constante de anticuerpo, es decir, de antisuero, y cantidades crecientes de antígeno) se observa que la zona de equivalencia posee una cierta amplitud. Esta zona limita a la izquierda con la zona del exceso de anticuerpo, y por la derecha, con la del exceso de antígeno. Dentro de la zona de equivalencia varían las proporciones en que antígeno y anticuerpo participan en la composición del preci-

pitado, como se entiende que ha de resultar en una zona, limitada por ambos lados, constituida por una serie de mezclas en que se mantiene constante uno de los factores, mientras que el otro varía con arreglo a una determinada ley. Por otra parte, si se determina la proporción en que el anticuerpo y el antígeno entran en los precipitados de la zona de equivalencia, se aprecia cierta *dependencia entre dicha proporción y el peso molecular del antígeno*; el predominio del anticuerpo sobre el antígeno disminuye al crecer el peso molecular (véase tabla 14). La influencia de este factor, es decir, del tamaño de la partícula fué establecido ya por M. H. MERRILL (véanse págs. 194 y siguientes), aunque el objeto de las investigaciones de este autor no era la composición de los precipitados inmunes, sino descubrir las propiedades del antígeno que condicionan la formación de precipitados visibles en las reacciones serológicas de floculación, sin tener en cuenta que se produzcan exteriormente en forma de precipitación inmune o de aglutinación.

TABLA 14

Proporción entre anticuerpo y antígeno en los precipitados producidos en la zona de equivalencia; los números representan la cantidad relativa de anticuerpo cuando la cantidad de antígeno añadida se conserva igual a 1. Reproducción abreviada de una tabla de J. R. MARRACK (1938, pág. 161); los pesos moleculares aceptados por MARRACK se han sustituido por datos más exactos tomados de las tablas de KAI O. PEDERSEN (THE SVERBERG, K. O. PEDERSEN, págs. 368-372).

Antígeno	Peso molecular	Proporción entre anticuerpo y antígeno (esta = 1) en los precipitados de la zona de equivalencia
Polisacárido del neumococo del tipo III	4 000	50 - 100 : 1
Ovalbúmina	44 000	8,6 - 15 : 1
Seralbúmina de caballo	70 000	6,2 - 7,5 : 1
Sendoglobulina de caballo	167 000	3,2 - 4,5 : 1
Hemocianina (<i>Limulus polyphemus</i>)	polidispersa (de 200 000-2 500 000)	
Hemocianina (<i>Bufo</i>)	6 800 000 componente principal.	0,91 - 1,4 : 1 0,59 - 0,75 : 1

Si se conoce el peso molecular del antígeno y se emplea antisuero de conejo (cuyo anticuerpo—es decir, la globulina γ del suero de conejo—posee un peso molecular, en números redondos, de 150.000) puede calcularse la composición molecular de los precipitados obte-

nidos de la zona de equivalencia. K. LANDSTEINER (1945, pág. 2) ha reunido en una tabla, que aquí se reproduce algo abreviada, resultados de las publicaciones de M. HEIDELBERGER (1938), F. PENHEIMER, LUNDGREN y WILLIAMS y W. C. BOYD (1943).

TABLA 15

Composición molecular de los precipitados específicos obtenidos con antisuero de conejo. A = anticuerpo (cuyo peso molecular se estima en 150.000).

Antígeno o hapteno.	Exceso máximo de anticuerpo.	Límite entre la zona de equivalencia y la de exceso de anticuerpo.	Límite de la zona de equivalencia con la de exceso de antígeno.	Zona de inhibición
Ovalbúmina cristalizada O _a	O _a A ₅	O _a A ₃	O _a A ₅	O _a A ₅
Seralbúmina cristalizada (S _a).....	S _a A ₆	S _a A ₄	S _a A ₃	S _a A ₂
Tireoglobulina (T _g).....	T _g A ₄₀	T _g A ₁₄	T _g A ₁₀	T _g A ₇
Polisacáridos del neumococo, tipo III (S).....	S A	S ₃ A ₂	S ₁ A	S ₄ A
Hemocianina de vivíparo (H).....		H A ₁₂₀	H A ₈₃	H A ₂
Texina diftérica (T).....	T A ₅	T A ₄ T A ₂ *	T ₂ A ₃	T A y T

Observaciones.—Los índices de las letras indican el número de moléculas de antígeno o de anticuerpo. Para el hapteno S se tiene en cuenta el peso mínimo de cadena de polisacárido capaz de reaccionar. El dato señalado con un asterisco corresponde al punto de floculación. Hay que tener en cuenta en las investigaciones de este tipo el contenido de lípido en los precipitados, que puede variar entre amplios límites, según la naturaleza del antígeno y del antisuero [F. BREINL y F. HAUROWITZ (1930), F. L. HORSFALL y K. GOODNER (1936 a, 1936 b), GOODNER y HORSFALL, J. R. MARRACK, 1938, 1942].

De la tabla parece deducirse: 1. Que la proporción entre el número de moléculas de anticuerpo y de antígeno contenidas en los precipitados producidos dentro de la zona de equivalencia es variable, pero que los valores extremos no difieren mucho entre sí; 2. Que en la zona del exceso máximo de anticuerpo, con cada molécula de antígeno se combinan más moléculas de anticuerpo que en las zonas de equivalencia (en general, aproximadamente el doble); 3. Que las moléculas que poseen un peso molecular elevado (tireoglobulina, hemocianina) pueden fijar un número de moléculas de anticuerpo considerablemente superior a las que fijan las moléculas de antígeno de peso molecular reducido (polisacárido del neumococo), tomando

posición intermedia los antígenos de peso molecular medio (ovalbúmina, seralbúmina y toxina diftérica).

Como datos complementarios se señala que la proporción existente entre el anticuerpo y el antígeno del precipitado (véase tabla 14) es menor cuando se utiliza en la reacción un antígeno heterólogo [M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1934), HEIDELBERGER, KABAT y SHRIVASTAVA, B. S. HOOKER y W. C. BOYD (1936 b)], y que en las azoproteínas artificiales el número de moléculas de anticuerpo combinadas corresponde, dentro de ciertos límites, al número de grupos determinantes existentes en la molécula del antígeno (a esta conclusión llegó F. HAUROWITZ (1936) en experimentos efectuados con antígenos obtenidos copulando seroglobulina de caballo con diversas cantidades de atoxilo diazotado) (1).

2. Si se preparan dos series de mezclas de los mismos antígeno y antisuero, la primera, preparada por el procedimiento α , es decir, manteniendo constante la cantidad de antisuero y variando la de antígeno, y la segunda por el procedimiento β , es decir, conservando fija la cantidad de antígeno y variando las de antisuero, se observa que la proporción entre antígeno y anticuerpo que poseen las mezclas en que la precipitación aparece antes ("proporción óptima"), no suele coincidir en ambas series. Habitualmente la proporción antígeno : anticuerpo resulta menor en el método β que en el método α , es decir, que el óptimo de floculación en el primero se desplaza en sentido del exceso de anticuerpo. La figura 16 ilustra el efecto de la variación de las proporciones entre antígeno y anticuerpo sobre la masa de precipitado y la velocidad de la producción de éste; las filas corresponden

(1) En sus cálculos, HAUROWITZ admite para la seroglobulina de caballo un peso molecular de 100.000, por bajo de su valor en un 34 por 100 aproximadamente (consultense las tablas de KAT O. PEDERSEN en la obra de THE SVEDBERG y K. O. PEDERSEN). Además, HAUROWITZ acepta la hipótesis de que el grupo azoico $-N=N-C_6H_4-AsO_3H_2$ sólo se combina con la histidina y tirosina, suposición que no puede admitirse con validez general. Finalmente, HAUROWITZ (véase F. HAUROWITZ y G. APPEL) pretende demostrar en yodoproteínas con distinto contenido de yodo las leyes que observó en las azoproteínas preparadas con atoxilo diazotado. Observó también en ellas que los antígenos con elevado contenido de yodo pueden fijar más anticuerpos que los que lo contienen en pequeña cantidad, pero que aproximadamente cada 20-60 grupos con yodo del antígeno sólo fijan una molécula de anticuerpo, lo que los autores interpretan por la hipótesis auxiliar de que "sólo reaccionan con el anticuerpo aquellos grupos con yodo del antígeno que están situados en la superficie". No explican el motivo de que carezca, en cambio, de influencia la posición que ocupen en las moléculas de azoproteínas los determinantes con As.

a las series del procedimiento α , y las columnas, a las series del procedimiento β ; la línea AB une los óptimos de floculación producidos en el procedimiento α , y su paralela A'B', los óptimos de floculación en el procedimiento β .

	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
1	++++	++++	+++	+++	+++	++	+	+	+				
$\frac{1}{2}$	++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	+				
$\frac{1}{4}$ C		+	+	+++	+++	++	+	+	+				
$\frac{1}{8}$				+	+++	+++	++	+	+				
$\frac{1}{16}$					+	++	+++	+	+				
$\frac{1}{32}$						+	++	+	+				
$\frac{1}{64}$							+	+	+	+			
$\frac{1}{128}$									+	+	+		
$\frac{1}{256}$											+	+	

FIG. 16 [según J. R. MARRACK (1938)]. Explicaciones, en el texto.

Numerosos autores han confirmado que, tanto en las reacciones de precipitación como en las de aglutinación, no coinciden los óptimos de floculación en los métodos α y β [H. R. DEAN y A. R. WEBB, G. L. TAYLOR (1931, 1933), G. L. TAYLOR, G. S. ADAIR y M. E. ADAIR, A. M. BROWN (1935), A. A. M. MILES (1933), J. P. DUNCAN (1932 a, 1932 b), G. RAMON (1941 a), G. RAMON y R. RICHOU, W. A. TIMMERMAN y otros]. De las causas del fenómeno se han ocupado especialmente J. R. MARRACK (1938, 1942), W. W. C. TOPLEY y G. S. WILSON, así como W. C. BOYD (1941, 1943), sin que hasta la fecha se haya encontrado una explicación convincente.

W. C. BOYD (1941), quien ha estudiado el óptimo de floculación por extenso y en experimentos efectuados con suma exactitud, llegó a la conclusión de que hay que distinguir dos tipos de antisuero, a saber: el tipo H y el tipo R. El tipo H, al que pertenecen la antitoxina diftérica de caballo y sueros antiproteína también de caballo, da dos óptimos de floculación genuinos, según se titule por el procedimiento α o por el procedimiento β , entendiéndose que en un óptimo de floculación genuino se observa una proporción constante entre el antígeno y el anticuerpo; es decir, que si se emplea el décuplo de antígeno, hay

que multiplicar por diez la cantidad anticuerpo, es decir, de antisuero para alcanzar el óptimo de floculación. Con los anticuerpos H, los óptimos de floculación conseguidos por los métodos α y β pueden estar muy próximos, pero nunca coinciden por completo. Los antisueños del tipo R, entre los que se encuentran los de conejo, aunque no todos, no presentan un óptimo de floculación propiamente dicho (es decir, una velocidad de floculación máxima, ligada a una determinada proporción entre el antígeno y el anticuerpo), sino cuando se valoran por el procedimiento α ; en cambio, si se valoran por el procedimiento β (mezclando cantidades crecientes de anticuerpo con una cantidad de antígeno constante), aunque cada serie ofrezca un óptimo de floculación, éste depende de la cantidad de antígeno elegida en el ensayo y no de la proporción determinada (constante) entre las cantidades de antígeno y de anticuerpo.

El antígeno y el anticuerpo se usan en forma de soles, es decir, de disoluciones coloidales, por lo que para comprender la esencia de la floculación inmune interesa estudiar los fenómenos que se observan en floculaciones conseguidas mediante la mezcla de soles más sencillos. Ya en 1918 v. SMOLUCHOWSKY expuso una teoría que permitía calcular la velocidad de las floculaciones coloidales, y que coincidía bien con los resultados experimentales obtenidos con soles inorgánicos. Si esta teoría fuese aplicable a los sistemas antígeno-anticuerpo, todos los anticuerpos (los antisueños) se comportarían de modo análogo y pertenecerían precisamente, según las observaciones de W. C. BOYD (1941), siempre al tipo H. Pero como la realidad no es ésta, ya que se conocen dos tipos diferentes a este respecto, BOYD deduce que diversos anticuerpos pueden señalarse por propiedades físicas y químicas especiales que condicionan la velocidad de las floculaciones producidas cuando se mezclan con el antígeno. En cuanto a la esencia de tales propiedades, BOYD no se ha pronunciado de modo definitivo, sino que se ha limitado a discutir algunas posibilidades.

En primer lugar, se observa que la procedencia de los antisueños de caballo o de conejo juegan un papel importante, aunque no absolutamente decisivo. Los anticuerpos de caballo son, en general, más hidrosolubles que los de conejo. lo que ya se refleja en que los primeros requieran una mayor concentración de sulfato amónico que los segundos al precipitarlos de los antisueños correspondientes. Con ello también puede relacionarse el hecho de que, al valorar los antisueños de caballo, siguiendo el procedimiento β , basta un exceso, relativamente pequeño, de anticuerpos por encima del óptimo de floculación para mantener disuelto todo el floculado (véase pág. 221). Parece muy probable que a medida que los anticuerpos predominan en el producto de la reacción elevan la solubilidad del mismo; según ello, la reacción entre antígeno y anticuerpo,

que se efectúa con gran velocidad (1), se produce perfectamente; pero el complejo ocasionado permanece disuelto cuando en su composición entra el anticuerpo en una medida que exceda un poco de un valor determinado. Ya antes de alcanzarse este grado pudiera intervenir la creciente solubilidad del producto de la reacción en el sentido de retrasar la aparición del precipitado, lo que explicaría el óptimo de velocidad de floculación de los sueros H en el procedimiento β . Al valorar por el método β los sueros R menos solubles (más hidrófobos), también aumenta la velocidad de floculación hasta que se alcanza determinada concentración del suero; ahora bien: al sobrepasar este valor, la adición de más anticuerpos no aumenta la solubilidad del complejo antígeno-anticuerpo (lo que es fácil de entender, teniendo en cuenta las características físicas del anticuerpo), y de este modo puede explicarse la ausencia de un óptimo β propiamente dicho en las valoraciones de los sueros del tipo R. Esta hipótesis se apoyaría, como ya señala BOYD, en la teoría de J. BORDET (véase página 234) según la cual las reacciones serológicas de floculación transcurren en dos fases de las cuales, la primera, a saber: la combinación del antígeno y el anticuerpo es específica, mientras que la segunda, la formación y sedimentación de los floculos, debe considerarse como un proceso inespecífico.

Para explicar el hecho de que al titular los sueros H por el procedimiento β baste un pequeño exceso de los anticuerpos, para dificultar la floculación. A. M. PAPPENHEIMER, H. P. LUNDGREN y J. W. WILLIAMS suponen que los grupos de la molécula de anticuerpo, capaces de combinarse (es decir, de reaccionar) con el antígeno, están situados de modo distinto en los tipos H y R. En el tipo H deben encontrarse en un polo de la molécula elipsoidal del anticuerpo, y por ello se perturban mutuamente cuando deba fijarse, en una misma molécula de antígeno, una cantidad de anticuerpo que exceda de dicho valor; en los sueros R tales grupos deben estar distribuidos de modo más homogéneo por la superficie de la molécula antigénica, de modo que no se acusa la interferencia espacial, y, por consiguiente, la floculación puede seguir progresando en la zona del exceso de anticuerpos. Contra esta teoría, BOYD opone la objeción principal de que existen anticuerpos monovalentes; es decir, anticuerpos que no poseen sino un solo grupo capaz de combinarse, para los que naturalmente tal teoría no puede aplicarse; considera, pues, más satisfactoria la explicación fundada en el carácter más o menos hidrófilo del anticuerpo. Por último, BOYD menciona brevemente la suposición de F. E. KENDALL (1941), que hace depender la floculación del grado en el que se influyen mutuamente los distintos grupos de la molécula de anticuerpo capaces de combinarse con el antígeno.

En BOYD, como ha podido observarse, todo la discusión se centra alrededor del óptimo especial que presentan los antisueros H al ser valorados por el procedimiento β . El óptimo observado al determinar por el procedimiento α el contenido en anticuerpos, tanto de los sueros

(1) H. EAGLE (1932 b), W. C. BOYD y S. B. HOOKER (1938), E. M. FOLLENSBY y S. B. HOOK, M. HEIDELBERGER, H. P. TREFFERS y M. MAYER (1940), W. C. BOYD, J. B. COHN, D. T. GREG, G. B. KISTIAKOWSKY y R. M. ROBERTS (1941).

R como de los H, no ofrece, como BOYD señala, ninguna dificultad. En el procedimiento α la cantidad de anticuerpo es la que se mantiene constante. Si se le añade antígeno en cantidad insuficiente, no se alcanza el número de centros de agregación que requiere una floculación rápida; al añadir cantidades mayores de antígeno se aumenta el número de centros, pero simultáneamente disminuye el de anticuerpos ligados a cada molécula antigénica, por lo que los agregados primarios producidos resultan menos hidrófobos (más solubles). Finalmente se alcanza un punto en el cual la tendencia de los agregados primarios a fundirse entre sí (que disminuye con la concentración) se compensa por la velocidad con que aumenta el número de los agregados (óptimo α). Si se sigue elevando la cantidad de antígenos, se reduce la tendencia de los agregados primarios a reunirse en floculos mayores, y la floculación comienza a hacerse perezosa (a inhibirse), y finalmente se impide por completo (zona del exceso de antígeno).

W. C. BOYD y M. A. PURNELL intentaron después aclarar el motivo por el que los óptimos α y β , aunque es cierto que se encuentran muy próximos, nunca coinciden por completo, y admitieron una sencilla explicación fundada en que cada uno de dichos métodos intenta responder a una pregunta distinta. En el método α se utiliza una cantidad determinada de anticuerpo y se busca la cantidad de antígeno que provoca la floculación más rápida, es decir, la cantidad de antígeno no se limita. En el procedimiento β , en cambio, se mantiene constante la cantidad de antígeno y se busca la cantidad de anticuerpo con que se consigue la floculación más rápida, para lo cual se adicionan cantidades crecientes de anticuerpo hasta alcanzarla. El método α es, por consiguiente, un método cómodo para la medida del anticuerpo, y el método β ofrece ventajas técnicas para valorar el antígeno. BOYD y PURNELL ofrecen una tercera técnica, el método ϵ , cuyos resultados se encuentran en medio de los óptimos α y β , pero que en la práctica resulta más complicado; con respecto a las particularidades al método ϵ nos remitimos al trabajo original.

3. De las tablas 14 y 15 de las páginas 202 y 203 se deduce que el antígeno puede combinarse con mucha más cantidad de anticuerpos que la necesaria para la formación del precipitado inmune. Esto puede comprobarse de modo mucho más sencillo en la aglutinación, mezclando cantidades decrecientes de un suero aglutinante con una cantidad constante de bacterias aglutinables, centrifugando las bacterias después de producida la reacción e investigando el contenido de aglutininas libres (no ligadas) en el líquido sobrenadante. La siguiente tabla da los resultados de un experimento de este tipo efectuado en

1902 por PHILIPP EISENBERG y RICHARD VOLK, en la que estos autores consideran como unidad de aglutinación (U. Ag.) la mínima cantidad de antisuero que ocasiona una aglutinación apreciable.

TABLA 16

<i>Dilución del suero.</i>	<i>U. Ag. en el volumen de la mezcla reaccionante (1 c. c.)</i>	<i>U. Ag. combinadas.</i>	<i>Coefficiente de adsorción (U. Ag. combinadas por 100.)</i>
1 : 20000	2	2	100
1 : 2000	22	22	100
1 : 1000	45	45	100
1 : 600	73	73	100
1 : 500	90	89	100 (aproximadamente)
1 : 200	225	210	95
1 : 100	450	400	90
1 : 20	2 250	1 650	73
1 : 4	11 250	6 750	60
1 : 2	22 500	12 500	55
1 : 1	45 000	22 500	50

Si se consideran por una parte la medida de la superficie de las bacterias (en la prueba citada de EISENBERG y VOLK se trataba del *Eberthella typhi*) y por otra parte la configuración y tamaño de la molécula del anticuerpo, tal como actualmente se conoce, resulta claro que la aglutinación se produce antes de que la superficie de la bacteria se cubra de moléculas de anticuerpo. Se ha corroborado esta conclusión por investigaciones ópticas y por cálculos y experimentos [J. R. MARRACK (1938, 1942), M. HEIDELBERGER (1942), PRESSMAN, CAMPBELL y PAULING, A. PIJPER, F. S. JONES y R. B. LITTLE, M. HEIDELBERGER y E. A. KABAT (1934, 1941)]. Lo anterior vale también para otros elementos de gran superficie; así, H. EAGLE (1935 a, 1935 b), en sus investigaciones sobre la floculación de las partículas de los extractos de corazón de vaca por las reagentes de los sueros sífilíticos llegó a la conclusión de que basta con que la vigésima parte de la superficie de la reagina quede recubierta para que ésta precipite, y de que la floculación de partículas de corpúsculos de la sangre de carnero o del riñón de cobayo por anticuerpos heterogénicos ya tiene lugar cuando sólo está recubierta la cientoveinteava parte de la superficie. También es interesante el tipo de experimentos efectuados por F. S. JONES (1928 b), que adsorbe en partículas de colodión sucesivamente cinco antígenos diferentes, y observa que estas partículas se aglutinan por cada una de las cinco precipitinas de dichos antígenos.

Se supone que un solo antígeno no ocupa toda la superficie de la partícula, sino que cada uno de ellos se fija en una pequeña zona; es decir, que se llega a la misma conclusión que parece bien establecida para la aglutinación de las bacterias, eritrocitos, etc.

Parece posible e incluso probable que las partículas de antígeno de dimensiones pequeñas necesiten para flocular cubrirse por completo de los anticuerpos. Pero parece que en tales casos el recubrimiento tampoco es completo, ni siquiera tratándose de antígenos de pequeño peso molecular. HEIDELBERGER (1939) observa, por ejemplo, que los precipitados obtenidos con ovalbúmina y un antisuero homólogo de conejo en la zona de equivalencia se componen de dos moléculas de anticuerpo y una de antígeno, lo que supone que deben estar recubiertos los dos tercios de la superficie de la molécula del antígeno. Además, W. C. BOYD y S. B. HOOKER (1934 b) calculan que se necesitan cuatro moléculas de antitoxina para recubrir la superficie de una molécula de toxina diftérica; por otra parte, A. M. PAPPENHEIMER, LUNGREN y WILLIAMS han determinado que en el óptimo β de floculación se combinan dos moléculas de antitoxina con una de toxina (véase la tabla 15 de la página 203, de todo lo cual resulta que en este caso no está recubierta sino la mitad de la superficie de la antitoxina. En tales cálculos no se tiene en cuenta la forma en que las moléculas alargadas (elipsoidales) de las globulinas inmunes "recubren" una molécula antigénica.

4. Se ha intentado varias veces establecer fórmulas matemáticas para las reacciones de floculación, entre otros, por M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 c, 1935 d), W. BILTZ (1910), Ph. EISENBERG y R. VOLK (1902), H. W. CROMWELL (1932), F. M. BURNET (1931 a), A. D. HERSHEY (1941, 1942, 1943), W. C. BOYD y S. B. HOOKER (1934 b, 1936, 1939), F. E. KENDALL (1942). Todas estas ecuaciones tienen en común que parten de suposiciones no demostradas; por ejemplo, que la globulina inmune (el anticuerpo) está constituido por tres esferas iguales de un peso molecular de 34.500 [W. C. BOYD y S. B. HOOKER (1934 b, 1939)], que el anticuerpo es bivalente o multivalente [M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1942)], que la combinación del antígeno y el anticuerpo se produce en forma de reacciones bimoleculares sucesivas [HEIDELBERGER y KENDALL], etcétera. A esto hay que sumar las dificultades objetivas que proceden de que la sustancia utilizada como antígeno puede no ser homogénea o que en el antisuero pueden coexistir anticuerpos con especificidad diferente o con distinta actividad de floculación ("low-grade antibodies", véase pág. 185). Por ello, si las fórmulas se han deducido de

investigaciones efectuadas en un sistema determinado de antígeno-anticuerpo, tales ecuaciones, en general, sólo pueden aplicarse a dicho sistema y en las condiciones experimentales elegidas; pero resultan inadecuadas para otros sistemas o hay que transformarlas para que se adapten aproximadamente a los resultados experimentales. Tal estado de cosas se refleja en que las fórmulas propuestas difieren entre sí de modo muy considerable, sin que ninguna de ellas haya conseguido una aceptación general por los autores que se ocupan en la investigación matemática del proceso de las reacciones serológicas. A este respecto es muy significativo que F. E. KENDALL, después de establecer, en colaboración con HEIDELBERGER, una fórmula matemática como consecuencia de investigaciones meticulosas haya vuelto a ocuparse del tema y, aunque mantenga la ecuación reaccional primitiva (1)

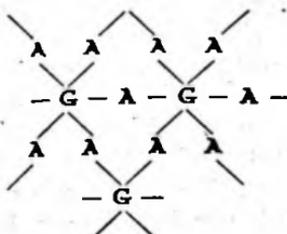
$$y = R x - \frac{R^2 x^2}{A}$$

haya prescindido de algunas premisas que simplificaban demasiado el problema y además limite la validez de la ecuación a los anticuerpos homogéneos.

Una de las fórmulas más sencillas mediante las cuales puede determinarse la proporción entre anticuerpos ligados y anticuerpos que quedan libres en el líquido sobrenadante es la conocida isoterma de FREUNDLICH:

$$\frac{x}{m} = k c^{1/n}$$

(1) y = contenido de anticuerpos en el precipitado en mg; x = contenido de antígeno en el precipitado en mg; A = anticuerpos totales; R = proporción entre antígeno y anticuerpos en la zona de equivalencia. La fórmula resulta válida en el campo del exceso de anticuerpos y se apoya en la suposición de la realidad de la teoría reticular, es decir, de que el precipitado consta de moléculas de anticuerpo ligadas entre sí por moléculas de antígeno, según el siguiente esquema (en el que las A representan anticuerpos, y las G , antígenos).



cuando esta fórmula deba aplicarse a una reacción serológica x , representa la cantidad de anticuerpo fijado (adsorbido); c , la cantidad de anticuerpo libre; m , la cantidad de antígeno, y k y n , constantes. Las investigaciones anteriormente mencionadas de EISENBERG y VOLK acerca de la aglutinación bacteriana (véase tabla de la pág. 209) condujeron a resultados que coinciden bastante bien con la ecuación de FREUNDLICH; lo mismo puede decirse de las determinaciones, efectuadas por H. W. CROMWELL, de la proporción entre la hemolisina combinada y la libre. En otros casos (neutralización de toxina por antitoxina), la fórmula no se ha corroborado experimentalmente, o sólo resulta satisfactoria después de introducir nuevas hipótesis auxiliares (F. M. BURNET). Pero, ante todo, J. R. MARRACK (1938) hace constar, con razón, que la concordancia o la no concordancia de los resultados experimentales obtenidos en las reacciones serológicas con la isoterma de FREUNDLICH no aporta ninguna luz al problema de si la unión del antígeno al anticuerpo debe considerarse como una reacción química o como una adsorción.

IX. *La combinación del antígeno y de la proteína inmune examinada mediante el microscopio electrónico.*

Mediante el microscopio electrónico puede observarse directamente el modo de fijarse las proteínas inmunes a superficies o partículas de antígeno.

St. MUDD y T. F. ANDERSON determinaron, mediante cientos de medidas efectuadas en el campo del microscopio electrónico, el diámetro de los flagelos del *Bacillus subtilis*; encontraron un promedio de 186 ± 4 Agm. Añadieron a emulsiones de esta bacteria antisuero de conejo diluido diez veces, y al cabo de media hora de reposo diluyeron la mezcla con cien veces su volumen de agua destilada y examinaron con el microscopio electrónico algunas preparaciones de esta suspensión. Después de su tratamiento con el antisuero, los flagelos aparecían engrosados de modo irregular, por lo que los autores dedujeron que los anticuerpos depositados en los flagelos no constituían una película continua, sino que los lugares sin recubrir alternaban con depósitos más o menos espesos. Según las medidas efectuadas en los lugares más gruesos resultó que en ellos el promedio del diámetro de los flagelos había aumentado tanto que el espesor del depósito del anticuerpo correspondiente podía tasarse en 167 Agm. El anticuerpo, en este caso y en pruebas análogas efectuadas con bacilos tífico y paratífico, era una globulina de conejo; es decir, la globulina inmune de un

antisuero de conejo, cuya molécula, según las investigaciones de NEURATH, tiene una configuración alargada; el eje transversal, según cálculos de este autor, mide 37 Åm., y el longitudinal, 274 Åm., aproximadamente (1). Esta circunstancia dificulta, naturalmente, decidir si el espesor de los depósitos en los flagelos de las bacterias corresponde a la dimensión de la molécula de la globulina inmune. Se concibe que el espesor del depósito puede variar entre los límites que marcan ambos diámetros de la molécula de anticuerpo, según que ésta se deposite en los flagelos horizontalmente, formando un ángulo agudo con el eje longitudinal de flagelo o de modo perpendicular; siempre suponiendo el caso más sencillo, y por lo demás no improbable, de que se trate de una película monomolecular de anticuerpo.

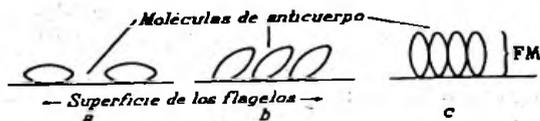


FIG. 17. Esquema de los diferentes modos de colocarse las moléculas elipsoidales de un anticuerpo (longitud a anchura como 13 : 4) sobre la superficie de un flagelo con antígeno. FM (espesor de la película) posee en a, b, c valores proporcionales a 4, 9 y 13, respectivamente.

De una comunicación de T. F. ANDERSON y W. M. STANLEY parece deducirse que la forma de disponerse los anticuerpos, tal como nos la descubre el microscopio electrónico, puede resultar decisiva para explicar el modo de actuar de los antisueros floculantes de conejo. Los elementos del virus del mosaico del tabaco son bacilares y poseen, según determinaciones efectuadas en el microscopio electrónico, una anchura de 15 m μ . Los autores citados prepararon mezclas de virus

(1) Los datos de NEURATH con respecto a la proporción de los diámetros longitudinal y transversal de las moléculas proteicas se calcularon apoyándose en las constantes de disimetría de SVEDBERG. No es seguro que tales datos sean exactos, porque se obtuvieron por un solo método. NEURATH también ha publicado datos acerca de las medidas de las moléculas de insulina, lactoglobulina y hemoglobina de caballo, y como estas proteínas pueden cristalizarse, fué posible comprobar los resultados analizando los cristales por rayos X. Las investigaciones efectuadas en este sentido por D. TROWFOOT coinciden con las de NEURATH en apreciar desviaciones de la forma esférica; pero, según ellas, la diferencia entre ambos diámetros, en las tres proteínas investigadas, no es tan grande como la que resulta de las medidas de NEURATH; y según TROWFOOT, la proporción entre los ejes no excede de 1 : 2. Sin embargo, según nuevas determinaciones de la configuración de las moléculas de las seroproteínas, efec-

purificado con un antisuero específico de conejo, y después de una hora de reposo el espesor de los bacilos de virus había aumentado hasta 70 μ , es decir, su espesor aumentó en 55 μ , lo que supone que en cada uno de los lados del bacilo se ha formado un depósito de 27,5 μ = 275 Agm. (véanse los valores que se aceptan para el eje longitudinal de la molécula de globulina inmune de conejo). Los resultados se interpretaron en el sentido de que la molécula de anticuerpo se dispone de modo que su eje mayor queda perpendicular a la superficie del bacilo cilíndrico del virus, es decir, que se ordenan, observados en un corte, del modo radial que representa la figura 18. Pero al repetir estos experimentos ANDERSON y STANLEY (según citan MUDD y ANDERSON) no consiguieron sino aumentar en un grado insignificante el espesor del bacilo del mosaico del tabaco; como carecemos de datos más exactos no podemos admitir, desgraciadamente, como definitivas las conclusiones de la primera serie de experimentos relativa a este problema, a saber: que la reacción entre el virus del mosaico del tabaco y su antisuero específico transcurre no como una aglutinación, sino como una precipitación típica.

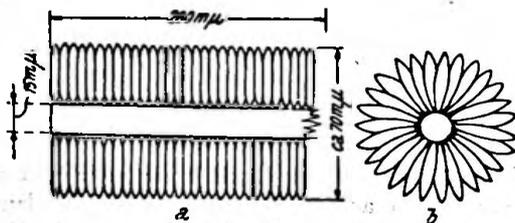


FIG. 18 (según T. F. ANDERSON y W. M. STANLEY). Posible modo de disponerse las moléculas del anticuerpo, estrechas y de forma elipsoidal, en los costados de un elemento (molécula) de forma bacilar del virus del mosaico del tabaco, a) Corte longitudinal; b) corte transversal.

tuadas por otros métodos (doble refracción en líquido circulante, medidas dieléctricas), todas ellas poseen una disimetría muy pronunciada. J. T. EDSALL encuentra para la molécula de seroalbúmina humana unas dimensiones de 150 : 38 Agm., y J. L. ONCLEY para la globulina y de la misma procedencia, 320 : 36 Agm.; para el fibrinógeno del plasma sanguíneo humano, otros autores admiten 900 : 30 Agm. Se cree que el diámetro ecuatorial de las distintas seroproteínas se aproxima a 36 Agm. (véase el dato citado de NEURATH); esta coincidencia entre el espesor de las distintas proteínas del suero la explican E. J. COHN, ONCLEY, STRONG y otros autores, por la necesidad de impedir que en los capilares se salgan de la sangre. Lo único variable es, pues, el diámetro longitudinal. En definitiva, puede admitirse que las moléculas de globulina inmune poseen forma elipsoidal y que su diámetro longitudinal excede con mucho al transversal impuesto por exigencias fisiológicas.

Es posible que con el nuevo procedimiento de la microfotografía de las sombras electrónicas [R. C. WILLIAMS y R. W. G. WYCKOFF (1945)], se consigan resultados reproducibles, ya que el nuevo método permite examinar el espesor y la configuración de los objetos de un modo inasequible hasta la fecha en los trabajos con el microscopio electrónico.

X. Determinación del espesor de las películas de anticuerpo fijadas de modo específico a capas monocelulares de antígeno.

Este método fué utilizado por M. F. SHAFFER y J. H. DINGLE, y a continuación por J. B. BATEMAN, H. E. CALKINS y L. A. CHAMBERS. Como los datos de los autores citados en primer lugar se han mencionado ya en otro capítulo (véase pág. 86), expondremos aquí por extenso principalmente la obra de BATEMAN, CALKINS y CHAMBERS.

Como antígenos utilizaron el producto del estreptococo hemolítico denominado sustancia M, cuyo peso molecular se calcula en 40.000, de modo que es entre 500 y 1.000 veces menor que el peso molecular del virus del mosaico del tabaco (23.000.000, según G. SCHRAMM y H. MÜLLER, ó 42.500.000, según M. A. LAUFFER). Este antígeno se extendió en capa monomolecular sobre una superficie de estearato bórico, y sobre esta capa se depositó una gota de antisuero de conejo que se extendió haciendo girar la lámina lentamente. Después de transcurrido el tiempo de la reacción el antisuero se enjuagó con gran cantidad de disolución de cloruro sódico al 0,8 por 100 y de agua destilada, con el fin de que no permaneciera más que la porción fijada por la película de antígeno. Examinando el comportamiento de ambas capas frente a la luz polarizada que las atraviesa, puede calcularse el espesor de la película de anticuerpo. Los valores encontrados oscilan entre 55 y 200 Åm.; son, por consiguiente, bastante variables. Las capas de espesor mínimo se obtuvieron con antisuero diluido 300 veces, y las de espesor máximo con antisueros concentrados; en el primer caso se admite que la molécula de anticuerpo se deposita horizontalmente o formando un ángulo pequeño con la capa del antígeno, y en el segundo, que, por el mayor número de moléculas de anticuerpo, éstas han de disponerse verticalmente sobre la película antigénica. St. MUDD y T. F. ANDERSON corroboran esta interpretación hipotética por los resultados de sus observaciones mediante el microscopio electrónico. Cuando se opera con productos que pueden examinarse visualmente, con bacterias y con sus flagelos, parece observarse que cuando hay una débil "sensibilización del antígeno" los anticuerpos se depositan sobre la superficie del antígeno, constituyendo una película incompleta; es decir, formando manchas, y que la película posee un espesor que corresponde, aproximadamente, al eje transversal de la molécula de la globulina inmune; al aumentar la "sensibilización", los ejes longitudinales de las moléculas de dichas globulinas se disponen radialmente, tal como se representa en la figura 18 (consúltese también *Direct photography of antigens and antibodies*).

El espesor mínimo de las películas de anticuerpo obtenidos con antisueros de conejo resulta en ocasiones menor que el valor calculado, suponiendo que las moléculas de la globulina inmune se depositan de modo plano sobre la superficie del antígeno. Las películas de anticuerpos obtenidas por el antisuero específico sobre los flagelos del bacilo tífico no poseen, por ejemplo, según observaciones en el microscopio electrónico, sino un espesor de 21 Agm. (MUDD y ANDERSON), mientras que, según las medidas de H. NEURATH, deberían presentar un espesor mínimo de 37 Agm. Sin embargo, resulta cuestionable, por una parte, la exactitud de las dimensiones admitidas para las moléculas de las globulinas inmunes, y, por otra parte, la precisión con que se ha medido el espesor de la capa de anticuerpos depositada sobre los flagelos. MUDD y ANDERSON incluso hacen observar que las bacterias presentan un doble contorno: uno, interior, más acusado, y otro, que rodea al anterior, de contornos menos nítidos y más irregular; en las determinaciones sólo se tiene en cuenta la línea interior más clara, lo que no tiene otra justificación que las dificultades técnicas de la medida y puede conducir a resultados erróneos. Más importante parece el hecho observado por SHAFFER y DINGLE, quienes obtuvieron con antisueros de conejo capas de anticuerpo de un espesor de 100 Agm., incluso utilizando distintos antígenos (ovalbúmina, polisacárido del neumococo), y que, por el contrario, las capas de anticuerpo obtenidas con antisuero de caballo poseen un espesor de 240 Agm., lo que concuerda con la diferencia de dimensiones moleculares entre las globulinas inmunes de conejo y de caballo.

En las pruebas de A. ROTHEN (1045), citadas en la página 87, los espesores de los depósitos obtenidos por la fijación específica de globulinas inmunes sobre películas de antígeno variaron, para un antisuero contra la seroalbumina de vaca, entre 30 y 140 Agm.; es decir, aproximadamente entre los límites que BATEMAN, CALKINS y CHAMBERS establecieron para los sueros inmunes de conejo. Pero ROTHEN comprobó que el espesor de la capa de anticuerpos dependía del número de las capas de antígeno estratificadas debajo de él; en cambio, no sacó la impresión de que jugara ningún papel la colocación de las moléculas de anticuerpo sobre la superficie del antígeno. No obstante, antes hay que poner en claro por qué motivo el antisuero para la ovalbúmina se fija sobre el antígeno, constituyendo siempre una capa de 20 Agm. de espesor.

XI. *Proporción entre los elementos antigénicos y las moléculas de las globulinas inmunes.*

Los hematíes, las bacterias y los flagelos de las bacterias son superficies antigénicas sobre las que pueden fijarse numerosas moléculas de globulina inmune, formando unas veces una película coherente

y otras amontonamientos locales a modo de manchas; según se observa en el microscopio electrónico, en esta adsorción parecen jugar un papel decisivo la concentración del antisuero, o, como parece más probable, la concentración de la globulina inmune que contiene, y posiblemente también la afinidad de la globulina inmune para el antígeno [para los extremos y los estadios intermedios] (véase pág. 86).

Cuando el antígeno está dispersado formando una disolución *molecular* o *micelar* pueden también fijarse a cada partícula de antígeno varias, en ocasiones muchas, moléculas de anticuerpo. Este fenómeno se concibe sin dificultad en los casos en que la molécula antigénica es mucho mayor que la del anticuerpo (recuérdese la proporción, por ejemplo, entre los elementos del virus del mosaico del tabaco y las moléculas de globulina inmune de un antisuero de conejo—consúltese la figura 18—) o cuando la molécula antigénica tiene forma de hebra alargada (virus de la poliomielititis humana o del ratón, según A. TISELIUS y SVEN GARD), y sus determinantes se repiten periódicamente a lo largo del eje longitudinal de la hebra. La forma de la molécula del anticuerpo puede considerarse como constante, ya que los antisueros utilizados en la mayor parte de las investigaciones son de conejo; según H. NEURATH, son elipsoides alargados cuyo ancho y largo guardan la proporción de $37 : 274 = 1 : 7,4$ (véase pág. 212). Se desconoce la forma de disponerse en estas moléculas de anticuerpo los grupos polares capaces de fijarse a los determinantes del antígeno; deben considerarse meras especulaciones, al menos juzgadas desde este punto de vista, las suposiciones acerca de si la molécula del anticuerpo se dispone tumbada o perpendicular, sobre una superficie antigénica o sobre una molécula grande de antígeno (véase pág. 213).

Cuando la molécula antigénica sea *esférica* y sus dimensiones sean análogas a las de la molécula del anticuerpo también es posible, desde el punto de vista geométrico, enlazar tal molécula de antígeno con varias de anticuerpo.

Nunca se ha dudado seriamente de que las partículas antigénicas, aun tratándose de moléculas esféricas, pudieran recubrirse de modo regular de moléculas de anticuerpo. Esto implica, naturalmente, la suposición de que cada partícula de antígeno posee un número plural de cada uno de sus determinantes, determinantes cuya pareja reaccional se encuentra en el grupo polar, o grupos polares (véase luego), del anticuerpo. Según experiencias efectuadas por F. HAUROWITZ (1936), en las que utilizó una serie de antígenos que poseían un número gradualmente decreciente de determinantes con arsénico, sólo se consigue una precipitación visible cuando cada molécula de anti-

geno puede fijar al menos diez moléculas de globulina inmune; en opinión de HAUROWITZ, esto se debe a que sólo en tales condiciones se produce un complejo antígeno-anticuerpo de un tamaño suficiente para que no pueda mantenerse disuelto. Por consiguiente, hay que prever dos casos en que no puede formarse el precipitado específico por no estar en la proporción debida los números de partículas de antígeno y anticuerpo; el primero, cuando las moléculas de anticuerpo se encuentran en corto número y por ello cada molécula de antígeno no llega a adquirir el peso suficiente para flocular porque no puede recubrirse con las suficientes globulinas inmunes; y en segundo lugar, cuando existe un exceso de antígeno y por ello las moléculas de anticuerpo deben compartirse entre un número tan grande de moléculas de antígeno que el efecto equivale al primer caso. Las condiciones cuantitativas que se requieren para las reacciones de precipitinas corroboran manifiestamente esta suposición, ya que se sabe que, tanto una dilución fuerte del antisuero como un exceso de antígeno, retrasa la precipitación.

Las consideraciones anteriores se basan en la suposición de que las moléculas de anticuerpo se fijan a las partículas de antígeno y que éstos, de acuerdo con la concepción de MERRILL (véase pág. 197), constituyen los centros para la producción de los complejos mayores que precipitan; no se tiene en cuenta el proceso opuesto, a saber: la fijación de numerosas partículas de antígeno en una molécula de anticuerpo. Para separarse de la hipótesis de MERRILL hay que admitir una mayor participación de los anticuerpos (globulinas inmunes) en la masa del precipitado, ya que este autor considera el aumento de la partícula de antígeno debido a los anticuerpos como una simple función de la superficie total antigénica (por centímetro cúbico del volumen de la mezcla reaccionante).

Se ha señalado que cuando el antígeno está dispersado en sus disoluciones de modo molecular o micelar, es decir, en el campo de las reacciones de precipitinas, también pueden influir la forma de la molécula antigénica y la proporción entre su tamaño y las dimensiones de la molécula de la globulina inmune (véase pág. 217). Además, la molécula antigénica puede poseer un tamaño menor que las moléculas inmunes (como sucede con muchos antígenos proteicos, según medidas bastantes exactas) e incluso mucho menor; así, por ejemplo, el peso molecular de la toxina diftérica no es sino de 72.000 (LUNDGREN, PAPPENHEIMER y WILLIAMS), y el de la sustancia M de los estreptococos hemolíticos, 40.000 (BATEMAN, CALKINS y CHAMBERS), y en los haptenos que precipitan *in vitro* con los sueros inmunes es-

pecíficos pueden darse números considerablemente más bajos; por ejemplo, un colorante diazoico que funciona *in vitro* como un hapteno precipitable de modo específico no posee sino un peso molecular de 660 [K. LANDSTEINER y J. VAN DER SHEER (1932 b, 1933)]. En tales circunstancias, ¿no se combinará también una molécula de anticuerpo con varias moléculas de antígeno? ¿No llegará a

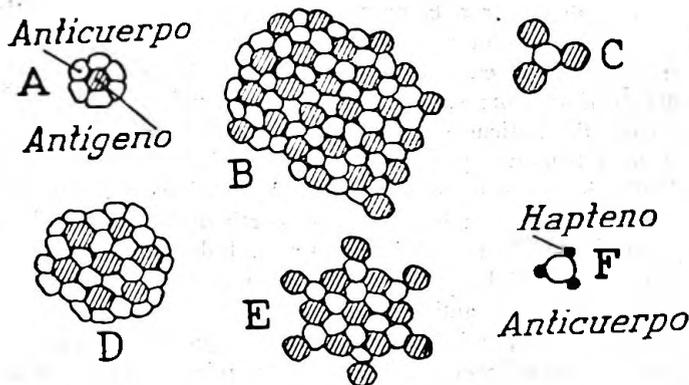


FIG. 19 (según J. MARRACK, "The chemistry of antigens and antibodies", pág. 151. Representación esquemática de las disposiciones posibles que toman las moléculas de antígeno y anticuerpo al combinarse. A representa una unidad sencilla; B, una estructura de tipo reticular en las proporciones óptimas; C y E, el exceso de antígeno; D, el exceso de anticuerpo, y F, la manera de disponerse las moléculas de anticuerpo y hapteno.

recubrirse de antígeno? Si se piensa que a los grupos determinantes del antígeno corresponden los grupos polares del anticuerpo, y que ambos *mutuamente* se atraen y reaccionan, no se encuentra motivo para excluir *a priori* esta posibilidad; G. R. MARRACK presenta, en su conocida monografía, esquemas que expresan la inversión de las posiciones relativas entre las moléculas de antígeno y anticuerpo. En la figura 19 se representa en A una molécula antigénica esférica rodeada por todas partes de moléculas de anticuerpo, mientras que en F se representan tres pequeñas moléculas de hapteno ancladas en la periferia de una molécula de anticuerpo. Desde A hasta E, los antígenos y los anticuerpos se representan de igual tamaño y, aproximadamente, de la misma forma; en estas condiciones MARRACK también considera posible la ordenación representada en F cuando el antígeno esté en exceso con relación al anticuerpo. Esta

cuestión, así como de los casos representados en D y E, y las condiciones hipotéticas para que se produzcan, son objeto del apartado siguiente.

B. MONOVALENCIA O POLIVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS

Si se pretende llevar a la práctica los esquemas representados en la figura 19, se tropieza inmediatamente con otro factor que hasta ahora no se ha tenido en cuenta, a saber: si a los distintos determinantes del antígeno corresponde un número igual de grupos polares independientes del anticuerpo. Mediante experimentos efectuados con antígenos de estructura química conocida se ha demostrado que en una molécula de antígeno químicamente homogénea pueden coexistir dos o más determinantes; los ejemplos pertinentes se expusieron en lugar oportuno y no es necesario repetirlos. Falta por considerar si a la existencia de múltiples determinantes en el antígeno corresponde una "multivalencia" del anticuerpo.

F. HAUROWITZ defiende la concepción de que los anticuerpos son *monovalentes* o *monoespecíficos*. Si se inmunizan conejos con antígenos complejos que posean, por ejemplo, un grupo azoarsanílico y un grupo de diyorotirosina, es decir, que posean la forma AB, se obtienen sueros inmunes que contienen dos anticuerpos, a saber: un anticuerpo anti-A y un anticuerpo anti-B, pero ningún hecho experimental revela la existencia de anticuerpos anti-AB; si tales antisueros se agotan por adición sucesiva de A y B, no se consigue una ulterior precipitación por el antígeno complejo AB [F. HAUROWITZ (1942, 1943), F. HAUROWITZ y P. SCHWERIN (1942)]. Sin embargo, no puede considerarse esta regla como general, porque F. HAUROWITZ y P. SCHWERIN (1942) [véase también F. HAUROWITZ (1943)] han encontrado en muchos antisueros anticuerpos bivalentes pertenecientes al tipo anti-AB, esto es, que no precipitan por A ni por B, sino sólo por el antígeno complejo bivalente AB (véase pág. 184).

HAUROWITZ ha intentado también defender su concepción de la monovalencia de los anticuerpos por un argumento negativo que utiliza en algunas de sus últimas publicaciones. Opina que si los anticuerpos fueran en general bivalentes o polivalentes, el exceso relativo de anticuerpos actuaría del mismo modo que el exceso fuerte del antígeno, a saber: impediría la formación de un precipitado. Como esta inhibición no se produce, HAUROWITZ llega a la conclusión de que únicamente los antígenos pueden ser multivalentes con respecto a sus

determinantes; pero que los anticuerpos, con pocas excepciones, deben ser monovalentes.

Frente a las pruebas aducidas pueden hacerse muchas objeciones experimentales. Por ejemplo: la floculación de la toxina diftérica por un antisuero no se produce si se emplea exceso de anticuerpo, para lo que basta que la proporción entre anticuerpo y antígeno sea el doble de la que corresponde al punto de neutralización [H. HEALEY y S. PINFIELD, A. M. PAPPENHEIMER y E. S. ROBINSON]; incluso el precipitado formado puede redisolverse por la adición ulterior de una cantidad suficiente de anticuerpos (HEALEY y PINFIELD). Al principio, por este comportamiento, la reacción de floculación entre la toxina y la antitoxina diftéricas se consideraba como una forma atípica de las reacciones de precipitinas [consúltase, entre otros autores, a J. R. MARRACK (1938, pág. 160)], en cierto sentido como una anomalía, sin paralelo en las reacciones de precipitinas entre otros antígenos y anticuerpos. Tal juicio no corresponde a la realidad. La ovalbúmina pura flocula con un antisuero equino según las mismas condiciones cuantitativas [A. M. PAPPENHEIMER (1940)], y la precipitación de la hemocianina por la antihemocianina de caballo también se impide si se añade un pequeño exceso de los anticuerpos [S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1941 b)]. Por otra parte, el suero antitóxico de conejo preparado por la inmunización de estos animales con formoltóxido diftérico reacciona con la toxina diftérica siguiendo el comportamiento normal entre proteínas y antiproteínas; es decir, que el exceso de anticuerpos no inhibe la precipitación (A. M. PAPPENHEIMER). Por consiguiente, el tipo de la floculación descubierta por RAMÓN entre toxina y antitoxina depende, en primer lugar, de la procedencia, equina o de conejo, del antisuero, y, en segundo lugar, del elevado peso molecular del antígeno (toxina diftérica, ovalbúmina, hemocianina); pues los antisueros contra antígenos bacterianos, por ejemplo contra los polisacáridos del neumococo, se comportan del mismo modo, cualquiera que sea su procedencia (de caballo o de conejo): precipitan al mezclarse en cualquier proporción, excepto cuando el antígeno se encuentra en considerable exceso. La diferencia indicada entre los sueros antiproteínas de caballo y de conejo se atribuye a que en el primer caso los anticuerpos están localizados en una pseudoglobulina hidrosoluble, y en el segundo en una euglobulina insoluble [A. M. PAPPENHEIMER, H. P. LUNDGREN y J. W. WILLIAMS, A. M. PAPPENHEIMER].

Por lo demás, en las discusiones respecto al significado de la *zona de inhibición inferior* hay que tener en cuenta que la falta de una

floculación visible en la zona del exceso relativo de antígeno no autoriza a afirmar que no se produce ninguna reacción entre el antígeno y el anticuerpo. Pueden reaccionar dando lugar a un producto que no se aprecie a simple vista por ser insoluble. P. GRABAR y J. OUDIN obtienen por repetida recristalización, siguiendo el método de SÜRENSEN, ovalbúmina pura, con la que inmunizan conejos. Añaden una cantidad constante del antisuero así obtenido a cantidades crecientes de la disolución de ovalbúmina y observan los precipitados que se forman, cuya cantidad evalúan. Hasta una concentración determinada del antígeno aumenta la cantidad de precipitado, que después se reduce bastante rápidamente; a partir del punto de inflexión, los líquidos sobrenadantes dan cantidades crecientes de precipitado cuando se mezclan con la mitad de su volumen de una disolución de NaCl al 0,85 por 100 en alcohol al 20 por 100; en opinión de estos autores, se trata de precipitados de combinaciones hidrosolubles entre el antígeno y el anticuerpo, puesto que ni la disolución de antisuero ni la de antígeno precipitan por el alcohol en idénticas condiciones, ni el líquido sobrenadante reacciona con el alcohol más que en la zona del exceso de antígeno. Si esta concepción fuera cierta, las conclusiones con respecto a la monovalencia de anticuerpos que HAUROWITZ deduce de la zona de inhibición, podrían objetarse también desde este punto de vista.

La precipitación de la hemoglobina por un antisuero específico ofrece una excepción de otro tipo. Aunque la hemoglobina es una sustancia químicamente unitaria, al efectuar la reacción *in vitro* en la formación del precipitado no interviene sino una parte de ella, permaneciendo el resto en disolución [H. WU, L. H. CHENG y C. P. LI, F. BREINL y F. HAUROWITZ]. De ser justa la observación, pudiera decirse que siempre se opera con un exceso de antígeno que, en contra de la regla general, no actúa inhibiendo.

No hay que olvidar, por último, que en otras reacciones de precipitación, a saber, en la aglutinación de las bacterias, no es raro observar una *zona de inhibición inferior*, es decir, una zona de concentración elevada del suero aglutinante, en la que no se aglutinan las bacterias. El hecho de que esta zona no se observe con más frecuencia se debe a que la aglutinación se efectúa utilizando una cantidad constante de antígeno, al que se añaden cantidades decrecientes de antisuero, sin investigar las concentraciones muy altas de éste (aproximadamente entre 1 : 2 hasta 1 : 50) porque para fines de diagnóstico sólo se aplican las diluciones muy fuertes. No es cierto que no manifiesten zona de inhibición inferior más que los sueros conser-

vados largo tiempo o calentados (G. S. SHIBLEY); cuando se quiere diagnosticar una enfermedad infecciosa por el efecto aglutinante del suero del paciente sobre el germen productor de la enfermedad, dicho suero no se utiliza después de guardado largo tiempo o de calentarlo, sino que se aplica en estado fresco y así empleado se observan zonas de inhibición inferior, aunque no con la misma frecuencia en todas las bacterias [J. T. DUNCAN (1934) y otros]. Esta dependencia de la especie bacteriana, es decir, de la configuración especial del antígeno, no habla en favor de que la existencia de una zona de inhibición inferior, al menos en lo que concierne a la aglutinación, se deba únicamente al exceso de anticuerpo. También en contra de que ésta sea la única causa habla el hecho de que aparezca sin más que efectuar la reacción en una disolución de cloruro sódico más concentrada de lo habitual [J. T. DUNCAN (1934, 1937)]; en el mismo sentido habla el hecho de que la zona de inhibición inferior conseguida por la calefacción del suero aglutinante se hace desaparecer cuando el mismo suero se calienta pocos grados Celsius más [G. S. SHIBLEY].

En oposición a HAUROWITZ, numerosos autores [M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 b), HEIDELBERGER y E. A. KABAT (1937), J. MARRACK (1938), L. PAULING (1940), A. TYLER (1945 a, b)] sostienen el punto de vista de que los anticuerpos son plurivalentes aunque no en el mismo grado que los antígenos correspondientes. Esta divergencia de los puntos de vista aparece por segunda vez en el modo de concebir la estructura de los agregados producidos en las reacciones serológicas de precipitación.

La teoría del retículo.

Esta teoría sostiene que en el producto de la floculación las moléculas de los antígenos y de los anticuerpos forman una red constituida por el enlace mutuo entre los determinantes del antígeno y los grupos polares del anticuerpo. Una ordenación de este tipo requiere que sean plurivalentes no sólo la molécula antigénica, sino también la de anticuerpo, o, expresado de modo más exacto, que entre ellas puedan trabarse al menos dos enlaces (*teoría de la plurivalencia mutua*).

No es necesario, como puede comprenderse fácilmente, que los enlaces posean especificidad diferente; se concibe fácilmente que enlaces de la misma especificidad pueden también dar lugar a la formación de redes, ya que la única condición necesaria es que una molécula de anticuerpo pueda enlazarse simultáneamente con dos o más moléculas de antígeno. La expresión "monovalente" tiene, por consi-

guiente, un doble sentido: puede entenderse por ella que la molécula de anticuerpo posee dos o más grupos de igual especificidad, o que posee un único grupo polar capaz de reaccionar con el antígeno. HAUROWITZ, al impugnar la teoría reticular, considera esta posibilidad, por lo que en el texto alemán de una publicación aparecida en 1943 emplea para calificar los anticuerpos, además de la designación de monovalentes, la de *einbindig* (capaces de un solo enlace). Los argumentos fundamentales en que se apoya HAUROWITZ se han expuesto anteriormente. En primer lugar, señala que los antígenos con varios grupos determinantes originan antisueros que se comportan como una mezcla de anticuerpos monovalentes, y la afirmación de que en la reacción de precipitinas el exceso de anticuerpos no puede impedir la precipitación.

En defensa de la opinión de que los anticuerpos no pueden poseer más que un solo enlace, sólo puede aducirse la segunda observación, ya que la primera sólo abona su monovalencia.

La teoría reticular vale, en opinión de sus autores, para explicar no sólo la precipitación, sino la aglutinación de células (bacterias, eritrocitos). W. C. BOYD y S. B. HOOKER (1936), en primer lugar, negaron que la teoría pudiera aplicarse para explicar la aglutinación. Esta repulsa radical fué debida a una serie de experimentos sencillos, de la que sólo citaremos uno, como introducción a la exposición que seguirá. Al tratar eritrocitos con un exceso enorme de suero aglutinante se forman flóculos cuyo tamaño no disminuye aunque se sometan a una fuerte agitación; si algunos de estos flóculos se llevan a un tubo de ensayo y se centrifugan, se consigue reunirlos en agregados mayores que poseen la misma firmeza (coherencia) que los flóculos de que proceden. Según la teoría reticular, arguyen BOYD y HOOKER, esto no sería posible porque los eritrocitos cubiertos de anticuerpos podrían cubrirse con eritrocitos normales, pero no con eritrocitos que a su vez están recubiertos de anticuerpo. Años más tarde, W. C. BOYD (1942) intentó demostrar que la teoría reticular tampoco es necesaria ni suficiente para explicar el mecanismo de la precipitación específica.

En su obra *Fundamentals of Immunology*, W. C. BOYD (1943) dedica un capítulo especial a las hipótesis concernientes al mecanismo de las reacciones antígeno-anticuerpo (véase obra citada, págs. 232-245). Llega a la conclusión de que no existe ningún experimento decisivo que permita preferir ninguna hipótesis a las demás sin exceptuar las expuestas por él mismo (véanse páginas 206 y 225). No han modificado este estado del problema los trabajos de A. TYLER (1945 a. 1945 b), y de A. TYLER y St. M. SWINGLE (1945), que

BOYD no alcanza a considerar en la segunda edición de sus *Fundamentals* (1945), y contra los que, por otra parte, elevan objeciones W. C. BOYD y E. R. WARSHAWER. BOYD se disculpa por exponer este tema muy por extenso, con la esperanza de que sus indicaciones puedan conducir a autores que aborden el problema sin prejuicios a la verdadera solución o a experimentos fundamentales que hasta ahora buscan en vano los investigadores que trabajan en este sentido. BOYD manifiesta que con ello se daría por contento aunque se demostrara finalmente que carecía de razón; punto de vista, en todo caso, más provechoso que la actitud dogmática que toman algunos defensores de la teoría reticular.

El crecimiento del complejo antígeno-anticuerpo.

En caso de ser cierta, la teoría reticular ofrecería la ventaja de hacer comprensible el crecimiento de los complejos antígeno-anticuerpo, invisibles en estado naciente, hasta constituir agregados cada vez mayores. Por ejemplo: si en una reacción de precipitinas los dos componentes de la reacción poseyeran dos o más "valencias", en los complejos primarios podrían anclarse nuevas partículas de antígeno y nuevas moléculas de anticuerpo, y este proceso, que naturalmente implica un crecimiento rápido de los agregados, sólo encontraría, teóricamente, su fin cuando se agotara la provisión de uno u otro de los participantes en la mezcla de la reacción. Por el contrario, si se supone que la partícula antigénica se recubre de anticuerpos (véase figura (19, F) y que los anticuerpos ligados de este modo son monovalentes en sentido estricto, es decir, incapaces de reaccionar con más de un antígeno), hay que buscar la causa de la agregación secundaria de los complejos primarios en procesos distintos de la primitiva reacción específica entre antígeno y anticuerpo. Al descubrimiento de estas fuerzas que permiten la agregación de los complejos primarios han de aplicarse los autores que rechazan el principio de la multivalencia y la teoría reticular.

F. HAUROWITZ (1936, 1939) supone que entran en acción enlaces inespecíficos, lo que equivale intentar, a ciegas, un salto en lo desconocido.

W. C. BOYD no se pregunta la causa concreta por la que los complejos primarios se reúnen en agregados mayores, sino que se limita a preguntarse por qué se produce una precipitación. BOYD cree que este proceso es debido a que la unión de antígeno y anticuerpo da lugar a un complejo cuya solubilidad es tan reducida que precipita. Atribuye esta reducción de la solubilidad a la neutralización mutua de los grupos polares del antígeno y del anticuerpo, y a que otros grupos polares de la molécula del anticuerpo que pudieran quedar

libres pierden contacto con el agua que los rodea por quedar bloqueados en el complejo. BOYD propone para su hipótesis el nombre de *teoría de la oclusión*.

J. MARRACK, antes que BOYD, había expuesto una opinión análoga. Aunque MARRACK cuenta entre los autores que atribuyen a las moléculas de anticuerpo varios grupos reaccionantes y a los precipitados inmunes una configuración reticular de partículas de antígeno y anticuerpo, admite (1938, pág. 152) que a la formación del precipitado pueden contribuir otros factores, entre ellos la reducción de la solubilidad del anticuerpo. Los anticuerpos son seroglobulinas, y la solubilidad de estas sustancias es debida a que sus grupos polares y las moléculas de agua entran en acción recíproca; parece evidente que si los grupos polares específicos de las moléculas de anticuerpo se bloquean por combinarse con el antígeno y los restantes grupos polares se ponen en contacto con la molécula antigénica vecina en lugar de con las moléculas de agua, la consecuencia ha de ser la disminución de la solubilidad de la película de anticuerpos que recubre el antígeno y quizá una débil deformación de la molécula del anticuerpo:

La explicación de MARRACK y (en mayor grado) la teoría de la oclusión de BOYD pueden extenderse a todas las reacciones serológicas en que el antígeno se utilice en forma de disolución coloidal; es decir, a las reacciones de precipitinas; en algún caso, podría también extenderse a la formación de precipitados provocados por la mezcla de suspensiones de virus en estado de dispersión molecular y el antisero específico. Pero si los elementos que contienen el antígeno poseen la forma y tamaño de células (bacterias, eritrocitos), su dispersión en un medio acuoso no puede considerarse como una disolución, y por ello la "insolubilización" del complejo antígeno-anticuerpo no puede considerarse causa física del proceso de floculación. Es cierto que este principio podría enunciarse de modo que su aplicación se extendiera al campo de las aglutinaciones. Bastaría para ello suponer que las moléculas de anticuerpo, al ser adsorbidas en las zonas de la superficie de las células que contienen antígenos bloquean los grupos polares de los anticuerpos e incluso desnaturalizan estas sustancias de modo que las superficies antigénicas cubiertas de una película de este tipo adquieran carácter hidrófobo, y por esta razón se agregan entre sí y floculan. Ahora bien: este efecto sólo puede admitirse con la suposición previa de que el total o gran parte de la superficie de la célula se recubre de anticuerpos desnaturalizados. Sin embargo, según cálculos efectuados, no siempre se da este caso en la aglutinación de

las bacterias. Los sueros aglutinantes actúan, como es sabido, a diluciones muy grandes, produciéndose la aglutinación incluso cuando toda la proteína inmune existente en el volumen de la reacción no alcanza a cubrir, aunque esté extendida en capa monomolecular, más que el 2 por 100 de la superficie de las bacterias.

Por lo demás, hay que explicar no sólo el crecimiento de los complejos primarios de antígeno-anticuerpo, sino también la *estabilización de los productos de la floculación*. Cuando se isoaglutinan los hematíes humanos a veces resulta sorprendente la solidez del aglutinado, que incluso resiste una enérgica agitación; también se sabe que la coherencia se puede acelerar y reforzar considerablemente, centrifugando a muy pocas revoluciones. Estos hechos no pueden atribuirse a fuerzas específicas, es decir, a una mera combinación de antígeno y anticuerpo, sino a factores de otro tipo. En igual sentido habla el hecho, observado con seguridad, de que las células de los flóculos no sólo se ligan entre sí íntimamente, sino que en muchos casos se adhieren a las paredes de vidrio de las probetas de modo tan firme, que hay que separarlas rascando [S. B. HOOKER (1938), W. C. BOYD y S. B. HOOKER (1933 c), K. LANDSTEINER (1945), S. RAFFEL, St. MUDD y T. F. ANDERSON].

El punto más importante de la discusión, aunque no el único decisivo, es saber si los anticuerpos sólo poseen, efectivamente, una única valencia con la que ligarse al antígeno. Considerada en sí misma no parece probable que los anticuerpos hayan de ser monovalentes por alguna ley. No es posible dudar de la existencia de antígenos bivalentes y plurivalentes, y no se ve por qué los anticuerpos han de comportarse en este sentido de modo opuesto. Actualmente se admite casi unánimemente que los anticuerpos son globulinas inmunes, es decir, globulinas conformadas o sintetizadas intracelularmente bajo la influencia del antígeno; resultaría difícil encontrar una razón para que su modelado se detenga en una fase tal que no posean más que un único grupo con capacidad de combinarse *in vitro* con el correspondiente antígeno. En tanto que no se establezca con seguridad la monovalencia en sentido estricto (es decir, la capacidad de combinarse con un solo grupo funcional del antígeno), estas consideraciones poseen un valor indudable.

Investigaciones ópticas de los productos de las reacciones de antígeno y anticuerpo.

Han fallado hasta la fecha las esperanzas en que el microscopio electrónico resolvería el problema de la mono o polivalencia de los anticuerpos. T. F. ANDERSON y W. M. STANLEY creyeron observar una red irregular en los precipitados obtenidos por la reacción entre el virus del mosaico del tabaco y el antisuero precipitante de conejo; pero al reproducir los experimentos se demostró que se trataba de un amontonamiento de bastoncitos del virus. La investigación óptica de los precipitados utilizando luz no puede, naturalmente, ofrecer ninguna solución (véase luego).

Como en los aglutinados intervienen elementos poseedores de antígeno que son visibles (bacterias, eritrocitos), parece lógico pensar que del modo de agruparse tales elementos en los floculos debe ser fácil sacar conclusiones con respecto al mecanismo de la agregación.

Desde que E. WEIL y A. FELIX describieron las aglutinaciones H y O de las bacterias flageladas, se ha prestado una atención especial a las diferencias entre ambos. En la aglutinación H de los bacilos típicos los floculos resultan sueltos, coposos y pueden deshacerse fácilmente por agitación; en las aglutinaciones O puras se producen floculos compactos, como gránulos, que se depositan en el fondo o ascienden a la parte alta de la probeta, reuniéndose en un sedimento que constituye una suerte de película que se adhiere a las paredes de vidrio y que al agitar se desprende frecuentemente como un todo. El examen macroscópico manifiesta ya que se trata de dos procesos diferentes. A. PIPER estudió el desarrollo de ambas reacciones en el campo oscuro y pudo observar que en la aglutinación H primeramente se producen precipitados córneos sobre los flagelos (compárense sus resultados con las investigaciones de St. MUDD y de T. F. ANDERSON con el microscopio electrónico, pág. 212); tales depósitos terminan recubriendo totalmente los flagelos, por lo que éstos aumentan considerablemente de espesor y se vuelven rígidos, se traban entre sí y, por último, los bacilos se aglomeran de modo puramente mecánico. La fragilidad de los aglutinados H radica sencillamente en que los flagelos se separan fácilmente del cuerpo bacteriano. Por el contrario, en las aglutinaciones O el proceso primario consiste en la adherencia directa de los cuerpos bacterianos, actuando las fuerzas atractivas, según parece, en la dirección de los ejes longitudinales de los bacilos, ya que, según las observaciones de PIPER, éstos se ligan

entre sí por los extremos y constituyen hebras de bacterias enlazadas. Cabe atribuir este modo de enlazarse a moléculas de anticuerpo bivalentes que unirían entre sí cada dos bacilos; habría que suponer también que los grupos antigénicos, en que se fijan las moléculas de anticuerpo, están situados en los polos de los bacilos o, al menos, que en este lugar despliegan mayor avidez. Si, por el contrario, toda la superficie de los bacilos se recubriera de moléculas de anticuerpo bivalentes o plurivalentes y éstas manifestaran la misma afinidad para las bacterias, se originaría un agregado de estructura distinta de la descrita por PIPER. Lo que PIPER ha observado en las aglutinaciones O no explica, naturalmente, la solidez de los aglutinados, ni que las células se aglomeran, constituyendo una masa compacta; parece que a este proceso primario pronto se une una influencia inespecífica decisiva para la configuración macroscópica característica de este tipo de aglutinación (véase pág. 228).

De especial interés es el hecho siguiente, que puede observarse macroscópicamente en las aglutinaciones H y O y también en la precipitación específica de suspensiones de virus. El virus del mosaico del tabaco y el virus X de las patatas dan con los antiseros de conejo correspondientes precipitados coposos, sueltos, que al depositarse ocupan gran volumen y que se asemejan enteramente a los aglutinados H de las bacterias flageladas; por el contrario, el virus de Bushy-Stunt produce con su antisuero un agregado granuloso, que se origina con lentitud y que se deposita, constituyendo una masa compacta, en el fondo del tubo de ensayo. F. C. BAWDEN y N. W. PIRIE (1938) autores que observaron estos comportamientos, explican la diferencia entre ellos por la distinta configuración de las partículas elementales de los virus. Como el virus de mosaico de tabaco y el virus X poseen la forma de bacilos alargados, parece lógico que durante el proceso de la floculación se entrecrucen entre sí e impidan una adaptación mutua compacta; por ello, el producto de la reacción serológica resulta en forma de copos sueltos. En cambio, los elementos del virus de Bushy-stunt son esféricos, y por consiguiente las fuerzas que los atraen pueden conducir a masas más compactas que las que resultan de las agrupaciones de elementos bacilares. Esta explicación no puede aplicarse, al menos por completo, al mecanismo de la aglutinación H y O de las bacterias flageladas tal como lo observó en sus investigaciones ópticas PIPER. El entrecruzamiento de flagelos, anteriormente móviles, pero envarados al cargarse de anticuerpos, es un fenómeno que puede comprobarse por el examen óptico y que se opone a la afirmación de que la forma bacilar de los elementos del virus es lo

que impide que formen entre sí agregados compactos; por otra parte, las bacterias no flageladas, aunque son también bacilares, no presentan la aglutinación H, sino la aglutinación O. Tal vez las partículas lacilares de los virus se adhieran entre sí de modo polar, constituyendo series semejantes a las que, según describe PIPPER, se forman en las aglutinaciones O de las bacterias. Sin embargo, se echan de menos elementos comunes que permitan atribuir a una misma causa las formas de la aglutinación H y de la B, que, observadas macroscópicamente, resultan indudablemente idénticas para las bacterias y los virus.

C. PLURALIDAD O SINGULARIDAD DE LOS ANTICUERPOS

La alternativa que se expone en el título necesita, incluso para los serólogos especializados, una aclaración. La cuestión de si un antígeno químicamente unitario sólo puede dar lugar a un único anticuerpo ya se ha decidido en sentido negativo, y no sólo en los casos en que el antígeno posea múltiples determinantes inmunológicos, sino también cuando se supone que la especificidad del anticuerpo está determinada por un solo grupo determinante del antígeno (véase página 183). La disyuntiva que se va a discutir en este apartado es si las diferentes formas de las reacciones serológicas (aglutinación, precipitación, hemólisis, bacteriolisis, muerte de las bacterias, fijación de complemento, neutralización de toxinas por sueros antitóxicos, sensibilización pasiva de animales normales por antisueros) proceden de anticuerpos caracterizados por un modo especial de actuar (aglutininas, precipitinas, hemolisinas, antitoxinas, anticuerpos anafilácticos) o si no existe más que una clase de anticuerpos, cuyo efecto se manifiesta de diversas formas, según sean las condiciones en que actúa; *pero hay que atribuirlo siempre al mismo principio, a la afinidad del anticuerpo con el antígeno.*

Durante mucho tiempo no se supo del antígeno más que era capaz de desencadenar en el organismo la formación de un anticuerpo, y del anticuerpo, su capacidad de combinarse específicamente con su antígeno, manifestándose la reacción en una u otra forma; estas nociones, consideradas racionalmente, apoyan, al menos como solución provisional, la segunda tesis (es decir, la de la unidad de acción de los anticuerpos), y rechazan la clasificación de los anticuerpos en floculantes, lisisinas, neutralizadores de toxina y sensibilizantes. Pero los pocos autores que tuvieron el valor de sostener esta opinión, como J. BORDET (1920), E. FRIEDBERGER, R. DOER (1929 b), permane-

cieron aislados. Diversos motivos, entre ellos algunos objetivos, explicaban la resistencia de la serología para aceptar esta hipótesis. Entre los argumentos experimentales hay que contar, en primer lugar, la aparente divergencia entre la neutralización de las toxinas por los sueros antitóxicos y los otros tipos de reacción entre antígeno y anticuerpo; esta diferencia parecía tan evidente que impedía la aceptación de la teoría unitaria; sin embargo, las toxinas bacterianas y sus antitoxinas eran los primeros antígenos y anticuerpos en que se había ocupado la investigación sobre inmunidad, y muchos conocimientos importantes proceden del análisis de su comportamiento; ante todo, de la ley de la especificidad. Ahora bien: sucede con frecuencia que un fenómeno que parece completamente incompatible con una hipótesis ofrezca precisamente la demostración decisiva de su verdad. En este caso la teoría de la unidad esencial de los anticuerpos ha encontrado en las reacciones de toxina-antitoxina, que tanto tiempo se opuso a ella, una base más firme que la que pudieran esperar sus mismos defensores.

G. RAMON (1922) pudo observar que se producen floculaciones en las mezclas de toxina diftérica con su suero antitóxico cuando están en las proporciones adecuadas. La zona en que se producen tales precipitados es muy limitada; de modo especial los inhibe el exceso de anticuerpos, e incluso los precipitados ya producidos pueden redisolverse por adición del suero (véase pág. 221). Pero, y este es el punto fundamental, *el óptimo de floculación coincide con la completa neutralización de la toxina*, de modo que no sólo carece de toxicidad el precipitado lavado, sino que el líquido sobrenadante tampoco contiene cantidades apreciables de toxina ni de antitoxina. Esta coincidencia resulta tan exacta que ya RAMON propuso utilizar la reacción de floculación para la determinación cuantitativa de cualquiera de los dos componentes de la reacción (toxina y antitoxina); este método de evaluación resulta mucho más sencillo que los usados hasta la fecha (métodos de E. BEHRING y P. EHRLICH para valorar sueros antitóxicos), y es el que se utiliza habitualmente para los fines prácticos de fabricación de sueros curativos antitóxicos, habiendo conducido al establecimiento de una unidad, *la unidad floculante* (unité floculante). Resulta, pues, evidente que existe una relación estrecha entre la reacción toxina-antitoxina y las diferentes formas de la precipitación inmune; poco tiempo después, H. R. DEAN (1927) consiguió reforzar este puente al demostrar, mediante investigaciones cuidadosas, que la mezcla de toxina diftérica y suero antitóxico es capaz de fijar complemento y que los resultados positivos se obtienen con

Las mismas proporciones de antígeno y anticuerpo que resultan óptimas para las reacciones de floculación y para la neutralización de la toxina *in vitro*. Como puede comprenderse, ya se habían efectuado algunas investigaciones anteriores para descubrir si la neutralización de la toxina por la antitoxina iba acompañada por otras reacciones serológicas, especialmente las de precipitación y fijación de complemento (un resumen casi completo de la literatura concerniente a estos estudios previos se debe a A. T. GLENNY y C. C. OKELL). Los resultados fueron unos negativos y otros contradictorios, hasta que G. RAMON encontró la solución definitiva.

El descubrimiento de que la neutralización de la toxina por la antitoxina podía incluirse entre las reacciones de precipitinas y entre las de fijación de complemento dió nuevo impulso a las investigaciones que se esforzaban en buscar una base experimental para la tesis de la unidad de acción de los anticuerpos y de la unidad de su soporte material. Aunque la conexión, desde el punto de vista de la teoría del conocimiento, no resulta explícita, en todos los casos aparece, no obstante, clara al examinar la sucesión cronológica de los trabajos más importantes aparecidos en este terreno. En los años que siguieron a la primera publicación de RAMON aparecieron las investigaciones clásicas de F. S. JONES (véase pág. 193), de S. MUDD y colaboradores, que demuestran que los anticuerpos precipitantes y aglutinantes actúan como "opsoninas" (es decir, excitan la fagocitosis) sobre partículas de colodión, en las que absorbieron los correspondientes antígenos proteicos; de J. FREUND y de L. REINER y colaboradores, que consiguieron reproducir diferentes reacciones "serológicas" o, dicho más exactamente, la manifestación exterior de tales reacciones (aglutinación, fijación de complemento, lisis por complemento, aceleración de la fagocitosis), sustituyendo el antisero por una única sustancia inespecífica (tanino). Junto a estas experiencias clásicas se efectuaron experimentos con los polisacáridos de las bacterias, especialmente de los neumococos, de gran interés, porque uno de los componentes de la reacción, a saber, el polisacárido que funciona como hapteno, puede obtenerse en estado de gran pureza. No sólo se demostró que los antisueros obtenidos con neumococos específicos de tipo guardan paralelismo cuantitativo para las distintas funciones que en serología era norma atribuir a precipitinas, aglutininas, anticuerpos anti-infecciosos y fijadores de complemento y opsoninas [L. D. FELTON y G. H. BAILEY, L. D. FELTON (1931)], sino que el soporte material de estas funciones corresponde evidentemente a una única sustancia (experimentos clásicos de FREUND y REINER); en

efecto, en las reacciones de floculación el precipitado arrastra todos los anticuerpos, y del precipitado pueden recuperarse *sub diversa specie*, es decir, como anticuerpos anti-infecciosos o fijadores de complemento, como aglutininas o como anticuerpos anafilácticos; es decir, que pueden reaccionar en la forma que el experimentador disponga, si se les coloca en las condiciones adecuadas para ello (L. D. FELTON (1932), B. F. CHOW y H. WU).

Cabría esperar que la aportación de pruebas experimentales, de que se acaba de dar una sucinta idea, considerando los tipos principales, junto con la probabilidad interna de la hipótesis unitaria, sería suficiente para convencer los impugnadores más recalcitrantes.

Sin embargo, se defendió la pluralidad de los anticuerpos (es decir, la existencia de aglutininas, precipitinas, anticuerpos fijadores de complemento, etc., como sustancias distintas), como si supusiera un especial tesoro de la investigación en inmunidad. Como el número de trabajos de oposición a la teoría unitaria es numerosísimo, no se puede entrar en particularidades, lo que por lo demás tampoco es necesario, ya que todos ellos consisten en disociar las distintas funciones del antisuero de los modos más variados, por ejemplo, por fraccionamiento de las globulinas, por calefacción, por ataques químicos (por ejemplo, la extracción con alcohol y éter), por tratamiento con ácido diazobenzolsulfónico o, finalmente, por simple dilución.

Muchas de estas observaciones eran justas, pero, *a priori*, inapropiadas para demostrar la existencia de distintos tipos de anticuerpos. Por ejemplo, se ha observado que si un antisuero que actúa precipitando y aglutinando se le diluye progresivamente con disolución de cloruro sódico al 0,8 por 100, conserva el efecto aglutinante hasta diluciones que carecen ya de poder precipitante; ahora bien: F. S. JONES, en sus notables experimentos, y M. H. MERRILL, en sus investigaciones acerca de la trascendencia teórica de la masa antigénica mínima que se necesita para las distintas reacciones de floculación, demuestran que tales diferencias no se deben de ningún modo a la existencia en el antisuero de una "aglutinina" y de una "precipitina", y pueden explicarse de modo satisfactorio admitiendo la existencia de un anticuerpo único. Además se adujeron también argumentos fundados en hechos falsos, como la separación de las precipitinas y de los denominados anticuerpos anafilácticos por fraccionamiento de las globulinas con ayuda de la electrodiálisis (R. OTTO y T. SHIRAKAWA); DOERR y HALLAUER no pudieron conseguir esta disociación ni por electrodiálisis ni por precipitación fraccionada mediante sulfato amónico, y hoy este asunto se considera definitivamente

resuelto desde que A. TISELIUS [1937 a, 1937 c; véase también A. TISELIUS y E. A. KABAT] introdujeron la electroforesis para la identificación y el aislamiento de las globulinas inmunes.

Las tentativas para disociar los anticuerpos entre sí han perdido su interés frente al que ofrece la discriminación entre las reacciones antígeno-anticuerpo propiamente dichas y las consecuencias secundarias de tales reacciones (aglutinación, precipitación, citólisis, etc), y, en segundo lugar, frente a la demostración de que sólo la fase primera (primaria) es específica, pero no la segunda. Pues de este modo resulta evidente que ningún anticuerpo merece este nombre por la apariencia que toma el producto de la reacción en la segunda fase.

Este desdoblamiento de las reacciones serológicas en una fase específica y una inespecífica fué introducida por J. BORDET (1899) en sus fundamentales investigaciones sobre la aglutinación. BORDET demuestra que la aglutinación se compone de dos procesos sucesivos. Sólo el primero, es decir, la unión del anticuerpo con el antígeno (con las bacterias), debido a sus afinidades específicas, pertenece al dominio de la inmunología; el segundo, a saber, la agregación y precipitación de las bacterias, no es un fenómeno biológico, sino físico-químico, que debe atribuirse al efecto floculante de los electrolitos y que también se observa trabajando con partículas inorgánicas, por ejemplo, con suspensiones de hidróxido aluminico finamente dispersadas. "Il n'y a pas lieu d'admettre l'existence dans la molecule de l'anticorps, d'un groupement spécial doué du pouvoir agglutinant. Les agglutinines ne se distinguent pas foncièrement des autres anticorps. Les noms qu'elles portent se justifie non pas en raison essentiellement de leurs qualités propres, mais parce que les antigènes correspondants sont aptes, des qu'ils s'unissent a elles, à se laisser floculer par les sols" [BORDET (1939), pág. 338].

El intento de A. Joos de demostrar por un experimento decisivo la concepción de BORDET fué considerado insuficiente por la crítica. Joos pretendió demostrar que la aglutinación (la floculación) de las bacterias no se produce en medios exentos de electrolitos (agua destilada, disolución de glucosa), aunque en ellos los anticuerpos (las "aglutininas") también se unen con las bacterias; no tuvo en cuenta lo que, sin embargo, era ya un hecho conocido, a saber: que la seroglobulina, y con él el soporte de la función anticuerpo, precipita en medio carente de electrolitos, por lo que resulta inactiva. Pero, como ya hizo BORDET, puede modificarse el experimento cargando primeramente las bacterias suspendidas en disolución de NaCl con los anticuerpos, lavando después y comprobando finalmente si el agregado, producto de la reacción, no se destruye en un medio casi exento de electrolitos (la eliminación completa de electrolitos no puede conseguirse a causa de la cesión de electrolitos al agua destilada o a

la disolución isotónica de azúcar); se observa entonces que para la floculación no se requieren sino concentraciones mínimas de electrolitos, como más tarde comprobó H. EAGLE en una serie de ensayos finamente graduados. La posibilidad de que el anticuerpo se combine con la bacteria sin que ésta flocule puede demostrarse también por otro camino. Aplicando una calefacción suave se produce en los antisueros aglutinantes una "zona inferior de inhibición"; es decir, que la floculación no se produce, aunque se emplee este antisuero en concentraciones más elevadas que las que resultan ya positivas para el nativo; pero si se centrifugan las bacterias y se les añade suero inmune fresco (no calentado), resultan inaglutinables, lo que no tiene otra explicación más que al ser agitadas con los antisueros calentados (es decir, modificados por la calefacción), los fijaron [F. S. JONES (1927), G. S. SHIBLEY (1926)].

Debemos mencionar que MARRACK, en la primera edición de su conocida monografía acerca de la química de los antígenos y anticuerpos (1934), se ha pronunciado contra el carácter inespecífico de la segunda fase al señalar la posibilidad de que toda molécula de anticuerpo posea varios grupos reactivos específicos mediante los cuales se encadenarían las partículas de antígeno, que a su vez han de poseer numerosos grupos reactivos; según este modo de pensar, la formación de los agregados y, por consiguiente, la floculación estaría condicionada no por causas puramente físicas, sino por procesos químicos o, hablando con mayor precisión, inmunquímicos. M. HEIDELBERGER y F. E. KENDALL (1935 b) se adhirieron inmediatamente a esta hipótesis, que, como se ve, no es sino la teoría de la multivalencia recíproca, también designada como teoría reticular (en inglés, como *alternation theory*). Como esta teoría y las concepciones que de ella se derivan con respecto al crecimiento de los agregados en las reacciones de floculación ya se consideraron detenidamente (véase pág. 223), nos limitaremos a mencionar los experimentos que pretenden impugnar el carácter inespecífico de la segunda fase entendida en el sentido de BORDET. La primera de estas pruebas, publicada por W. W. C. TOPLEY, J. WILSON y J. T. DUNCAN (1935), consiste en mezclar las suspensiones de dos especies de bacterias no emparentadas entre sí (por ejemplo, neumococos y *Bact. enteritidis*) y adicionar a la mezcla los dos sueros aglutinantes correspondientes. En el microscopio no se observan sino grumos homogéneos, es decir, compuestos de una sola especie bacteriana, lo que parece oponerse a las enseñanzas de BORDET y hablar en favor de la teoría reticular. Sin embargo, experimentos orientados de un modo análogo, que efectuaron H. A. ABRAMSON y de S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1937), y en parte también los de A. S. WIENER y M. HERMAN, dieron el resultado opuesto, ya que estos autores observaron en el microscopio floculos mixtos constituidos por los diversos elementos antigénicos, mezclados en distintas proporciones; por consiguiente, BORDET parece tener razón al atribuir un valor decisivo a los resultados obtenidos por él. No contentos con el estado del problema, recientemente volvieron sobre el tema H. A. ABRAMSON, FOYD, HOOKER, PORTER y PURNELL, y establecieron que se obtenían de modo predominante floculos homogéneos cuando se empleaban sueros aglutinantes muy diluidos y floculos mixtos, es decir, constituido por varias especies de células, cuando se empleaban sueros concentrados. De este modo se llegó a la conclusión de "que la denominada *alternation hypothesis* (teoría reticular) juega un papel, pero que las fuerzas inespecíficas pueden intervenir de modo activo, como BORDET suponía desde hace tiempo, cuando los anticuerpos están concentrados".

Es probable que lo observado no dependa solamente de la concentración de los antisueños, sino también de otros factores, y entre ellos de la mayor o menor tendencia a agregarse que posean los distintos elementos antigénicos y de la diversa velocidad de formación de los flocúlos que depende de dicha capacidad. En relación con lo anterior, H. A. ABRAMSON y sus colaboradores hacen la importante observación de que, a pesar de todo el esfuerzo empleado, no puede aducirse ninguna prueba decisiva de la polivalencia de los anticuerpos, que es la hipótesis previa en que descansa la teoría reticular. D. PRESSMAN, D. H. CAMPBELL y L. PAULING han creído demostrar la polivalencia mediante experimentos efectuados con eritrocitos copulados con haptenos y anticuerpos que reaccionan con dichos haptenos: según sus cálculos, el número de grupos del hapteno copulados a cada eritrocito no pasa de 60, de modo que a cada célula no pueden fijarse sino 60 moléculas de anticuerpo que no recubren sino el 0,02 por 100 de la superficie del hematie, lo que parece insuficiente para permitir la aglutinación; por este motivo, según estos autores, hay que recurrir a la polivalencia de los anticuerpos para explicar la floculación observada. ABRAMSON y colaboradores no admiten el argumento, que recusan también W. C. BOYD y J. BEHNKE (1944), quienes señalan especialmente como dudoso el cálculo de la valencia de los anticuerpos que PAULING basa en sus experimentos con haptenos (véase PRESSMAN, CAMPBELL y PAULING). Tales haptenos, al disolverse tienden a agregarse paulatinamente de modo espontáneo y se van haciendo más idóneos cada vez para las reacciones de floculación serológica; este hecho, que fué ya observado por K. LANDSTEINER y J. VAN DEL SCHEER (1932 b, 1933), y corroborado cuantitativamente en pruebas de difusión por S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1939, 1941 a) para el hapteno utilizado por PAULING. Según lo anterior, cabe, naturalmente impugnar toda deducción que se funde en identificar el peso molecular químico de un hapteno con el tamaño de la partícula. Tales experiencias, por consiguiente, demuestran la importancia del estado físico en los procesos de floculación serológica; ya es sabido que los electrolitos actúan "aglutinando" y "precipitando" bacterias, disoluciones proteicas, etc., e incluso se ha comprobado que obedecen a la regla de precipitación de HARDY con cationes de valencia creciente (NaCl , CaCl_2 , CeCl_3 , ThCl_4). Para el autor, no hay duda que en su esencia la teoría de BORDET no puede impugnarse por las peripecias de detalle de la investigación serológica, y que no hay ninguna razón importante para abandonar la concepción de este maestro.

Ahora bien: aunque no sea la aglutinina misma, sino los electrolitos presentes en la mezcla de la reacción, NaCl en las técnicas usuales, los causantes inmediatos de la aglutinación, es indudable que la combinación de las bacterias con los anticuerpos origina un nuevo estado que permite a los electrolitos ejercer un efecto precipitante que, en caso contrario, no se manifiesta a las concentraciones empleadas. Teniendo en cuenta que las bacterias suspendidas en agua pueden también precipitarse por electrolitos sin el concurso de un antisuero que contenga los anticuerpos correspondientes, y que en esta floculación inespecífica los cationes de los electrolitos son los que ejercen el efecto precipitante (al neutralizar con sus cargas positivas las ne-

gativas de las bacterias), puede plantearse de modo más preciso el problema de la participación de los antisueros en la aglutinación específica; habría que precisar *por qué razón el ión Na en concentraciones bajas floclula las bacterias cargadas de uglutíminas*. Lo más sencillo sería suponer que los anticuerpos modifican la superficie de las células bacterianas de modo que rebajan su umbral de floculación hasta ponerlo al alcance de concentraciones de Na^+ cuya capacidad de floculación o de descarga no alcanza el umbral de floculación de las bacterias sin anticuerpos. ¿En qué consiste esta transformación? Pudiera suponerse que la superficie limitante de las bacterias se modifica por la influencia del anticuerpo, sea disminuyendo su afinidad con el agua del medio o neutralizando una parte de sus cargas eléctricas. Pero desde que se ha establecido casi con seguridad que los anticuerpos no son sino seroglobulinas de un cierto tipo, hay que representarse el "enlace" de una sustancia coloidal de tan alto peso molecular con una célula morfológicamente intacta cargada de antígeno, por la imagen puramente mecánica de la extensión de una película de globulinas sobre la superficie de la célula, imagen que, por lo demás, según la investigación óptica, parece responder a la realidad (véase pág. 212). Con ello, naturalmente, no se excluye que la célula misma experimente alguna alteración; pero se señala que *no es necesario* postular una participación de la célula en este sentido como factor esencial para que la reacción se produzca; teóricamente, es suficiente suponer que la película de globulina inmune tiene las propiedades que permiten que concentraciones mínimas de electrolitos ejerzan efecto floculante; y como se sabe que la globulina inmune no posee por sí misma esta propiedad, habría que suponer que la adquiere a consecuencia de su adsorción en las bacterias, mediante un proceso que la transforma de coloide hidrófilo en hidrófobo. Suponiendo que la especificidad del anticuerpo esté determinada por sus grupos hidrófilos, esta transformación se explicaría así: los grupos hidrófilos se saturarían por el antígeno, y los hidrófobos se enfrentarían con el agua, provocando la inestabilidad de la suspensión. Como tampoco se produce la floculación en ausencia de electrolitos, habría que suponer también que la ionización de la película de globulina origina cargas suficientes para mantener la suspensión; cargas que se vencen con ayuda de electrolitos a concentraciones bajas.

En esta hipótesis, establecida por G. H. SHIBLEY (1926), figura una nueva premisa hipotética, *la desnaturalización del anticuerpo cuando, se adsorbe por el antígeno*, y como fundamento de esta desnaturalización el carácter hidrófilo de los grupos del anticuerpo que

condicionan su especificidad. Pero, como en otras hipótesis semejantes, también en ésta los procesos desarrollados en la cubierta de anticuerpos no hacen sino crear las condiciones para la agregación de las bacterias: el factor último y decisivo lo constituyen también los electrolitos. Caso de ser justa la manera de interpretar el fenómeno, no lo es la reflexión de que de los dos componentes del complejo antígeno-anticuerpo sólo la globulina inmune tiene un papel decisivo en la aglutinación, mientras que el antígeno (la célula bacteriana) no participa en ella; es el complejo entero lo que flocula y el antígeno es necesario para la supuesta desnaturalización de la cubierta de anticuerpo.

La idea de que las floculaciones producidas en las reacciones de inmunidad se deben al recubrimiento de la partícula antigénica por globulinas inmunes, se aplica evidentemente sólo a los antígenos que están en forma de células (bacterias, hematies), y a ellos, además, únicamente en el caso de que encuentren en la mezcla de la reacción una tal proporción de globulinas inmunes que puedan recubrirlos del modo postulado. Esta condición no se cumple siempre que se aglutinan bacterias, puesto que para que este fenómeno se produzca bastan unas concentraciones de antisuero tan bajas que en ellas las globulinas inmunes no alcanzan a recubrir sino la cincuentava parte de la superficie total de las bacterias (véase pág. 227). Cuando las dimensiones de la partícula antigénica son mucho menores que las de la molécula de la globulina inmune (como sucede casi siempre en la precipitación), resulta inconcebible la imagen del antígeno recubierto de anticuerpos, y hay que recurrir a la hipótesis auxiliar de que en este caso es la molécula de la globulina inmune la que se transforma en un coloide hidrófobo recubriéndose de partículas de antígeno.

Para resumir el estado actual de nuestros conocimientos, puede decirse que las "aglutininas" no "aglutinan", sino que se limitan a actuar sobre las células que contienen antígenos, volviéndolas sensibles para el efecto floculante de electrolitos a unas concentraciones insuficientes para precipitar el antígeno; ahora bien: el mecanismo de esta "sensibilización" hasta la fecha no se conoce con exactitud, y sólo puede decirse con seguridad—lo que, por otra parte, resulta evidente—que este proceso debe tener lugar en la superficie de la célula, es decir, en la superficie limitante entre ella y el agua.

Lo que se ha aducido para la aglutinación, como ejemplo, vale con pequeñas modificaciones para las otras reacciones antígeno-anticuerpo. Las antitoxinas tampoco pueden considerarse como unos anticuerpos especiales que neutralizan la toxicidad, sino simplemente como anticuerpos que, por definición, se combinan con su antígeno

específico. La combinación se efectúa del mismo modo cuando se sustituye la toxina por su derivado inocuo (el toxoide) y la toxina no modificada no se "neutraliza" al combinarse, puesto que si se disocia el complejo antígeno-anticuerpo puede recuperarse en posesión de su toxicidad específica. *Pero no está claro por qué la toxina, mientras se encuentra combinada con la antitoxina, no actúa tóxicamente* (1).

La reversibilidad de la combinación entre la toxina y la antitoxina parece implicar que se trata de un proceso físico; la misma conclusión parece deducirse de que la neutralización pueda manifestarse exteriormente como una precipitación. Ahora bien: F. S. JONES consiguió transformar el aspecto de una precipitación en una aglutinación, para lo que adsorbió el precipitínógeno (suero de vaca u ovalbúmina) en bacterias o en partículas de colodión, sobre las que hizo actuar un suero precipitante de conejo (véase pág. 193). JONES, sin embargo, quedó también convencido de que en estos experimentos no puede invertirse la sucesión del antígeno y del anticuerpo; es decir, que la aglutinación no se produce cuando la partícula adsorbente se trata primero con el antisuero y después recibe el antígeno proteico; a pesar de que puede demostrarse que la proteína del antisuero se adhiere a la partícula y que el contenido en anticuerpos del antisuero se reduce por la adsorción. JONES considera que esta observación confirma la hipótesis de que la aglutinación es debida al recubrimiento de las bacterias por una película de globulina inmune que adquiere las propiedades de una globulina desnaturalizada por su fijación al

(1) Para enjuiciar la neutralización de una toxina por un anticuerpo específico es importante recordar que en los enzimas unas veces se observa este fenómeno y en otros casos falta por completo. Por ejemplo, el desdoblamiento de la urea por la ureasa puede impedirse por un antisuero, como J. MORGENROTH ya estableció en 1910 y han confirmado posteriormente otros autores que emplearon métodos más exactos [J. S. KIRK y J. B. SUMNER (1932, 1934), L. PILLEMER, ECKER, MYERS y MUNTWYLER]; asimismo, por la inyección profiláctica del antisuero puede reducirse o impedirse por completo el efecto extraordinariamente tóxico de una inyección intravenosa de ureasa sobre el organismo de los mamíferos. Inmunizando conejos con luciferasa se obtiene un antisuero que inhibe por completo la acción de la luciferasa sobre la luciferina, de modo que no se produce luz (E. N. HARVEY y J. E. DEITRICK). Por el contrario, la acción de la catalasa no se neutraliza por un antisuero ni la actividad enzimática de la tirosinasa se influye por el efecto de un antisuero precipitante de conejo. La circunstancia de que en determinados enzimas se inhiba la actividad biológica y de que en otros no se observe este efecto (véase también la comunicación de O. WESTPHAL) parece significar que este fenómeno no radica en la esencia de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo, sino que depende de factores accidentales.

antígeno (G. H. SHIBLEY). El "recubrimiento" del antígeno por la globulina inmune sólo es posible cuando previamente se haya adsorbido el antígeno en la película, pero no cuando se efectúe antes el depósito de la globulina inmune. Relacionada con este problema se encuentra la cuestión de si la floculación toxina-antitoxina puede transformarse en aglutinación mediante la técnica de JONES; este problema ha sido contestado de modo afirmativo por J. FREUND, poco después de aparecidas las publicaciones de F. S. JONES.

Los experimentos de J. Freund (1930-31, 1931, 1932).—FREUND adsorbió toxina diftérica en partículas de colodión, que lavó después cuidadosamente y que suspendió en disolución de NaCl; la adición de antitoxina diftérica provoca una aglutinación de las partículas cargadas de toxina, que poseen el tamaño de estafilococos, y simultáneamente se neutraliza la toxina adsorbida, ya que si después de tratar las partículas con la antitoxina se inyectan en la piel de un cobayo no provocan las reacciones locales características que originan las partículas cargadas de toxina, pero no desintoxicadas por la antitoxina. Si las partículas de colodión se cargan con toxina tetánica, pueden también desintoxicarse por la correspondiente antitoxina, incluso cuando ésta se añade muy diluída. Como en los experimentos de F. S. JONES, tampoco aquí puede invertirse el orden del experimento. Es decir, si la antitoxina diftérica o tetánica se adsorbe en partículas de colodión y se adiciona después la disolución de la toxina, las partículas, una vez lavadas, resultan tóxicas y provocan en los ratones blancos el tétanos o desencadenan en cobayos el efecto letal de la toxina diftérica. Estos hechos experimentales han sido confirmados por H. SCHMIDT (1933). Vamos a discutir su trascendencia.

La discusión de este problema se simplifica teniendo a la vista el resumen esquemático de los resultados experimentales de FREUND (1932):

TABLA 17.

Experimentos de adsorción en partículas de colodión (según J. FREUND, 1932, página 184 y sig.).

<i>En la partícula de colodión se adsorbe.</i>	<i>En disolución.</i>	<i>Toxicidad de la partícula de colodión lavada.</i>
I.—Toxina diftérica +	Antitoxina diftérica :	No tóxica.
II.—Toxina diftérica +	Antitoxina tetánica :	Tóxica.
III.—Antitoxina diftérica +	Toxina diftérica :	Tóxica.
IV.—Antitoxina tetánica +	Toxina diftérica :	No tóxica.
Ia.—Toxina tetánica +	Antitoxina tetánica :	No tóxica.
IIa.—Toxina tetánica +	Antitoxina diftérica :	Tóxica.
IIIa.—Antitoxina tetánica +	Toxina tetánica :	Tóxica.
IVa.—Antitoxina diftérica +	Toxina tetánica :	No tóxica.

OBSERVACIÓN.—De las ocho combinaciones de esta tabla sólo necesitan un comentario especial las cuatro primeras; las Ia-IVa ofrecen la misma ordenación de experimento que las cuatro primeras, pero con toxina tetánica y su antitoxina, y dan resultados idénticos, por lo que hay que considerarlos como experimentos paralelos a los anteriores que los corroboran.

Del I se deduce que la toxina diftérica adsorbida en la partícula de colodión se neutraliza al agitarse con antitoxina diftérica disuelta, y además mediante una reacción de inmunidad específica, ya que la antitoxina diftérica no puede sustituirse por una antitoxina heteróloga (tetánica) (II). En III se representa el experimento inverso de I, es decir, que se adsorbe primeramente antitoxina diftérica en la partícula de colodión que, después de lavada, se pone en contacto con la disolución de la toxina; la partícula conserva su toxicidad después de lavados repetidos, lo que parece demostrar que la toxina se fija a la antitoxina adsorbida de modo que resiste al lavado; este enlace también es específico, ya que la partícula cargada con antitoxina tetánica no puede fijar la toxina diftérica, de la que no quedan ni indicios después de lavar (IV).

En el caso III resulta difícil comprender la toxicidad de la partícula. En él las cosas parecen suceder como si la antitoxina adsorbida fijara su antígeno, la toxina homóloga, de modo específico; pero en cambio no se produce la consecuencia normal de tal combinación, es decir, la neutralización del efecto tóxico. La condición previa para que este fenómeno se produzca parece ser, naturalmente, que la antitoxina esté efectivamente adsorbida en la partícula de colodión, de modo que por el lavado no pueda ponerse en disolución. Que esta suposición se cumple efectivamente lo demostró J. FREUND (1932) calentando durante media hora a 55°, con el fin de destruir la toxina, partículas de colodión que preparó siguiendo la combinación III; tales partículas conservaban la anti-

toxina que podía descubrirse por su capacidad de protección. También se observó que las partículas tratadas primero con antitoxina y después con toxina resultaban más tóxicas que las partículas que no habían adsorbido más que toxina.

FREUND mismo no se decidió por ninguna explicación determinada. La que aparece más plausible es que la toxina adsorbida en la partícula de colodión fija más antitoxina que la necesaria para su neutralización, y que, reciprocamente, la antitoxina adsorbida fija más toxina de la necesaria para neutralizarla. Según esta opinión, lo que se fija en exceso depende de cuál de ambos componentes de la reacción (por su adsorción en la partícula de colodión) es el que se pone en forma de una "superficie de reacción serológica", y que por ello la cantidad en que interviene queda limitada a esta superficie; en cambio, el otro componente, al ponerse en contacto con dicha superficie, como se encuentra en una disolución relativamente concentrada, se fija en una proporción "superior a la necesaria"; fenómeno que, como FREUND subraya, ya había sido observado por BORDER en la aglutinación de hematies por anticuerpos a concentración elevada. La influencia de la posición relativa entre toxina y antitoxina puede, sin embargo, explicarse de otro modo. La neutralización de la toxina sólo puede conseguirse cuando se la rodea de una cubierta de anticuerpos desnaturalizados, insolubles en disolución salina; no se produce, en cambio, cuando es la antitoxina el componente que constituye la parte central sobre la que se fija la toxina, que queda, pues, hacia fuera. A esta explicación se inclinan FREUND, F. S. JONES y, especialmente, G. H. SHIBNEY, que difiere de los otros autores únicamente en que también concede importancia a los fenómenos entre la superficie y la disolución. Como hace observar, ambos factores probablemente no se excluyen, sino que cooperan, ya que pueden referirse a un mismo principio.

Es claro que la hipótesis de la cubierta, aunque fuera cierta, sólo tendría valor en las condiciones de posición en el espacio a que se someten la toxina o la antitoxina por su adsorción en la superficie de las partículas de colodión. En este sentido estaban orientados tanto los experimentos principales de J. FREUND, incluso sus experimentos de control, como los experimentos clásicos aducidos en apoyo de la teoría; citaremos, por ejemplo, los experimentos en que se neutraliza una toxina adsorbida en colodión por tanino que se combina con ella [L. REINER y colaboradores, J. FREUND (1929)]. Pero en la forma habitual de efectuar las pruebas de neutralización *in vitro*, los dos componentes de la reacción se ponen en contacto disueltos (en estado de dispersión molecular), y por ello hay que demostrar que, en estas condiciones concretas, también tiene validez "la regla de la cubierta".

No resulta suficiente la prueba basada en el fenómeno de Danysz. Con el nombre de fenómeno de Danysz se conoce la observación siguiente: si se mezcla una cantidad dada de suero antitóxico con una determinada cantidad de toxina, se obtienen mezclas de diferente toxicidad, según que la toxina se añada de una vez o en varias porciones; la adición fraccionada da lugar a productos

más tóxicos, es decir, que saturan la toxina en menor proporción. En todo caso, el fenómeno de Danysz no siempre puede invertirse. Es decir, que si se adiciona la antitoxina sobre la toxina resulta indiferente para la toxicidad de la mezcla añadir la antitoxina en varias porciones sucesivas o toda de una vez. No puede decidirse si la unilateralidad del fenómeno de Danysz está o no en relación íntima con los resultados de los fenómenos efectuados con las partículas de colodión; FREUND mismo opina (1932, pág. 187) que tal vez no se trate sino de una semejanza superficial.

Por lo demás, con posterioridad a las comunicaciones de FREUND, se ha determinado que el peso molecular de la toxina diftérica es de 70.000; el de la globulina de conejos, de 150.000, y el de la globulina inmune de caballo, de 930.000. Aun teniendo en cuenta que ni las moléculas de toxina ni las de las globulinas inmunes son esféricas, sino elipsoidales, e incluso considerando que las moléculas de las globulinas pueden deformarse hasta un cierto grado sin desnaturalizarse, casi no se concibe cómo una molécula de toxina tan pequeña puede recubrirse por las moléculas mucho mayores de los anticuerpos.

Otros resultados experimentales publicados por el mismo FREUND sugieren nuevas reflexiones. En una de sus comunicaciones [FREUND (1930-31)] se encuentran los siguientes datos: Se trataron, *a*) partículas de colodión con antitoxina tetánica, y después con la toxina; *b*) con suero de caballo normal y después con toxina tetánica; *c*) con antitoxina tetánica, después con toxina tetánica y, finalmente, de nuevo con la antitoxina; *d*) con toxina tetánica sólo. Se determinó varias veces la toxicidad de las partículas así tratadas y lavadas ulteriormente, observándose la siguiente serie de toxicidad: $a > d > b > c$. Por consiguiente, las partículas *b* tratadas con suero de caballo normal y toxina tetánica, aunque menos tóxicas que las impregnadas únicamente con toxina, no resultaban completamente inocuas, como cabría esperar si la fuerte toxicidad que se observa en las partículas *d* fuera debida a toxina ligada de modo específico y si el suero normal de caballo utilizado se supone exento de antitoxina tetánica. La inocuidad de la partícula *c* no puede considerarse como prueba definitiva de que la partícula *a* está recubierta de anticuerpos, y de que sólo suministraba la cubierta protectora el segundo tratamiento con antitoxina.

Por otra parte, los resultados obtenidos al efectuar estos experimentos con la toxina diftérica no coinciden exactamente con los observados con la toxina tetánica, en contra de lo que sucede con los resultados reunidos en el esquema antes reproducido. La toxina botulínica se comporta a su vez de modo completamente distinto. Las partículas de colodión cargadas con toxina botulínica no se neutralizan al ponerse en contacto con la antitoxina correspondiente, y la combinación inversa (adsorción de la antitoxina botulínica y tratamiento con la toxina botulínica) da lugar a resultados tan variables que impiden sacar ninguna conclusión [J. FREUND (1932, pág. 186)].

Los experimentos con colodión de FREUND dejan, por consiguiente, fuera de duda que para neutralizar la toxina resulta indispensable su recubrimiento con antitoxina.

Los efectos observados por FREUND pudieran explicarse, como también ha pensado su autor, suponiendo que la combinación de la toxina y de la antitoxina, y la neutralización de la toxina (o, mejor dicho, la desaparición de su efecto tóxico), son fenómenos distintos, de los cuales sólo el primero posee carácter inmunológico, mientras que el segundo obedece a una causa puramente física. Ahora bien: si se admite esta duplicidad de fases se llega a coincidir en todos los puntos con el modo de concebir BORDET la esencia de las reacciones serológicas.

En lo que concierne al antígeno (a la toxina), se ha podido establecer con certeza que su capacidad de reaccionar con el anticuerpo y su toxicidad son funciones distintas, habiendo suministrado la prueba los formoltoxoides (productos obtenidos tratando las toxinas con formaldehído), que poseen idéntica capacidad de combinación que la toxina de que proceden; pero, en cambio, no son tóxicos. Como los formoltoxoides no han podido transformarse de nuevo en la toxina, a pesar de los intentos más diversos, parece por lo menos probable, y desde luego justificado, admitir que en dichos toxoides están destruidos los grupos tóxicos de la molécula de la toxina. La neutralización de la toxina por la antitoxina parece obedecer a otro proceso. El complejo toxina-antitoxina formado por la neutralización *in vitro* puede desdoblarse de nuevo en sus componentes. CALMETTE fué el primero en señalar, en 1895, que a partir de una mezcla inocua de veneno de serpiente y de la correspondiente antitoxina puede recuperarse la toxina sin más que calentar a 70-80°, porque la antitoxina se desnaturaliza a esta temperatura, mientras que el veneno permanece intacto. Desde entonces se han efectuado numerosas disociaciones de este tipo aplicando métodos diversos (calor, acidulación, simple dilución de la mezcla neutra de toxina-antitoxina) y trabajando con otras toxinas, ante todo con las exotoxinas clásicas (diftérica y tetánica). Entre tales experimentos ofrecen un particular interés los efectuados por H. SCHMIDT y W. SCHOLZ, según los cuales, de los flocúlos inocuos, neutros, de toxina-antitoxina puede obtenerse un producto sumamente tóxico por la adición del formoltoxóide inocuo; el toxóide priva al flocúlo neutro de su componente de antitoxina, dejando libre el veneno. El hecho de que las combinaciones neutras toxina-antitoxina, después de un largo período de conservación no puedan ya disociarse por mera dilución por haber experimentado una

especie de consolidación secundaria, no modifica, naturalmente, la trascendencia principal de los resultados positivos. También hay que señalar que la disociación es un fenómeno que no se limita a las combinaciones toxina-antitoxina, sino que aplicando métodos análogos puede extenderse a otros complejos antígeno-anticuerpo, en los que también se observa la consolidación más o menos rápida de los complejos, es decir, la disminución de la facilidad con que se disocian, de modo que llega a ser imposible recuperar, a partir del complejo, la totalidad del antígeno (M. C. MORRIS, R. M. TAYLOR y otros). La transformación de una mezcla inocua de toxina y de antitoxina en un veneno enérgico ha merecido una atención particular, porque re-

La recuperación de la toxina de las combinaciones neutras toxina-pugnaba a un tratamiento terapéutico.

antitoxina ha llevado a que se reconozca universalmente que la toxina no se destruye al combinarse con la antitoxina. Esta aseveración puede admitirse sin reparos, pero en el sentido del problema que aquí se discute recibe una excesiva amplitud; en lo que le concierne resultaría más preciso decir que el soporte químico del efecto tóxico persiste en el complejo toxina-antitoxina, intransformado, pero en estado latente. Cabría ahora preguntarse por qué no puede actuar en tanto que la antitoxina siga combinada. J. BORDET (1939, pág. 307) opina: "Elle (l'antitoxine) se soude à la toxine, elle l'enrobe, et cet accolement suffit, si l'antitoxine intervient à dose assez élevée, à faire disparaître totalement ou pour une grande partie les propriétés nocives, dont l'antigène jouissait; en d'autres termes, le complexe obtenu se montre, soit absolument soit relativement inoffensif." Estas frases no ofrecen ninguna explicación; no hacen más que expresar lo observado experimentalmente; de ello se deduce lo siguiente (que, ante todo, no resulta especialmente extraño): que la combinación de la toxina y la antitoxina priva a la toxina de su efecto tóxico; que la combinación y la neutralización resultan procesos dinámicos idénticos, y, por último, que la antitoxina, aunque no destruya la toxina, extingue de otra forma su toxicidad. Con ello podría oponerse la reacción toxina-antitoxina a otras reacciones antígeno-anticuerpo, ya que no es necesario desdoblarse en una fase específica y en una fase inespecífica (física). Pero tal vez esta oposición no es sino aparente. El objeto del efecto tóxico es la célula viva; este efecto requiere como condición previa que el veneno esté disuelto y sea bastante difusible para que pueda ponerse en contacto con la célula. Ahora bien: sabemos que la reacción toxina-antitoxina puede transcurrir como una precipitación y que el óptimo de floculación coincide con la neutralización completa

de la toxina, y que el producto de la floculación (el floculo toxina-antitoxina) es insoluble en agua. Por consiguiente, es admisible opinar que el efecto de la toxina sobre la célula no puede producirse después de haber reaccionado con la antitoxina por este motivo puramente físico. Esta concepción estaría de acuerdo, en todo caso, con que el soporte químico del efecto tóxico se encuentra en el complejo toxina-antitoxina en igual forma que en la toxina libre, y que por ello recupera su actividad en cuanto se disocia la toxina de dicho complejo. Considerando de esta forma la neutralización de la toxina, pierde su carácter enigmático tanto la neutralización como la disociación del complejo; la antitoxina se despoja de su carácter especial y queda reducida a un anticuerpo típico.

Esta idea no se ha abierto camino hasta la fecha; lo impide, indudablemente, la fuerza de la palabra extraña que se eligió para designar el fenómeno, como sucede con frecuencia en el campo de las ciencias médico-naturales; la noción de desintoxicación que encierra la palabra "antitoxina" no se resigna fácilmente a desaparecer. Por esta razón, muchos autores persisten en no considerar idénticas la neutralización propiamente dicha y la adsorción específica de toxina y antitoxina, y afirman que la primera se produce en proporciones determinadas y la segunda en proporciones variables. J. FREUND (1932) publicó sus investigaciones con partículas de colodión con el título de *Toxin-antitoxin reactions without neutralization*, que pone de manifiesto su punto de vista dualístico. Sin embargo, el experimento en que se apoya FREUND no es convincente (véase pág. 241).

El modo de actuar las antitoxinas no permite hasta la fecha llegar a conclusiones definitivas acerca de este problema especial. En todo caso lo que es seguro es que hay dos clases de antitoxina, de las cuales una desintoxica meramente o desintoxica y se combina, mientras que la otra sólo se combina sin desintoxicar. Si se inmuniza con un formoltoxoido no tóxico, en el que parece destruido el soporte químico del efecto venenoso (véase pág. 244), se obtiene un suero inmune "antitóxico", es decir, un anticuerpo que no sólo se liga al toxoide y flocula con él, sino que suprime la toxicidad de la toxina nativa. Sin embargo, falta la contraprueba; no se ha conseguido aislar el grupo químico responsable del efecto tóxico separándolo de la molécula de la toxina, indudablemente mucho mayor, y por ello no puede saberse cómo se comportaría aislado frente a un suero antitóxico. Probablemente no reaccionaría con él, es decir, no perdería su acción tóxica al mezclarse con la "antitoxina" y carecería de efecto antigénico productor. Esta opinión no ha podido demostrarse de modo experi-

mental, pero existen puntos de apoyo para considerarla probable. Las observaciones de D. ANTONA y M. VALENSIN, de que en determinadas condiciones pueden obtenerse disoluciones de toxina tetánica de extraordinaria toxicidad y de capacidad antigénica relativamente débil, parecen hablar en favor de que el soporte químico del efecto tóxico no es fundamental para la capacidad de inmunizar; en cambio, este soporte químico es necesario para producir el estado denominado de "hipersensibilidad para la toxina", y la imposibilidad de transmitir pasivamente este estado demuestra que no se debe a la existencia de un determinado anticuerpo. Así se define, aunque todavía no con rasgos completamente acusados, la conclusión definitiva de que la antitoxina no "desintoxica" ni "neutraliza", sino que simplemente se combina con su antígeno como los restantes anticuerpos.

Aun en nuestros días se hacen algunos intentos para determinar más exactamente la naturaleza de los grupos del anticuerpo que participan en el efecto antitóxico. Se apoyan en la suposición previa de que las antitoxinas, como los restantes anticuerpos de los sueros inunes, son globulinas modificadas.

Es sabido que las seroglobulinas de especies extrañas son antígenos de elevada actividad capaces de producir en los organismos de los animales de sangre caliente (para esta finalidad se prestan particularmente los conejos) anticuerpos precipitantes. Si se considera en lugar de una globulina normal una globulina inmune, la molécula de ésta reúne las condiciones para ejercer dos funciones: la de anticuerpo y la de antígeno proteico para especies extrañas. Puede plantearse el problema de si ambas funciones están localizadas en el mismo grupo o en grupos distintos de la globulina inmune. Según nuestros conocimientos actuales acerca de los determinantes químicos de la especificidad antigénica y de la producción de los anticuerpos, apenas podemos dudar de que debe existir una independencia material entre ambas funciones aunque coexistan en la misma molécula. Hasta ahora no ha sido posible confirmar experimentalmente este aserto; hay que tener en cuenta que tales investigaciones se efectuaron en un tiempo en que no se conocía con la misma seguridad que hoy el carácter proteico de los anticuerpos.

M. EISLER fué el primero en señalar (1920) que la antitoxina diftérica de caballo floculaba, incluso después de haberse saturado con toxina diftérica, con un suero anticaballo de conejo. F. C. SMITH y J. MARRACK modificaron la sucesión en que se mezclan los componentes de la reacción, y demostraron que la antitoxina diftérica de caballo, después de haber sido precipitada por un suero anticaballo

de conejo, seguía fijando la toxina. Estos experimentos fueron corroborados por H. EAGLE en 1936, comprobando la exactitud de los resultados mediante animales testigo.

Parece, pues, justificada la conclusión de que los grupos de la molécula de antitoxina que fijan la toxina son distintos de los grupos que reaccionan con la precipitina. Sin embargo, todavía se ignora la naturaleza de uno y otro grupo, y la posición de ellos en la molécula de la globulina inmune, no habiéndose ganado mucho con haber establecido que difieren entre sí.

Por otra parte, los métodos empleados en los anteriores experimentos no están libres de objeciones. Un suero antitóxico de caballo no sólo contiene la globulina inmune, cuya identificación con la antitoxina parece indudable según el estado actual de nuestros conocimientos, sino también otras seroproteínas que no poseen la propiedad de la antitoxina; el suero de caballo normal es a su vez una mezcla de antígenos que, al inmunizar los conejos, origina o puede originar una mezcla de anticuerpos. Por consiguiente, si quiere obtenerse un "anti-anticuerpo", deben inmunizarse los conejos con globulina inmune y no con un suero total que contenga anticuerpos. Esta exigencia puede llenarse de diversos modos, el más sencillo de ellos utilizando en lugar de globulina inmune pura precipitados de polisacáridos del neumococo específicos y el suero inmune correspondiente; en tales precipitados sólo existe la globulina inmune y no perturba el componente polisacárido, ya que no es antigénico para el conejo [O. T. AVERY y W. F. GOEBEL (1933)]. Para las reacciones *in vitro* también pueden utilizarse como antígenos globulinas inmunes aisladas por la disociación de sus precipitados específicos, o bien los precipitados mismos o, por último, globulinas inmunes y normales aisladas de los sueros completos por electroforésis o mediante la ultracentrifuga.

Los autores americanos han emprendido una serie de tales investigaciones, modificándolas de diversos modos. Su resultado más importante es que los anticuerpos sólo poseen una función antigénica específica que está condicionada por su carácter de antígeno proteico con especificidad de especie, y que, por el contrario, la función anticuerpo no actúa como antígeno (H. P. TREFFERS y M. HEIDELBERGER). La acción antigénica de la globulina inmune es la misma cuando el anticuerpo es una aglutinina para los bacilos del tifus o de la difteria, una antitoxina para la toxina diftérica o tetánica, una precipitina para la ovalbúmina o el polisacárido de los neumococos, etcétera, probablemente porque los grupos de la molécula de la globulina, responsables de estas acciones, carecen de función antigénica. En

cambio se distinguen entre sí por su procedencia, los anticuerpos de caballo, conejo, gallina, etc. Esta observación priva de base a la hipótesis de P. JORDÁN que defiende el aumento autocatalítico de los anticuerpos [F. HAUROWITZ, M. VARDAR y P. SCHWERIN (1942)].

Este estado de cosas no se modifica por el hecho de que la globulina inmune de caballo pueda diferenciarse por su función antigénica, en pruebas de precipitación, de la globulina γ aislada electroforéticamente de suero normal de caballo (H. P. TREFFERS, D. H. MOORE y M. HEIDELBERGER). Hay que tener en cuenta que la globulina inmune γ de caballo posee un peso molecular de, aproximadamente, 500.000 y la γ -globulina normal de 150.000, de modo que la influencia de la procedencia es sobrepasada por otro factor; probablemente la globulina inmune γ , pesada, es un producto de polimerización de la globulina normal (6×150.000), y esto modifica la especificidad dentro del campo de la especificidad de especie, del mismo modo que se distinguen como antígenos las globulinas y albúminas del mismo suero.

M. MACHEBOEUF, M. VISCONTINI y M. RAYNAUD han emprendido investigaciones de otro tipo; se refieren a las aglutininas de las bacterias y no a las antitoxinas, pero pueden aplicarse a anticuerpos de otra denominación.

MACHEBOEUF y sus colaboradores han partido de las siguientes premisas: 1. Los anticuerpos son seroproteínas; y 2. Los anticuerpos son proteínas que poseen dos grupos con funciones fundamentalmente distintas, a saber: *a*) grupos amidas que constituyen los enlaces peptídicos de las cadenas; y *b*) diversos grupos ácidos (aminas, iminas, fenilalcoholes, etc.) que no participan en los enlaces recíprocos de los aminoácidos, por lo que cabe esperar que conserven en la molécula proteica la misma forma que en los aminoácidos aislados. Si los anticuerpos no son más que globulinas, hay que buscar en uno de estos grupos el soporte químico de la función de anticuerpo. Los autores citados se descargan inmediatamente de la mitad de la tarea citada e investigan el papel de las funciones ácidas.

Para este fin aglutinaron bacilos paratíficos A por un antisuero de caballo, utilizando la mínima cantidad de éste necesaria para conseguir una aglutinación completa. Centrifugaron las bacterias aglutinadas, las lavaron con agua destilada y las abandonaron con un exceso de mezclas de aminoácidos o con un aminoácido puro durante veinticuatro horas a 37°. Las aglutininas se mantuvieron ligadas a las bacterias, sin que pudieran disociarse de ellas por la acción de aminoácidos en gran cantidad. Los autores deducen de este experimento,

aglutinan fuertemente los hematíes de conejo, pero no los de paloma (1).

Por otra parte, no sólo el virus de la gripe aglutina los eritrocitos, ya que se observan resultados positivos al efectuar la prueba de HIRST con el virus de la vacuna (F. P. O. NAGLER), el virus de la gripe del cerdo (N. P. KUTSON, M. SIEGEL y F. MARKHAN), el virus de la enfermedad de Newcastle [F. M. BURNET (1942)], el de la parotitis epidémica [J. H. LEVENS y J. F. ENDERS (1945)], el virus de la peste de las gallinas (D. LUSH) y el de la neumonía del ratón [K. C. MILLS y A. R. DOCHEZ (1944, 1945), E. C. CURNEN y F. L. HORSEFALL (1946)].

Los hematíes aglutinables y no aglutinables por los diversos virus mencionados no coinciden con los que se aglutinan y no se aglutinan por el virus de la gripe. En general hay que contentarse con decir que todos los virus mencionados dan reacción positiva con los hematíes de gallina; este ensayo resulta suficiente para determinados fines prácticos; por ejemplo, para la demostración de la existencia de un virus, activo o inactivo, en un substrato dado, o para la obtención de sustancias vacunantes. El virus de la gripe, por ejemplo, puede purificarse y concentrarse por adsorción en hematíes de gallina y elución subsiguiente, y los preparados obtenidos de este modo ofrecen ventajas con respecto al virus crudo en su aplicación para la inmunización profiláctica [W. F. FRIEDEWALD (1944), G. K. HIRST, E. R. RICHARD y W. F. FRIEDEWALD (1944)]. El virus de la neumonía del ratón, que sólo resulta activo en forma de extractos de tejidos calentados de los ratones infectados [K. C. MILLS y A. R. DOCHEZ (1944); véase luego], no aglutina más que los hematíes de ratón y de hamster, dando resultado negativo con los de rata del algodón, cobayo, perro, oveja, gallina y hombre [E. C. CURNEN y F. L.

(1) K. LANDSTEINER (1945, pág. 5 y sig.) supone que también en este caso debe hablarse de reacciones "específicas". LANDSTEINER define la especificidad como "the disproportional action of a number of similar agents on a variety of related substrata". La elevada especificidad de los anticuerpos inmunes representaría sólo un caso extremo condicionado, porque el anticuerpo está adaptado a una sustancia a la que debe su formación. Teóricamente parece justificado concebir de este modo amplio el concepto de especificidad; pero no es adecuado para conseguir una comprensión de las relaciones selectivas. Esto se manifiesta claramente en las hemaglutininas vegetales. No puede precisarse el motivo por qué estas sustancias aglutinen determinados eritrocitos y, en cambio, no aglutinen otros, aunque este fenómeno se estudió ya en los últimos años del siglo XIX [R. KOBERT (1893)].

HORSFALL (1946)]. Este ejemplo enseña que cada virus es capaz de aglutinar una determinada serie de hematíes aglutinables, lo que también se observa con las hemaglutininas vegetales. En este sentido emprendieron investigaciones muy instructivas E. CLARK y F. P. O. NAGLER (1943), cuyos resultados se reproducen algo resumidos en la tabla 18.

TABLA 18.

Aglutinaciones de eritrocitos de diversas procedencias por algunos virus.

Procedencia de los hematíes.	Gripe B	Gripe A			Virus de Newcastle.	Vacuna.
	«Lee»	«W. S.»	«Melbourne.»	«Swine»		
Hombre.....	+++	+++	+++	-	++	+
Oveja.....	+++	-	++	-	+++	±-
Vaca.....	+++	-	-	-	-	+
Cerdo.....	+++	-	-	-	-	+
Caballo.....	++-	-	-	±-	-	-
Gato.....	+++	-	-	-	-	+
Hurón.....	++	++	++	-	-	+
Conejo.....	++	++	++	++	+	±-
Cobayo.....	+++	++	++	-	+++	±-
Ratón.....	++	++	++	-	+++	+
Gallina.....	+++	+++	+++	+++	+++	+++±
Pato.....	++	++	++	++	++	++
Rana.....	+++	+++	+++	+++	+++	-
	+++	+++	+++	+++	+++	-

Se observa: 1), que las estirpes de virus de la gripe difieren entre sí; y no solamente las de tipo B de las de tipo A, sino que tampoco se comportan de modo idéntico las estirpes seleccionadas del tipo A; 2), que el virus de Newcastle difiere de las estirpes de virus de la gripe; 3), que todas las estirpes consideradas en la tabla aglutinan los hematíes de gallina, aunque esta reacción no es constante en el virus de la vacuna. Según las investigaciones de CLARK y de NAGLER, no se aglutinan intensamente por este virus sino los hematíes del 50 por 100 de las gallinas, sin que jueguen ningún papel la edad, el sexo y la raza. Los eritrocitos de embrión de pollo, que son extraordinariamente sensibles para el virus de la gripe, no suelen sufrir la influencia del virus de la vacuna. Parece ser que la capacidad de ser aglutinados por este virus no se manifiesta sino al cabo de dos a cuatro semanas después de haber salido los pollos del cascarón, aunque esto no pueda afirmarse con seguridad por la posible influencia de factores hereditarios.

El fenómeno de Hirst, por consiguiente, no es "específico" para

el virus de la gripe ni para los eritrocitos de gallina. En los primeros experimentos se observó que el virus de la gripe aglutina los hemáticos nucleados de gallina y de embriones de pollo, y posteriormente se pudo apreciar que también aglutina los eritrocitos nucleados de aves e incluso los de animales de sangre fría; parece, pues, que este fenómeno ofrece un camino apropiado para determinar exactamente la sustancia de los eritrocitos responsable de la fijación reversible del virus. A. S. PARODI, S. LAJMANOVICH y N. MITTELMAN obtuvieron con este propósito, a partir de eritrocitos de gallina tratados por saponinas (según un método de A. L. DOUNCE y TIEN HO LAN), suspensiones de núcleos prácticamente exentos de estroma, pudiendo comprobar que los núcleos se comportan en las pruebas de adsorción seguida de elución exactamente como los eritrocitos intactos de gallina. Pero con ello no se consigue un avance importante, ya que también presentan el fenómeno de HIRST algunos eritrocitos sin núcleo. Por el mismo motivo tampoco posee validez general la demostración de que en los núcleos de los eritrocitos de gallina existen histonas y protaminas fuertemente aglutinantes (S. LAJMANOVICH y N. MITTELMAN). Hay que tener en cuenta que no se trata de aclarar el fenómeno de la aglutinación de los eritrocitos, sino el de la aglutinación por la adsorción de diversos virus.

G. K. HIRST (1942) consiguió, por el contrario, establecer el importante hecho experimental de que *los estromas de los eritrocitos de gallina fijan el virus de la gripe* y pueden cederlo de nuevo, y que las curvas de adsorción obtenidas con los estromas coinciden con las obtenidas con los eritrocitos completos; la única diferencia que se observa es que la cantidad de sustancia necesaria para una buena adsorción resulta mucho más alta con los estromas que cuando se utiliza la célula intacta. La sustancia contenida en los estromas es, hasta cierto grado, termoestable, ya que soporta una calefacción de media hora a 35° y una calefacción de cinco minutos a 100°; únicamente que en el segundo caso la elución se retrasa considerablemente con respecto a los estromas no calentados. Fundándose en esta resistencia para las temperaturas elevadas considera HIRST poco probable que la sustancia adsorbente sea una proteína. En cambio, la "hemaglutinina de la gripe" pierde su actividad al ser tratada por agentes que desnaturalizan las proteínas (calefacción, formol), por lo que parece justificado atribuirle naturaleza proteica. HIRST no se atreve a afirmar que esta "aglutinina" sea idéntica al virus de la gripe; en primer lugar, porque no es posible inactivar la aglutinina sin perder simultáneamente la capacidad de infección del virus; según investi-

gaciones posteriores de M. A. LAUFFER y G. L. MILLER (véase luego), no queda ninguna duda de que el virus mismo como tal, tanto en estado infeccioso como no siéndolo, es el que se fija a los eritrocitos y provoca su floculación. En todo caso, se trata de un proceso notable si se tiene en cuenta que los elementos del virus de la gripe, según medidas de M. A. LAUFFER y W. M. STANLEY, poseen un diámetro de unos 100 μ . HIRST propone, como explicación más sencilla, la hipótesis de que las partículas aglutinantes poseen dos o tres valencias, a las que corresponden, por parte de los eritrocitos, receptores múltiples; de este modo se produciría una red de floculos de células. Esta hipótesis no es sino una aplicación de la teoría reticular que carece de pruebas precisas; la circunstancia de que la inaglutinabilidad de las células resulta proporcional a la cantidad de virus adsorbida no puede considerarse como demostración de la formación de una "red célula-virus".

La representación de la estructura interior de los agregados celulares y la de fuerzas que los conservan durante algún tiempo poseen una significación secundaria. En el fondo del problema se encuentra el hecho de que el enlace de los virus a los hematíes se produce, a temperatura adecuada, rápidamente, lo que parece indicar que existe una fuerte afinidad entre los componentes de la reacción, a pesar de que el complejo producido se desdobra pronto de nuevo y de modo espontáneo; en segundo lugar, el virus disociado conserva su capacidad aglutinante, mientras que las células que han cedido el virus resultan ya inaglutinables, es decir, incapaces de fijar de nuevo el virus. Siguiendo la terminología serológica pudiera definirse la modificación que sufren los eritrocitos, como la destrucción de los receptores de las células [véase G. K. HIRST (1942 b, pág. 207)], con lo que de hecho no se dice nada nuevo. Quizás conviniera proyectar otra serie de experimentos con el fin de observar, por ejemplo, si los eritrocitos inaglutinables por la adsorción del virus de la gripe pueden aglutinarse por otros virus o por las aglutininas inmunes (antisuero); de este modo podría averiguarse si estas aglutinaciones son análogas a las funciones antigénicas específicas de especie o si se asemejan al efecto del tanino. Al autor de este libro no han llegado noticias de que se hayan efectuado experimentos así orientados.

No sólo HIRST, sino también otros autores utilizan en sus experimentos cultivos de virus desarrollados en el líquido alantoideo del embrión de pollo. Con respecto a esto ofrece interés el aislamiento por centrifugación efectuado por C. A. KNIGHT (1944) en el líquido alantoideo *normal* de un producto macromolecular en las cantidades

óptimas de 0,02 mg./ml. (en el día catorce de la incubación). Este producto consta de una proteína, una fracción lipoidea y otra de hidrato de carbono; posee, por consiguiente, una composición análoga al virus de la gripe purificado. Se comporta como antígeno y suministra al inmunizar un antisuero que no sólo reacciona serológicamente con él mismo, sino también con los virus A y B de la gripe (obtenidos del líquido alantoideo); el antisuero impide concretamente la aglutinación de los eritrocitos por el virus A o B, pero no posee efecto neutralizante. El virus de la gripe se distingue de la sustancia del líquido alantoideo normal por su capacidad de infectar, por su efecto aglutinante sobre los hematíes y por sus propiedades físicas; el virus posee otro punto isoeléctrico, y sus elementos (según determinaciones en el microscopio electrónico) poseen un diámetro de $115 \mu \pm 15$ por 100 (M. A. LAUFFER y W. M. STANLEY), mientras que la partícula de la sustancia normal posee un diámetro de únicamente 40μ (C. A. KNIGHT). No resulta clara la relación que pueda tener este descubrimiento de C. A. KNIGHT con el fenómeno de G. K. HIRST; únicamente debe mencionarse que G. L. MILLER, M. A. LAUFFER y W. M. STANLEY han podido desdoblar, por electroforesis, los preparados crudos de las estirpes de la gripe PR 8 en dos componentes: el primero (80-90 por 100) resultó ser el virus activo, y el otro (10-20 por 100), una impureza que parecía idéntica al líquido alantoideo normal de KNIGHT, o al menos muy semejante. En todo caso, en un substrato homogéneo para el examen óptico (según las dimensiones) y electroforético, cuya partícula elemental posee un diámetro aproximado de 100μ , parecen radicar las tres propiedades fundamentales siguientes: la capacidad de infectar el embrión de gallina, la capacidad de infectar el ratón blanco y la acción aglutinante sobre los hematíes (M. A. LAUFFER y G. L. MULLER). En reacción ácida se destruye más rápidamente que en medio alcalino la capacidad de infectar y de aglutinar (G. L. MULLER). HIRST (1942 b) mismo observó que en condiciones convenientes puede suprimirse o reducirse la capacidad de infectar, conservando, no obstante, la actividad aglutinante (G. L. MULLER).

Con los datos de C. A. KNIGHT tal vez pueda relacionarse la observación efectuada por E. W. SHRIGLEY (1945) de que determinadas estirpes de *Staphylococcus aureus* se aglutinan si se mezclan sus cultivos en caldo con líquido alantoideo normal o infectado por el virus de la gripe. De modo análogo se comportan los filtrados por bujías Berkefeld de papillas de pulmón de ratón normal o infectado por el virus de la gripe. Con otras bacterias no ha podido conseguirse

aglutinación; por el contrario, los estafilococos sensibles también se agrupan por el calor después de muertos.

Un lugar especial corresponde en muchos sentidos a la hemaglutinación por el virus de la neumonía del ratón, descubierta por K. C. MILLS y A. R. DOCHEZ (1944) y estudiada con más detalle por estos autores [MILLS y DOCHEZ (1945)] y por E. C. CURNEN y F. L. HORSFALL (1946). Este virus no aglutina, como se mencionó en la página 252, sino los hematíes de ratón y de hamster; pero en los pulmones infectados de los animales de estas especies se encuentra en forma inactiva, y para transformarlo en la activa hay que calentar a una temperatura relativamente alta (70-80°) las suspensiones obtenidas desmenuzando los órganos. La inactividad de las suspensiones de pulmones en estado nativo (no calentadas) se explica suponiendo que en ellas el virus no se encuentra libre, sino combinado en forma estable con una sustancia que existe en el tejido pulmonar de estas especies animales receptoras del germen; este enlace se conserva al desmenuzar el tejido pulmonar. Al calentar se destruye dicha sustancia y el virus pierde su capacidad de infectar, pero conserva sus propiedades inmunológicas, en particular su afinidad con la sustancia de la que acaba de disociarse. Se supone que esta sustancia también existe en los hematíes de las especies susceptibles de infección (ratón, hamster), lo que explicaría el mecanismo de la hemaglutinación. Según las investigaciones de CURNEN y HORSFALL, no puede dudarse de que la sustancia que actúa aglutinando es el elemento del virus mismo. Según esta hipótesis cabría esperar que las partículas elementales del complejo inactivo aislado de la papilla de los pulmones infectados han de ser mayores que los elementos del virus libre y activo obtenido por destrucción del complejo, es decir, por destrucción de la sustancia tisular combinada al virus. Se ha confirmado esta suposición; en efecto, las partículas del extracto sin calentar, de tamaño desigual, poseen un diámetro que oscila entre 100 y 150 μ [F. L. HORSFALL y R. G. HAHN (1940)]; en cambio, los elementos del virus libre resultan de tamaño homogéneo y su diámetro es solamente de 30 μ (CURNEN y HORSFALL).

La consecuencia inmediata del descubrimiento de HIRST fué la suposición de que *todas* las especies de virus poseían efecto hemaglutinante, y esta propiedad pensó utilizarse como criterio para caracterizar, sin excepción, a todas las especies de virus; pero del mismo modo que, como antes se dijo, el efecto aglutinante de cada virus se limita a los hematíes de determinadas especies, tampoco se puede hablar de una correspondencia biológico-específica; se puede a lo más

considerar esto como un fenómeno condicionado de modo físico o físico-químico. Pero también en este sentido se carece hasta la fecha de puntos de vista generales; ante todo, porque hasta ahora no se ha trabajado sino con virus patógenos para especies animales, pero no con virus patógenos de plantas, muy semejantes a los primeros en su comportamiento físico. Por último, las rickettsias también actúan como aglutinantes e incluso, según ha podido observar L. ROSENTHAL (1943), ciertas bacterias (determinadas estirpes de *Escherichia coli*) agrupan también los hematíes y otras células de origen vegetal y animal. La hemaglutinación por el *Escherichia coli* se asemeja en algunas particularidades notables a la que provoca el virus de la gripe: se produce *inmediatamente* que se mezclan en un portaobjetos los hematíes con las bacterias cultivadas en agar; estas bacterias también aglutinan los estromas; y asimismo, la sustancia aglutinable resiste los agentes que desnaturalizan las proteínas. Según los datos de ROSENTHAL, debe deducirse que lo que actúa es el soma bacteriano como tal y no sustancias cedidas por él, ya que carecen absolutamente de efecto los filtrados de cultivos en caldo jóvenes o viejos; se recuerda que del mismo modo también resulta imposible separar la sustancia hemaglutinante del virus de la gripe de los elementos mismos del virus. ROSENTHAL supone que la acción del *Escherichia coli* sobre distintas células recuerda extraordinariamente a la de las aglutininas vegetales, semejanza que también se extiende a la carencia de especificidad (véase antes). En todo caso hay que proseguir y ampliar estas investigaciones de ROSENTHAL, que no sólo resultan interesantes en su posible relación con el mecanismo del fenómeno de HIRST, sino también con respecto a otras cuestiones inmunológicas (teoría reticular de la aglutinación).

El descubrimiento de G. K. HIRST, como expresa su mismo autor [HIRST (1941)], se debe a una casualidad, ya que observó por primera vez la aglutinación una vez que al abrir huevos de gallina infectados con el virus de la gripe se lesionó el mayor vaso sanguíneo del embrión. En muchos casos, sucesos fortuitos de este tipo dan ocasión a valiosas observaciones, cuya interpretación teórica se consigue con mayor o menor dificultad a la luz de los sistemas en curso; en otros casos ofrecen un punto de partida para nuevas concepciones; de lo que en la investigación en inmunidad se encuentran varios ejemplos; lo que resulte del descubrimiento de HIRST nos lo dirán ulteriores investigaciones.

BIBLIOGRAFIA

- ABDBEHALDEN, E. (1903/1905), Z. phys. Chemie 37, 405; 44, 17.
- ABRAMSON, H. A. (1935), Nature 135, 995.
- ABRAMSON, H. A., W. C. BOYD, S. B. HOOKER, P. M. PORTER and M. A. PURNELL (1945), J. BACT. (Am.) 50, 15.
- ABRAMSON, H. A., L. S. MOYER and M. H. GORIN (1942), Electrophoresis of proteins and the Chemistry of cell surfaces, Nueva York.
- ADAM, N. K. (1937), Perspect. in biochem., S. 81.
- ADAMS (1942), J. exp. Med. (Am.) 76, 175.
- ADANT, M. (1930 a), Arch. Int. Med. Exp. 6, 29.
- (1930 b), C. r. Soc. Biol. Paris 103, 541.
- ALEXANDER, J. (1931), Protoplasma 14, 296.
- ALMON, L. and W. D. STEVALL (1936), J. Immunol. (Am.) 31, 260.
- ANDERSON, C. G. (1938), An introduction to bacteriol. chemistry, Edinburg.
- ANDERSON, T. F. and W. M. STANLEY (1941), J. biol. Chem. (Am.) 139, 339.
- ANDO, K., K. KARAUCHI and H. NISHIMURA (1930), J. Immunol. (Am.) 18, 223.
- ANDO, K. K. MANAKO and S. TAKATA (1938), J. Immunol. (Am.) 34, 295, 303.
- ANDREJEW (1909), Arb. a. d. Kais. Ges. Amt 30.
- ARNOLD, W. (1934), Z. Immunsfch. 82, 154.
- ASTBURY, W. T. (1943), Advances in enzymology (Am.) 3, 63.
- AVERY, O. T. and W. F. GOEBEL (1929), J. exp. Med. (Am.) 50, 533, 521.
- — (1931), J. exp. Med. (Am.) 54, 437.
- — (1933), J. exp. Med. (Am.) 58, 731.
- AVERY, O. T., W. F. GOEBEL and F. H. BABERS (1932), J. exp. Med. (Am.) 55, 769.
- AVERY, O. T. and M. HEIDELBERGER (1925), J. exp. Med. (Am.) 42, 367.
- BÁRÁNY, E. (1935), acta path. scand. 12, 274.
- BATEMAN, J. B., H. E. CALKINS and L. A. CHAMBERS (1941), J. Immunol. (Am.) 41, 321.
- BAUER und ENGEL (1912), Biochem. Z. 42, 399.
- BAUER, J. and N. HUDSON (1930), J. prevent. Med. (Am.) 4, 177.
- BAWDEN, F. C. and A. KLECZKOWSKI (1942), Brit. J. exp. Path. 23, 178.
- BAWDEN, F. C. and N. W. PIRIE (1938), Brit. J. exp. Path. 19, 251.
- — (1942), Brit. J. exp. Path. 23, 314.
- BEGER, H. (1924), Zentralbl. f. Bakt., I. Orig. 91, 519.

- BOIVIN, A. et L. MESROBEANU (1938 c), *C. r. Soc. Biol. Paris* 128, 835.
BOIVIN, A., L. MESROBEANU et J. MESROBEANU (1933), *C. r. Soc. Biol. Paris* 114, 307.
BOIVIN, A., L. MESROBEANU et NESTORESCU (1934), *C. r. Soc. Biol. Paris* 115, 306.
BOOR, A. K. and L. HEKTOEN (1930), *J. inf. diseases. (Am.)* 46, 1.
BORDET, J. (1898), *Ann. Inst. Pasteur. Paris* 12, 688.
— (1899), *Ann. Inst. Pasteur. Paris* 13, 225.
— (1920), *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*, Paris, Masson.
— (1939), *Traité de l'immunité*, 2. edit., Paris, Masson.
BOYD, W. C. (1941), *J. exp. Med. (Am.)* 74, 369.
— (1942), *J. exp. Med. (Am.)* 75, 407.
— (1943), *Fundamentals of Immunology*, Nueva York.
— (1946), *J. exp. Med. (Am.)* 83, 221.
BOYD, W. C. and J. BEHNKE (1944), *Science (Am.)* 100, 13.
BOYD, W. C. and H. BERNARD (1937), *J. Immunol. (Am.)* 33, 111.
BOYD, W. C., J. B. CONN, D. C. GREGG, G. B. KISTIAKOWSKY and R. M. ROBERTS (1941), *J. biol. Chem. (Am.)* 139, 787.
BOYD, W. C. and S. B. HOOKER (1934 a), *J. biol. Chem. (Am.)* 104, 329.
— (1934 b), *J. gener. Physiol.* 17, 341.
— (1935), *J. biol. Chem. (Am.)* 110, 457.
— (1936), *J. Immunol. (Am.)* 30, 33.
— (1938), *Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 39, 491.
— (1939), *J. gen. Physiol. (Am.)* 22, 281.
BOYD, W. C. and M. A. PURNELL (1944), *J. exp. Med. (Am.)* 80, 289.
BOYD, W. C. and E. R. WARSHAWER (1946), *J. Immunol. (Am.)* 52, 97.
BOYDEN, A. A. (1926), *Biol. Bull.* 50, 73.
BRAND, E., B. KASSELL and L. J. SAIDEL (1944), *J. clin. Investig. (Am.)* 23, 437.
BRANDT, R. und H. GOLDHAMMER (1936), *Klin. Wschr.*, S. 1875.
BREINL, F. und F. HAUROWITZ (1930), *Z. physiol. Chem.* 192, 45.
— (1932), *Z. Immunitätsföschg.* 77, 176.
BRIEGER, B. und C. FRÄNKEL (1890), *Berl. Klin. Wschr. No.* 11/12.
BRODIE, B. B., M. M. FRIEDMAN and L. R. FERRARO (1941), *J. biol. Chem. (Am.)* 140, XXI.
BROHULT, S. (1937), *Nature (Brit.)* 140, 805.
BROHULT, S. and S. CLAESON (1939), *Nature (Brit.)* 144, 111.
BRONFENBRENNER, J., D. M. HETTLER and J. O. EAGLE (1931), *Science (Am.)* 73, 455.
BROWN, A. M. (1935), *Brit. J. exp. Path.* 16, 554.
BRUNIUS, F. E. (1936), *Chemical studies on the true Forssman-Hapten*, Stockholm.
BRUYNOCHE, G. (1935), *C. r. Soc. Biol. Paris* 118, 1260.
BRUYNOCHE, G. et P. VASSILIADIS (1930), *C. r. Soc. Biol. Paris* 103, 543.
BUCHNER, H. (1890), *Zentralbl. f. Bakt.* 8, 321.
— (1893), *Münch. med. Wschr. No.* 24/25.
BULLOCH, W. (1901), *Zentralbl. f. Bakt.*, I 29, 724.
BUNTING, C. H. (1925), *Wisconsin med. J.* 24, 305.
BURNET, F. M. (1931 a), *J. Path. a. Mact. (Brit.)* 34, 471.

- BURNET, F. M. (1931 b), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 34, 759.
 — (1941), *Monographs Hall Institute No. 1*, Melbourne.
 — (1942), *Austral. J. exp. Biol. a. Med. Science* 20, 81.
- GANNON, P. R. (1932), *Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 29, 517.
 — (1944), *J. Dietet. (Am.)* 22, 77.
 — (1945), *J. Allergy (Am.)* 16, 78.
- CANNON, P. R., W. E. CHASE and R. W. WISSLER (1943), *J. Immunol. (Am.)* 47, 133.
- CANNON, P. R., E. M. HUMPHREYS, R. W. WISSLER and L. E. FRAZIER (1944 a), *J. clin. Investig. (Am.)* 23, 601.
- CANNON, P. R., R. W. WISSLER, R. L. WOOLDRIDGE and E. P. BENDITT (1944 b), *Annals, Surg. (Am.)* 120, 514.
- CARREL, A. and R. INGEBRIGTSON (1912), *J. exp. Med. (Am.)* 15, 287.
- CASPER, W. (1928), *Z. Hyg.* 109, 170.
- CASTELLANI, A. (1902), *Z. Hyg.* 20, 1.
- CAULFIELD, A. H. W., M. H. BROWN and E. T. WATERS (1936), *J. Allergy (Am.)* 7, 451.
- CHAMBERS, L. A., J. B. BATEMAN and H. E. CALKINS (1941), *J. Immunol. (Am.)* 40, 483.
- CHARGAFF, E., M. ZIFF and S. S. COHEN (1940), *J. biol. Chem. (Am.)* 136, 257.
- CHIBNALL, A. C. (1942), *Proc. Roy. Soc. (London), B.* 131, 136.
- CHOW, B. F. and W. F. GOEBEL (1935), *J. exp. Med. (Am.)* 62, 179.
- CHOW, B. F. and H. WU (1937), *Chines. J. Physiol.* 11, 183.
- CLARK, E. and F. P. O. NAGLER (1943), *Austral. J. exp. Biol. a. Med. Science* 21, 103.
- CLUTTON, R. F., C. R. HARRINGTON and M. E. YUILL (1938), *Bioch. J.* 32, 1111.
 — — (1940), *J. chim. Soc.*, S. 119.
- COCA, A. F. and KOSAKAI (1920), *J. Immunol. (Am.)* 5, 297.
- COGHILL, R. D., N. FELL, M. CREIGHTON and G. BROWN (1940), *J. Immunol. (Am.)* 39, 207.
- COHEN, S. S. and E. CHARGAFF (1940), *J. biol. Chem. (Am.)* 136, 243.
- COHN, E. J. (1941), *Chem. Reviews (Am.)* 28, 395.
 — (1945), *Science (Am.)* 101, 51.
- COHN, E. J., T. L. McMEERIN, J. L. ONCLEY, J. M. NEWELL and W. L. HUGHES (1940), *J. Am. Chem. Soc.* 62, 3386.
- COHN, E. J., J. L. ONCLEY, L. E. STRONG, W. L. HUGHES and S. H. ARMSTRONG (1944), *J. clin. Investig. (Am.)* 23, número 4.
- COLE, R. I. (1904), *Z. Hyg.*, 46, 371.
- COX, W. M. and A. J. MUELLER (1944), *J. clin. Investig. (Am.)*, 23, 875.
- CRAIGIE, J. and K. F. BRANDON (1936), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 43, 233.
- CROMMELL, H. E. (1932), *J. Immunol. (Am.)* 7, 461.
- CROWELL, M. J. (1926), *J. Bact. (Am.)* 11, 65.
- CROWFOOT, D. (1941), *Chem. Reviews (Am.)* 28, 215.
- CUMLEY, R. W. and M. R. IRWIN (1943), *J. Immunol. (Am.)* 46, 63.
- CURNEN, E. C. and F. L. HORSFALL (1940), *J. exp. Med. (Am.)* 83, 105.

- DAKIN, H. D. and H. H. DALE (1919), *Bioch. J. (Brit.)* 13, 248.
- DALE, H. (1913), *J. Pharmacol. (Brit.)* 4, 177.
- DALE, H. and P. HARTLEY (1916), *Bioch. J. (Brit.)* 10, 408.
- DANIELLI, J. F., M. DANIELLI and J. R. MARRACK (1938), *Brit. J. exp. Path.* 19, 393.
- DAVIS, B. D., A. HOLLÄNDER and J. P. GREENSTEIN (1942), *J. biol. Chem. (Am.)* 146, 663.
- DEAN, H. R. (1927), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 30, 675.
- DEAN, H. R. and R. A. WEBB (1926), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 29, 473.
- DEUTSCH, V. (1930), *C. r. Acad. Scienc. Paris* 208, 603.
- DEUTSCH, V. et I. LOMINSKI (1937), *Bull. Acad. Med. Paris* 118, 220.
- Direct photography of antigens and antibodies (1942), *Lancet* 242, 177.
- DIRSCHERL, W. (1930), *Weich. Ergebn. d. Hyg.* 22, 347.
- DOERR, R. (1906), *Wien. Klin. Wschr. Nr.* 41.
- (1907 a), *Das Dysenterietoxin*, Jena.
- (1907 b), *Wien. Klin. Wschr.* 20.
- (1907 c), *Bioch. Z.* 7, 128.
- (1922), *Weich. Ergebn.* 5, 138.
- (1925), XIV. Kongr. d. Dtsch. Derm. Ges., Dresden.
- (1929 a), *Allergische Phänomene in BETHE's Handb. d. norm. u. path. Physiol.* 13, 650.
- (1929 b), *Allergie und Anaphylaxie, Handb. path. Mikroorg.* 3. Aufl., I, 759—1009.
- (1937), *Z. Hyg.* 119, 635.
- (1939), *Handb. d. Virusforsch.*, S. 690 ff.
- (1941 a), *Lehre v. d. Inf.-Krankh., Lehrb. d. inneren Med.*, 5. Aufl., Berlin.
- (1941 b), *Arch. f. Virusforsch.*, 2, 87.
- (1944), *Die Natur der Virusarten, Handb. d. Virusforsch.*, 1. Ergänz.-Bd., S. 1—86.
- DOERR, R. und W. BERGER (1922 a), *Z. Hyg.* 96, 191.
- — (1922 b), *Z. Hyg.* 96, 258.
- — (1922 c), *Klin. Wschr.*, S. 949; *Biochem. Z.* 131, 13.
- DOERR, R. und H. FRIEDLI (1925), XIV. Kongr. Dtsch. dermat. Ges. in Dresden.
- DOERR, R. und P. GIRARD (1933), *Z. Immunitfsg.* 81, 132.
- DOERR, R. und C. HALLAUER (1926), *Z. Immunitfsg.* 47, 291.
- — (1927), *Z. Immunitfsg.* 51, 463.
- DOERR, R. und J. MOLODOVAN (1910), *Z. Immunitfsg.* 5, 125.
- DOERR, R. und R. PICK (1913), *Bioch. Z.* 50, 129.
- — (1914), *Bioch. Z.* 60, 257.
- DOERR, R. und V. RUSS (1909), *Z. Immunitfsg.* 3, 181.
- DOERR, R. und SEINDERBERG (1931), *Z. Immunitfsg.* 71, 242.
- — (1936), *Z. Hyg.* 119, 72.
- DOLE, V. P. (1944), *J. clin. Investig. (Am.)* 23, 708.
- DOUNCE, A. L. and TIEN HO LAN (1943), *Science (Am.)* 97, 584.
- DREYER, G. und SCHRÖDER (1909), cit. nach Th. Madsen, *Technik. d. Immunitfsg.* 2, 33.
- DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et N. KOSSOVITCH (1940), *Anni. Inst. Past. Paris* 65, 63.

- DUNCAN, J. T. (1932 a), *Brit. J. exp. Path.* 13, 498.
 — (1932 b), *Brit. J. exp. Path.* 13, 489.
 — (1934), *Brit. J. exp. Path.* 15, 23.
 — (1937), *Brit. J. exp. Path.* 18, 108.
 v. DUNGERN E. (1903), *Die Antikörper*, Jena.
 DURHAM, H. E. (1901), *J. exp. Med. (Am.)* 5, 353.
- EAGLE, H. (1930), *J. Immunol. (Am.)* 18, 393.
 — (1932 a), *J. exp. Med. (Am.)* 55, 667.
 — (1932 b), *J. Immunol. (Am.)* 23, 153.
 — (1935 a), *J. Immunol. (Am.)* 29, 467.
 — (1935 b), *J. Immunol. (Am.)* 29, 485.
 — (1936 a), *J. Immunol. (Am.)* 30, 339.
 — (1936 b), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 34, 39.
 — (1938), *J. exp. Med. (Am.)* 67, 405.
 EAGLE, H., D. E. SMITH and P. VICKERS (1936), *J. exp. Med. (Am.)* 63, 617.
 EATON, M. D. (1936 a), *J. Bact. (Am.)* 31, 347, 367.
 — (1936 b), *Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 35, 16.
 — (1937 a), *J. Bact. (Am.)* 34, 139.
 — (1937 b), *J. Immunol. (Am.)* 33, 419.
 — (1938), *Bact. Reviews* 2, 3.
 EATON, M. D. and A. GRONAU (1938), *J. Bact. (Am.)* 36, 423.
 ECKER, E. E. and L. PILLEMER (1940), *J. exp. Med. (Am.)* 71, 585.
 EDSALL, J. T. (1942), *Advances in Colloid Science* 1, 269.
 EHRICH, W. E. and T. N. HARRIS (1942), *J. exp. Med. (Am.)* 76, 335.
 — (1945), *Science (Am.)* 101, 28.
 EHRlich, P. and J. MÖRGENROTH (1904), *Handb. d. path. Mikroorg.*, 1. Aufl., IV 2, 430.
 EISENBERG, PH. und R. VOLK (1902), *Z. Hyg.* 40, 155.
 v. EISLER, M. (1920), *Zentralbl. f. Bakt., I. Orig.* 84, 46.
 v. EISLER, M. und E. LÖWENSTEIN (1912), *Zentralbl. f. Bakt., I. Orig.* 61, 271.
 ENDERS, J. (1944), *J. clin. Investig. (Am.)* 23, 510.
 ENDERS, J. and CH. WU (1934), *J. exp. Med. (Am.)* 60, 127.
 ERICKSON, J. O. and HANS NEURATH (1943 a), *J. exp. Med. (Am.)* 78, 1.
 — (1943 b), *Science (Am.)* 98, 284.
 ERIKSON-QUENSEL, J. B. and THE SVEDBERG (1936), *Biol. Bull.* 71, 498.
 ERLÉNMEYER, H. und E. BERGER (1932 a), *Bioch. Z.* 252, 22.
 — (1932 b), *Bioch. Z.* 255, 429.
 — (1933 b), *Helvetica Chimica Acta* 16, 733.
 — (1934), *Arch. exp. Path. u. Pharm.* 177, 116.
 v. EULER, H. und E. BRUNIUS (1930), *Z. Immunitätslehre* 68, 124.
- FABER, KNUD (1890), *Berl. Klin. Wschr.*, S. 717.
 FANCONI, G. (1923), *Bioch. Z.* 139, 328.
 FELIX, A. and PITT (1935), *J. hyg. (Brit.)* 35, 428.
 FELIX, K. (1938), *Chemie und Physiologie des Eiweisses*, Dresden und Leipzig.
 FELL, N., K. G. STERN and K. D. COGHILL (1940), *J. Immunol. (Am.)* 39, 223.

- FELTON, L. D. (1925), *J. inf. diseases. (Am.)* 37, 199.
— (1931), *J. Immunol. (Am.)* 21, 341.
— (1932), *J. Immunol. (Am.)* 22, 453.
FELTON, L. D. and G. H. BAILEY (1926 a), *J. inf. diseases. (Am.)* 38, 145.
— — (1926 b), *J. Immunol. (Am.)* 11, 197.
FIERZ-DAVID, H. E. W. JADASSOHN und W. F. ZÜRCHER (1937), *Helvetica Chimica Acta* 20, 16.
FIERZ-DAVID, H. E., W. JADASSOHN und E. PFANNER (1939), *Helvetica Chimica Acta* 22, 1456.
FINK, R. M., T. ENNS, C. P. KIMBALL, H. E. SILBERSTEIN, W. F. BALE, S. C. MADDEN and G. H. WHIPPLE (1944), *J. exp. Med. (Am.)* 80, 455.
FISCHER, A. (1922), *J. exp. Med. (Am.)* 35, 661.
FOLLENSBY, E. M. and S. B. HOOKER (1939), *J. Immunol. (Am.)* 37, 367.
FORD, W. W. (1906), *J. inf. diseases. (Am.)* 3, 191.
— (1907), *J. inf. diseases. (Am.)* 4, 541.
FORSSMAN, J. (1911), *Bioch. Z.* 37, 78.
FREUND, J. (1929), *Proc. exp. Biol. a Med. (Am.)* 26, 876.
— (1930/31), *Proc. exp. Biol. a Med.* 28 I, 64.
— (1931), *Proc. exp. Biol. a Med. (Am.)* 28 II, 1010.
— (1932), *J. exp. Med. (Am.)* 55, 181.
FRIEDBERGER, E. (1902), *Festschrift f. von Leyden* 2, 435.
— (1912), *Die Anaphylaxie in Fortschritte der med. Klinik* 2.
FRIEDBERGER, E. und COLLIER (1919), *Z. Immunitätschg.* 28, 237.
FRIEDBERGER, E. und DORNER (1905), *Zentralbl. f. Bakt., I. Orig.* 38, 544.
FRIEDBERGER, E. und JARRE (1920), *Z. Immunitätschg.* 30, 351.
FRIEDBERGER, E. und G. MEISSNER (1923), *Z. Immunitätschg.* 36, 233.
FRIEDWALD, W. F. (1944), *J. exp. Med. (Am.)* 80, 477.
FURTH, J. (1925), *J. Immunol. (Am.)* 10, 777.
- GALLUT, J. (1944), *Ann. Inst. Past. Paris* 69, 123.
GALLUT, J. et P. GRABAR (1944), *Ann. Inst. Past. Paris* 69, 250.
GARD, SVEN (1943), *Arch. f. Virusföschg.* 3, 1.
GILDEMEISTER, E. und E. HAAGEN (1940), *Detsch. med. Wschr.* 66, 878.
GIRARD, G. (1944), *Ann. Inst. Past. Paris* 69, 273.
GLENNY, A. T., G. A. H. BUTTLE and M. F. STEVENS (1931), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 34 I, 267.
GLENNY, A. T. and B. E. HOPKINS (1923), *Brit. J. exp. Path.* 4, 283.
GLENNY, A. T. and C. C. OKELL (1924), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 27, 187.
GLENNY, A. T. and H. J. SÜDMERSEN (1921), *J. of Hyg. (Brit.)* 20, 176.
GODDARD, D. R. and L. MICHAELIS (1934), *J. biol. Chem. (Am.)* 106, 60.
GOEBEL, W. F. and O. T. AVERY (1931), *J. exp. Med. (Am.)* 54, 431.
GOEBEL, W. F., O. T. AVERY and F. H. BABERS (1934), *J. exp. Med. (Am.)* 60, 599.
GOEBEL, W. F., F. H. BABERS and O. T. AVERY (1934), *J. exp. Med. (Am.)* 60, 85.
GOEBEL, W. F., SHEDLOVSKY, LAVIN und ADAMS (1943), *J. biol. Chem. (Am.)* 148, 1; *J. exp. Med. (Am.)* 77, 435.
GOLDIE, H. et G. SANDOR (1938), *C. r. Soc. Biol. Paris* 129, 391.

- GONZÁLEZ, P. et M. ARMANGUÉ (1931). C. r. Soc. Biol. Paris 105, 1006.
 GOODNER, KENNETH (1939). 3. Intern. Congr. Microb., Nueva York, S. 818.
 — (1941), Science (Am.) 94, 241.
 GOODNER and F. L. HORSFALL (1937). J. exp. Med. (Am.) 66, 437.
 GRABAR, P. (1938). C. r. Ac. Scienc. Paris 207, 807.
 GRABAR P. et J. OUDIN (1944). Ann. Inst. Past. (Paris) 69, 105.
 GRAETZ, FR. (1910), Z. Immunitätsch. 6, 627.
 GRAHAM, R. and F. THORP (1929), J. Immunol. (Am.) 16, 391.
 GRATIA, A. (1934). Bull. Acad. Royale Belge 14, 285.
 GRATIA, A. et L. GORECZYK (1937). C. r. Soc. Biol. Paris 126, 900.
 GREEN, A. A., MCKHANN, KAPICK and FAHEY (1939), J. Immunol. (Am.) 36, 245.
 GREEN, R. H., T. F. ANDERSON and J. E. SMADEL (1942), J. exp. Med. (Am.) 75, 651.
 GRÜN und LIMPÄCHER (1926), Ber. d. Dtsch. chem. Ges. 59, 1350.
 GUINOCHET, E. (1892), Semaine méd. No. 28; Arch. Med. experim. 4.
 GUTMAN, N. (1938), Rev. d'Immunol. 4, 111.
- HAAS, R. (1937), Z. Immunitätsch. 91, 254.
 — (1941), Z. Immunitätsch. 99, 121.
 HAHN, F. und H. HAZATO (1936), Z. Immunitätsch. 88, 16.
 HAHN, M. und H. LÄNGER (1917), Z. Immunitätsch. 26, 199.
 HAHN, P. F., W. F. BALE, E. O. LAWRENCE and G. H. WHIPPLE (1939),
 J. exp. Med. (Am.) 69, 739.
 HALBAN, J. und K. LANDSTEINER (1902), Münch. med. Wschr., S. 473.
 HALLAUER, C. (1925), Z. Hyg. 105, 138.
 — (1939), Handb. d. Virusforsch., 2. Hälfte. S. 1147—1201.
 HALLMANN, D. (1934), Zentralbl. f. Bakt., I. Orig. 130, 234.
 HARRINGTON, C. R., J. HUMPHREY, M. E. YUILL and R. F. CLUTTON (1939),
 3. Intern. Congr. Microbiol., Nueva York, S. 822.
 HARRIS, T. and H. EAGLE (1935), J. gener. Physiol. (Am.) 19, 383.
 HARRIS, T. E. GRIMM, E. MERTENS and W. E. EHRICH (1945), J. exp. Med.
 (Am.) 81, 73.
 HARRISON, J. A. and E. H. FOWLER (1945), Science (Am.) 102, 65.
 HARTEN, M. and M. WALZER (1941), J. Allergy (Am.) 12, 72.
 HARTLEY, P. (1914), Biochem. J. (Brit.) 8, 541.
 — (1925), Brit. J. exp. Path. 6, 180.
 HARVEY, E. N. and J. E. DEITRICK (1930), J. Immunol. (Am.) 18, 65.
 HAUROWITZ, F. (1933), Mediz. Klinik, Nr. 28.
 — (1936), Z. physiol. Chem. 245, 23.
 — (1938), Wissensch. Forschungs.-Ber., Fortschritte d. Biochemie, III. Teil, S. 49.
 — (1939), Chemie d. Antigene und Antikörper, in Kallos, Fortschr. d. Allergielehre.
 — (1942), J. Immunol. (Am.) 43, 331.
 — (1942/43), C. r. Soc. Turque des Scienc. Phys. et Nat., fasc. 10.
 — (1943), Schweiz. med. Wschr., S. 264.
 HAUROWITZ, F. und G. APPEL (1939), Z. Immunitätsch. 95, 478.

- HAUROWITZ, F. und F. BRKINI (1935), Z. f. phys. Chemie 205, 250.
— — (1935), Z. f. phys. Chemie 214, 111.
HAUROWITZ, F. und F. KRAUS (1936), Z. f. phys. Chemie 230, 70.
HAUROWITZ, F. and P. SCHWERIN (1942), Brit. J. exp. Path. 23, 164.
HAUROWITZ, F., M. VARDAR and P. SCHWERIN (1942), J. Immunol. (Am.) 43, 327.
HAWKINS, W. B. and P. F. HAHN (1944), J. exp. Med. (Am.) 83, 31.
HAXTHAUSEN, H. (1934), Arch. f. Dermat. (Dtsch.) 170, 378.
— (1936), Arch. f. Dermat. (Dtsch.) 174, 17.
— (1940), Acta dermat. venerolog. 21, 158.
HEALEY, H. and S. PINFIELD (1938), Brit. J. exp. Path. 16, 535.
HEIDELBERGER, M. (1938), J. Americ. Chem. Soc. 60, 242.
— (1939), Bact. Reviews (Am.) 3, 49.
— (1942), J. gener. Phys. (Am.) 25, 523.
HEIDELBERGER, M. and E. A. KABAT (1934), J. exp. Med. (Am.) 60, 613.
— — (1937), J. exp. Med. (Am.) 66, 220.
— — (1941), J. exp. Med. (Am.) 74, 105.
HEIDELBERGER, M., E. A. KABAT and M. MAYER (1942), J. exp. Med. (Am.) 75, 35.
HEIDELBERGER, M. and F. E. KENDALL (1929 a), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 26, 482.
— — (1929 b), J. exp. Med. (Am.) 50, 809.
— — (1930), Science (Am.) 72, 253.
— — (1934), J. exp. Med. (Am.) 59, 519.
— — (1935 a), J. exp. Med. (Am.) 61, 550.
— — (1935 b), J. exp. Med. (Am.) 61, 563.
— — (1935 c), J. exp. Med. (Am.) 62, 467.
— — (1935 d), J. exp. Med. (Am.) 62, 697.
HEIDELBERGER, M., F. E. KENDALL and CHECK M. SOO HOO (1933), J. exp. Med. (Am.) 58, 137.
HEIDELBERGER, M., E. A. KABAT and D. L. SHRIVASTAVA (1937), J. exp. Med. (Am.) 65, 487.
HEIDELBERGER, M. and K. LANDSTEINER (1923), J. exp. Med. (Am.) 38, 561.
HEIDELBERGER, M. and K. O. PEDERSEN (1937), J. exp. Med. (Am.) 65, 393.
HEIDELBERGER, M., H. P. TREFFERS and M. MAYER (1940), J. exp. Med. (Am.) 71, 271.
HEIDELBERGER, M., H. P. TREFFERS, R. SCHÖNHEIMER, S. RATNER and D. RITTENBERG (1942), J. biol. Chem. (Am.) 144, 555.
HEIMANN, F. und E. WEIL (1930), Z. Immunitätschg. 68, 403.
HEKTOEN, L. (1915), J. infect. discas. (Am.) 17, 415.
— (1922), J. infect. discas. (Am.) 31, 72.
HEKTOEN, L. and A. K. BOOR (1931), J. infect. discas. (Am.) 49, 29.
HEKTOEN, L. and A. J. CARLSON (1910), J. infect. discas. (Am.) 7, 319.
HEKTOEN, L. and K. SCHULHOFF (1925), Proc. nat. Acad. Scienc. II, 481.
HEKTOEN, L. and W. H. WELKER (1927), J. inf. discas. (Am.) 40, 706.
HENRY, J. P. (1942), J. exp. Med. (Am.) 76, 451.
HERSHEY, A. D. (1941), J. Immunol. (Am.) 42, 455, 485, 515.
— (1942), J. Immunol. 45, 39.
— (1943), J. Immunol. 46, 249.

- HETTICHE, H. O. und M. BECKER (1939), Z. Immunitätsch. 96, 440.
- HEWITT, L. F. (1934), Biochem. J. 28, 2080.
- (1937), Biochem. J. 31 I, 1047.
- (1938 a), Biochem. J. 32 II, 26.
- (1938 b), Biochem. J. 32 II, 1540.
- (1938 c), Biochem. J. 32 II, 1554.
- HICKS, R. A. and C. C. LITTLE (1931), Genetics 16, 397.
- HIRSCH, P. (1919), Z. Hyg. 89, 176.
- HIRST, G. K. (1941 a), Science (Am.) 94, 22.
- (1942 a), J. exp. Med. (Am.) 75, 49.
- (1942 b), J. exp. Med. 76, 195.
- (1943), J. exp. Med. (Am.) 78, 99.
- HIRST, G. K., E. R. RICHARD and W. F. FRIEDEWALD (1944), J. exp. Med. (Am.) 80, 265.
- HOLMAN, R. L., E. B. MAHONEY and G. H. WIPPLE (1934), J. exp. Med. (Am.) 59, 251.
- — — (1934 a), J. exp. Med. (Am.) 59, 269.
- HOLZER, F. J. (1935), Z. Immunitätsch. 84, 170.
- HOOKER, S. B. (1937), J. Immunol. (Am.) 33, 57.
- (1938), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 38, 911.
- (1944), Ann. of Allergy (Am.) 2, 281.
- HOOKER, S. B. and W. C. BOYD (1931), J. Immunol. 21, 113.
- — (1932), J. Immunol. 23, 465.
- — (1933 a), J. biol. Chem. (Am.) 100, 187.
- — (1933 b), J. Immunol. (Am.) 25, 61.
- — (1933 c), J. Immunol. (Am.) 24, 141.
- — (1934), J. Immunol. (Am.) 26, 469.
- — (1936 a), J. Immunol. (Am.) 30, 33.
- — (1936 b), J. Immunol. (Am.) 30, 41.
- — (1937), J. Immunol. (Am.) 33, 337.
- — (1939), Arch. Path. (Am.) 28, 754.
- — (1941 a), J. Immunol. (Am.) 42, 419.
- — (1941 b), Nueva York Acad. Science, Series 2, 3, 177.
- — (1941 c), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 47, 187.
- — (1942), J. Immunol. 45, 127.
- HOOKER, S. B. and E. M. FOLLENSBY (1934), J. Immunol. (Am.) 27, 177.
- HOPKINS, S. J. and A. WORMALL (1933 a), Bioch. J. (Brit.) 27, 740.
- — (1933 b), Bioch. J. (Brit.) 27, 1706.
- HORSFALL, F. L. and R. G. HAHN (1940), J. exp. Med. (Am.) 71, 391.
- HORSFALL, F. L. and K. GOODNER (1935), J. exp. Med. (Am.) 62, 485.
- — (1936 a), J. exp. Med. (Am.) 64, 583, 855.
- — (1936 b), J. Immunol. (Am.) 31, 135.
- HUDDLESON, J. F. and R. B. PENNELL (1939), Science (Am.) 90, 571.
- HUDSON, N. P., M. SIEGEL and F. MARKHAM (1943), J. exp. Med. (Am.) 77, 467.
- HUGHES, A. H. and E. K. RIDEAL (1932), Proc. Royal Soc. 112, 24.
- HUNTOON, F. M. (1921), J. Immunol. (Am.) 6, 117, 123, 185.

- JACOBS, J. (1932), *J. Immunol. (Am.)* 23, 361, 375.
— (1937), *J. gener. Phys. (Am.)* 20, 353.
JENNINGS (1942), *J. Immunol. (Am.)* 45, 105, 111.
JOHNSON, S. J., A. M. PAPPENHEIMER and E. S. ROBINSON (1938), *J. Bact. (Am.)* 35, 8.
JONES, F. S. (1927), *J. exp. Med. (Am.)* 46, 303.
— (1928 a), *J. exp. Med. (Am.)* 47, 245.
— (1928 b), *J. exp. Med. (Am.)* 48, 183.
JONES, F. S. and GERSDORFF (1923), *J. biol. Chem. (Am.)* 56, 79.
JONES, F. S. and R. B. LITTLE (1933), *J. exp. Med. (Am.)* 57, 721, 729.
JOOS, A. (1901), *Z. Hyg. (Dtsch.)* 36, 422.
— (1902), *Z. Hyg.* 40, 203.
JORDAN, P. (1940), *Z. Immunitfshg.* 97, 330.
— (1944), *Naturwissensch. (Dtsch.)* 32, 20.

KABAT, E. A. (1939), *J. exp. Med. (Am.)* 69, 103.
— (1943), *Immunochemistry of the proteins. Review. J. Immunol. (Am.)* 47, 513.
KABAT, E. A. and M. HEIDELBERGER (1937), *J. exp. Med. (Am.)* 66, 229.
KABAT, E. A. and K. O. PEDERSEN (1938), *Science (Am.)* 87, 372.
KAPELLER-ADLER, R. und G. BOXER (1936), *Bioch. Z.* 285, 55.
KAPSENBERG, G. (1912), *Z. Immunitfshg.* 15, 518.
KARELITZ, S. and S. S. STENPIEN (1942), *J. Immunol.* 44, 271.
KASS, E. H., M. SCHERAGO and R. H. WEAVER (1942), *J. Immunol. (Am.)* 45, 87.
KATO (1917), *Mittlgn. med. Fak. Tokyo* (1917) 18, 195.
KEKWICK, R. A. (1939), *Bioch. J. Brit.* 33, 1122.
— (1940), *Bioch. J. (Brit.)* 34, 1248.
KERWICK, R. A., P. G. H. GELL and M. E. YUILL (1938), *Bioch. J. (Brit.)* 32 I, 552.
KEKWICK, R. A. and B. R. RECORD (1941 a), *Brit. J. exp. Path.* 22, 29.
— — (1941 b), *J. Soc. Chem. a. Ind.* 60, 486.
KELLAWAY, C. H. and J. S. COVERL (1922), *Brit. J. exp. Path.* 3, 268.
KELLENBERGER, K. (1926), *Z. Hyg. (Dtsch.)* 106, 253.
KENDALL, F. E. (1937), *J. clin. Investig. (Am.)* 16, 921.
— (1938), *Cold Spring Harbor Sympos.* 6, 376.
— (1942), *Ann. New York Acad. Science* 43, 85.
— (1941), *Confer. Immunochem., New York Academy Sciences, New York, March 28 and 29.*
KERR, W. J., S. A. HURWITZ and G. H. WHIPPLE (1918), *Amer. J. Physiol.* 47, 379.
KIRK, J. S. and J. B. SUMNER (1932) 94, 21.
— — (1934), *J. Immunol. (Am.)* 26, 495.
KISTER und W. WEICHARDT (1902), *Z. Mediz.-Beamte (Dtsch.)* 15, 729.
KLECKOWSKI, A. (1941), *Brit. J. exp. Path.* 22, 188.
KLEIN, E. (1871), *Sitzungsber. Akad. Wiss., Math. naturw. Klasse, Wien,* 63 II, 389.
KLOPSTOCK, A. und G. E. SELTER (1928), *Z. Immunitfshg.* 55, 450.
KNIGHT, C. A. (1944), *J. exp. Med. (Am.)* 80, 83.

- KNORR, A. (1898). Münch. med. Wschr. Nr. 11/12.
- KOBERT, R. (1893). Lehrbuch der Intoxikationen, Stuttgart.
- KOERBER, W. L. and W. E. BUNNEY (1941), J. Immunol. (Am.) 40, 459.
- KOLLE, W., H. SCHLOSSBERGER und R. PRIGGE (1924), Soc. de Nations, C. H. 213, 3; Dtsch. med. Wschr. Nr. 33.
- KOPELOFF, L. M. and L. KOPELOFF (1944), J. Immunol. (Am.) 48, 297.
- KOURILSKY, R., S. KOURILSKY et A. BOIVIN (1939), C. r. Soc. Biol. Paris 131, 990.
- KRAUS, R. (1897), Wien. Klin. Wschr., S. 736.
- (1903), Zentralbl. f. Bakt., I. Orig. 34, 488.
- (1906), Wien. Klin. Wschr., S. 655.
- (1929), Bakterienpräzipitation in Handb. d. path. Microorg., 3. Aufl. 2, 1141—1194.
- KRAUS, R. und R. DOERR (1905 a), Wien. Klin. Wschr. Nr. 7.
- (1905 b), Wien. Klin. Wschr. Nr. 42.
- KRAUS, R., N. KOVACS und R. PALTAUF jun. (1929), "Agglutination" im Handb. d. path. Microorg., 3. Aufl. 2 II, 987.
- KRAUS, R. und C. v. PIRQUEL (1902), Zentralbl. f. Bakt., I. Orig. 32, 60.
- KREJCI, L. E., R. K. JENNINGS and L. D. SMITH (1942), J. Immunol. 45, 111.
- KREJCI, L. E., L. DE SPAIN SMITH and F. J. SMITH (1941), J. Frankl. Inst. 231, 396.
- KRETZ, R. (1909), Handb. Techn. u. Meth. Immunitätsch. 2, 1-32.
- KRUSIUS, F. F. (1910 a), Z. Immunitätsch. 5, 699.
- (1910 b), Arch. f. Augenheilk. 67, Erg. Heft, 47.
- KUCZYNSKI, M. H., E. TENNENBAUM und A. WERTHEMANN (1925), Virch. Arch. 258, 686.
- KUHN, W. (1945), Experientia (Schweiz.) 1, 6.
- LAJMANOVICH, S. y N. MITTELMAN (1944), Rev. Inst. bact. "Dr. S. C. Malbran" 12, 320.
- LAKE, G. C., TH. OSBORNE and H. G. WELLS (1914), J. inf. diseases. 14, 364.
- LANDSTEINER, K. (1895), Zentralbl. f. Physiol. 9, 433.
- (1920), Bioch. Z. 104, 280.
- (1921), Bioch. Z. 119, 294.
- (1924), J. exp. Med. (Am.) 39, 631.
- (1926), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 23, 450.
- (1928), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 25, 666.
- (1933), Die Spezifität der serologischen Reaktionen, Berlin.
- (1936), The specificity of serological reactions, London.
- (1942), J. exp. Med. (Am.) 75, 269.
- (1945), The specificity of serological reactions, Rev. Edition, Harvard University Press.
- LANDSTEINER, K. und BARRON (1917), Z. Immunitätsch. 26, 142.
- LANDSTEINER, K. and M. W. CHASE (1933), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 30, 1413.
- LANDSTEINER, K. und JABLONSKY (1914), Z. Immunitätsch. 20, 618.
- LANDSTEINER, K. and J. JACOBS (1932), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 29, 570.

- LANDSTEINER, K. und H. LAMPL (1917 a), Z. Immunitätsch. 26, 258.
— — (1917 b), Z. Immunitätsch. 26, 293.
— — (1918), Bioch. Z. 86, 343.
LANDSTEINER, K. and P. A. LEVENE (1925), J. Immunol. (Am.) 10, 731.
— — (1927), J. Immunol. (Am.) 14, 81.
LANDSTEINER, K. and PH. LEVINE (1932), J. Immunol. (Am.) 22, 397.
LANDSTEINER, K. and R. C. PARKER (1940), J. exp. Med. (Am.) 71, 231.
LANDSTEINER, K. und E. PRÁSEK (1913), Z. Immunitätsch. 20, 231.
LANDSTEINER, K. and J. VAN DER SCHEER (1924), J. exp. Med. (Am.) 40, 91.
— — (1927), J. exp. Med. (Am.) 45, 1045.
— — (1928), J. exp. Med. (Am.) 48, 315.
— — (1929), J. exp. Med. (Am.) 50, 407.
— — (1931 a), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 28 II, 983.
— — (1931 b), J. exp. Med. (Am.) 54, 295.
— — (1932 a), J. exp. Med. (Am.) 55, 781.
— — (1932 b), J. exp. Med. (Am.) 56, 399.
— — (1933), J. exp. Med. (Am.) 57, 633.
— — (1934 a), J. exp. Med. (Am.) 59, 751.
— — (1934 b), J. exp. Med. (Am.) 59, 769.
— — (1936), J. exp. Med. (Am.) 63, 325.
— — (1939), J. exp. Med. (Am.) 69, 705.
— — (1940), J. exp. Med. (Am.) 445.
LANDSTEINER, K. and S. STRMS (1923), J. exp. Med. (Am.) 38, 127.
LANGMUIR, J., V. J. SCHAEFER and D. M. WRINCH (1937), Science (Am.) 85, 76.
LANGMUIR, J. and D. M. WRINCH (1939), Nature (Brit.) 143, 51.
LAUFFER, M. A. (1938), Science (Am.) 87, 469.
LAUFFER, M. A. and G. L. MILLER (1944), J. exp. Med. (Am.) 80, 507.
LAUFFER, M. A. and W. M. STANLEY (1944), J. exp. Med. (Am.) 80, 531.
LEBLANC (1901), La cellule 18, 335.
LEE, WEI-YUNG and HSIEN WU (1932), Chines. J. Physiol. 6, 307.
LENORMANT, H. (1940), Presse méd., S. 1049.
LENTZ, O. und R. PRIGGE (1931), Dysenterie in Handb. d. path. Microorg., 3. Aufl. 3, 1377-1584.
LEPINE, P. (1942), Act. scient. et industr. 933, 54.
LEVENE, P. A., K. LANDSTEINER and J. VAN DER SCHEER (1927), J. exp. Med. (Am.) 46, 197.
LEVENS, J. H. and J. F. ENDERS (1945), Science (Am.) 102, 117.
LEVINE, H. P. and P. A. MOODY (1939), Physiol. zool. 12, 400.
LEWIS, J. H. (1934), J. inf. diseases. (Am.) 55, 168.
— (1937), J. Americ. Med. Assoc., S. 1336.
LEWIS, J. H. and G. H. WELLS (1927), J. inf. diseases. (Am.) 40, 316.
LINGOOD, F. V. (1941), Brit. J. exp. Path. 22, 255.
LOISELEUR, J. (1938 a), C. r. Soc. Biol. Paris 129, 172.
— (1938 b), C. r. Soc. Biol. Paris 129, 250.
— (1938 c), C. r. Soc. Biol. Paris 129, 358.
— (1938 d), C. r. Soc. Biol. Paris 129, 440.
— (1939), C. r. Soc. Biol. Paris 131, 415.
— (1942 a), Actual scient. et industr. 933, 33.

- LOISELEUR, J. (1942 b), *Ann. Inst. Past. Paris* 68, 439. 1
- LOISELEUR, J. et TH. CAILLOT (1940), *C. r. Soc. Biol. Paris* 134, 212.
- LOISELEUR, J. et C. CROVISIER (1940), *C. r. Soc. Biol. Paris* 134, 214.
- LOISELEUR, J. et R. O. PRUDHOMME (1942), *Ann. Inst. Past. Paris* 68, 479.
- LONGWORTH, L. G. and D. A. McINNES (1940 a), *Americ. chem. Soc.* 62, 705.
- — (1940 b), *J. exp. Med. (Am.)* 71, 77. 1
- LONGWORTH, L. G., TH. SHEDLOVSKY and D. A. McINNES (1939), *J. exp. Med. (Am.)* 70, 399.
- LOURAU, M. (1939), *C. r. Soc. Biol. Paris* 131, 1162. .
- LOWELL (1942), *Proc. exp. Biol. a Med. (Am.)* 50, 167.
- LÖWENSTEIN, E. (1900), *Z. Hyg. (Dtsch.)* 62, 491.
- LUCKSCH, F. (1908), *Zentralbl. f. Bakt., I. Orig.* 45, 365.
- LUETSCHER, J. A. (1940), *J. clin. Investig. (Am.)* 19, 313.
- (1941), *J. clin. Investig. (Am.)* 20, 99, 315.
- LUNDGREN, H. P., A. M. PAPPENHEIMER and J. W. WILLIAMS (1939), *J. Americ. chim. Soc.* 61, 533.
- LUSH, D. (1943), cit. por E. CLARK and J. P. O. NAGLER, *Austral. J. exp. Biol. a Med. Science* 21, 103.
- MACFALYEN, A. (1902), *Proc. Royal Soc. (Brit.)* 71, 2 Aug.
- MACHEBOEUF, M. (1939), *L'immunochimie in Expos. ann. d. Biochim. médic., 2. Serie.* 117.
- (1942), *Actual. scient. et industr. No.* 903, 5.
- MACHEBOEUF, M. et MARG. FAURE (1942), *Expos. ann. d. Bioch. méd. 3. Série,* 134.
- MACHEBOEUF, M., MAX VISCONTINI et M. RAYNAUD (1943), *Ann. Inst. Past. Paris* 69, 376.
- MACINNES, D. A. and L. G. LONGWORTH (1941), *Science (Am.)* 93, 438.
- — (1944), *Colloid Chemistry*, ed. by J. Alexander 5, 387—411.
- MACPHERSON, C. F. C., D. H. MOORE and L. G. LONGWORTH (1944), *J. biol. Chem. (Am.)* 156, 381.
- MADDEN, S. C. and G. H. WHIPPLE (1940 a), *Physiol. Rev.* 20, 194.
- MADDEN, S. C., C. A. FINCH, W. G. SWALBACH and G. H. WHIPPLE (1940 b), *J. exp. Med. (Am.)* 71, 283.
- MADDEN, S. C., W. E. GEORGE, G. S. WARAICH and G. H. WHIPPLE (1938), *J. exp. Med. (Am.)* 67, 675.
- MAGNUS (1908), *Ber. dtsch. Bot. Gesellsch.* 26 a, 532.
- MAIER, H. (1933), *Z. Immunitätschg.* 78, 1.
- MAKINO, K. (1933/34), *Z. Immunitätschg.* 81, 316.
- MALKIEL, S. and W. C. BOYD (1937), *J. exp. Med. (Am.)* 66, 383.
- MANTREUFEL, P. und H. BEGER (1922), *Z. Immunitätschg.* 33, 348.
- MARKIN, L. and P. KYES (1939), *J. inf. diseases. (Am.)* 65, 156.
- MARRACK, J. R. (1934), *The chemistry of antigens and antibodies*, 1. Edit., London.
- (1938), *The chemistry of antigens and antibodies*, *Med. Press. Council., Spec. Rep. Ger.* 230.
- (1942), *Immunochemistry*, *Ann. Rev. Biochem.* 11, 629.
- MARRACK, J. R. and D. A. DUFF (1938), *Brit. J. exp. Path.* 19, 171.

- MARRACK, J. R. and F. C. SMITH (1931). *Brit. J. exp. Path.* 12, 182.
- MATSUMOTO, K. (1927). *Sci. Rep. Gov. Inst. inf. Diseases. Tokyo University* 6, 145.
- MCCARTNEY, J. E. and P. K. OLITSKY (1923). *J. exp. Med. (Am.)* 37, 767.
- MCCLELLAND, L. and R. HARE (1941). *Canad. Publ. Health J.* 32, 530.
- McKHANN, CH. F. and FU TANG CHU (1933). *J. inf. diseases. (Am.)* 52, 268.
- McKHANN, CH. F. y colaboradores (1935). *J. Pediatr. (Am.)* 6, 603.
- McMASTER, P. D. and S. S. HUDACK (1935). *J. exp. Med. (Am.)* 61, 703.
- MEDVECSKY, A. und A. UHROVITS (1931). *Z. Immunitätschg.* 72, 256.
- MEISSNER, G. (1923). *Z. Immunitätschg.* 36, 272.
- MELLORS, R. C., E. MUNTWILER and F. R. MAUTZ (1921). *J. biol. Chem.* 140, L. XXXIX.
- MENTEN, M. L., H. H. FINLAY and M. A. ANDERSCH (1945). *J. Immunol. (Am.)* 51, 45.
- MERRILL, M. H. (1936). *J. Immunol. (Am.)* 30, 169.
- METSCHNIKOFF, F. (1902). *Die Immunität bei Infektionskrankheiten.* Jena.
- MEYER, K. und H. LOEWENTHAL (1927/28). *Z. Immunitätschg.* 54, 409.
- MEYER, KURT (1937). *Ann. Inst. Past. Paris* 59, 477.
- (1939). *C. r. Soc. Biol. Paris* 128, 959.
- MEYER, KURT et ANDRE PIC (1937). *Ann. Inst. Past. Paris* 59, 594.
- MEYER, K. F. (1928). *Botulismus in Handb. d. path. Microorg.* 4, 1269—1364.
- MICHAELIS, L. (1904). *Dtsch. med. Wschr., S.* 1240.
- MIKULACZEK, E. (1935). *Weichardts Erg.* 17, 415.
- MILES, A. A. (1933). *Brit. J. exp. Path.* 14, 43.
- MILLER, G. L. (1944). *J. exp. Med. (Am.)* 80, 507.
- MILLER, G. L., M. A. LAUFFER and W. M. STANLEY (1944). *J. exp. Med. (Am.)* 80, 549.
- MIRSKY, A. E. and L. PAULING (1936). *Proc. nat. Acad. Science. U. S. A.* 22, 439.
- MOODY, P. A. (1940). *J. Immunol. (Am.)* 39, 113.
- MOORE, D. H. and J. LYNN (1941). *J. biol. Chem.* 141, 819.
- MOORE, D. H., J. VAN DER SCHEER and R. G. WYCKOFF (1940). *J. Immunol. (Am.)* 38, 221.
- MOREL, A. et P. SISLEY (1927). *Bull. Soc. Chem. France* 41, 1217.
- (1928). *Bull. Soc. Chem. France* 43, 881.
- MORGAN, W. T. J. (1931). *Brit. J. exp. Path.* 12, 62.
- (1937 a). *Biochem. J. (Brit.)* 31 II, 2003.
- (1937 b). *J. Hyg. (Brit.)* 37, 372.
- (1943). *Nature (Brit.)* 152, 82.
- (1944). *Brit. med. Bulletin* 2, 281.
- MORGAN, W. T. J. and S. M. PARTRIDGE (1940). *Biochem. J. (Brit.)* 34, 169.
- MORGENROTH, J. (1910). *Bioch. Z.* 25, 100.
- MORRIS, M. C. (1941). *J. Immunol. (Am.)* 42, 219.
- MUDD, ST. (1932). *J. Immunol. (Am.)* 23, 423.
- MUDD, ST. and T. F. ANDERSON (1941). *J. Immunol. (Am.)* 42, 251.
- MUDD, ST. and E. W. JOFFE (1933). *J. gener. Phys. (Am.)* 16, 947.
- MUDD, ST., B. LUCKE, M. McCUTCHEON and W. STRUMIA (1930). *J. exp. Med. (Am.)* 52, 313.
- MUELLER, J. H. (1939). *J. Immunol. (Am.)* 37, 103.

- MUELLER, J. H. and P. A. MILLER (1940), *Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 43, 389.
- MÜLLER, P. TH. (1917), *Vorlesungen über Infektion und Immunität*. 5. Aufl., Jena.
- MURPHY, J. B. and E. STURM (1925), *J. exp. Med. (Am.)* 41, 245.
- MUTSAARS, W. (1930), *Ann. Inst. Past. Paris* 62, 81.
- (1939), *C. r. Soc. Biol. Paris* 132, 467.
- NAGLER, F. P. O. (1942), *Med. J. Australia* 1, 281.
- NATHAN und P. KALLOS (1937), *cit. n. P. KALLOS, Weich. Ergebn.* 19, 200.
- NELSON, C. J. (1927), *J. inf. diseases. (Am.)* 41, 9.
- NEURATH, H. (1939), *J. Americ. chem. Soc.* 61 II, 1841.
- NEWELL, J. M., A. STERLING, M. F. OXMAN, S. S. BURDEN and L. E. KREJCI (1939), *J. Allergy (Am.)* 10, 513.
- NICOLAS, E. (1932), *C. r. Soc. Biol. Paris* 109, 1249.
- NISHEGORODZEFF, K. (1930), *Z. Immunitätschg.* 66, 276.
- NORTHROP, J. H. (1941), *Science (Am.)* 93, 92.
- (1942), *J. gener. Phys. (Am.)* 25, 465.
- NUTTALL, G. H. F. (1904), Cambridge University Press.
- ORERMAYER, FR. und E. P. PICK (1906), *Wien. Klin. Wschr.*, S. 327.
- ORERMAYER, FR. und WILHEIM (1912), *Bioch. Z.* 38, 331.
- — (1913), *Bioch. Z.* 50, 369.
- OLITSKY, P. K. and I. J. KLIGLER (1920), *J. exp. Med. (Am.)* 31, 19.
- ONCLEY, J. L. (1942), *Chem. Rev.* 30, 433.
- OPIE, E. L. and J. FURTH (1926), *J. exp. Med. (Am.)* 43, 469.
- ORDMANN, C. W., C. G. JENNINGS and C. A. JANEWAY (1944), *J. clin. Investig. (Am.)* 23, 541.
- ORSKOV, J. und E. K. ANDERSEN (1938), *Z. f. Immunitätschg.* 92, 487.
- OTTENBERG, R. and F. A. STENBUCH (1923/24), *Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 21, 303.
- OTTENSOOSER, F. und E. STRAUSS (1928), *Bioch. Z.* 193, 426.
- OTTO, R. (1907), *Münch. med. Wschr.* 54, 1665.
- OTTO, R. und T. SHIRAKAWA (1924), *Z. Hyg. (Dtsch)* 103, 426.
- PAIC, M. (1938), *C. r. Acad. Science. Paris* 207, 1074.
- (1939), *Bull. Soc. Chim. Belg. (Franc.)* 21, 412.
- PAPPENHEIMER, A. M. (1938), *J. biol. Chem. (Am.)* 125, 201.
- (1940), *J. exp. Med. (Am.)* 71, 263.
- PAPPENHEIMER, A. M. and S. J. JOHNSON (1936), *Brit. J. exp. Path.* 17, 335.
- — (1937), *Brit. J. exp. Path.* 18, 239.
- PAPPENHEIMER, A. M., H. P. LUNDGREN and J. W. WILLIAMS (1940), *J. exp. Med. (Am.)* 71, 247.
- PAPPENHEIMER, A. M., J. A. MUELLER and S. COHEN (1937), *Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 36, 795.
- PAPPENHEIMER, A. M. and E. S. ROBINSON (1937), *J. Immunol. (Am.)* 32, 291.

- PARFENTJEV, I. A. (1936), U. S. Patent 2065, 19 b.
- PARKER, R.-C. (1937 a), C. r. Soc. Biol. Paris 125, 315.
— (1937 b), Science (Am.) 85, 292.
- PARODI, A. S., cit. por PARODI y colaboradores.
- PARODI, A. S., S. LAJMANOVICH y N. MITTELMAN (1944), Rev. Inst. bact. "C. G. Malbran" 12, 312.
- PARTRIDGE, S. M. and W. T. J. MORGAN (1940), Brit. J. exp. Path. 21, 160.
- PAULING, L. (1940), J. Americ. chem. Soc. 62, 2643.
— (1945), Molecular structure and intermolecular forces. En K. LANDSTEINER (1945).
- PAULING, L. and D. H. CAMPBELL (1942 a), Science (Am.) 95, 440.
— — (1942 b), J. exp. Med. (Am.) 76, 211.
- PAULING, L., D. H. CAMPBELL and D. PRESSMAN (1943), Physiol. Rev. (Am.) 23, 203.
- PAULY, H. (1915), Z. phys. Chem. (Dtsch.) 94, 284.
- PEARSON, H. E. (1944), J. Immunol. (Am.) 49, 117.
- PERLZWEIG, W. A. and C. S. KEEFER (1925), J. exp. Med. (Am.) 42, 747.
- PERLZWEIG, W. A. and G. I. STEFFEN (1923), J. exp. Med. (Am.) 38, 163.
- PETERMANN, M. L. and A. M. PAPPENHEIMER (1941 a), Science (Am.) 93, 458.
— — (1941 b), J. Physical. Chemistry (Am.) 45, 1.
- PETERS, J. P. (1942), Annual Rev. Physiol. 4, 89.
- PFEIFFER, R. (1892), Z. Hyg. (Dtsch.) 11, 393.
- PFEIFFER, R. und E. MARX (1898), Z. Hyg. (Dtsch.) 27, 272.
- PHILPOT, J. ST. L. (1938), Nature (Brit.) 141, 283.
- PICADO, C. et W. ROTTER (1937), Rev. franç. d'endocrinol. 15, 173.
— — (1938), C. r. Soc. Biol. Paris 127, 1096, 1098.
- PICK, E. P. (1901), HOFMEISTERS Beiträge 1.
— (1902), HOFMEISTERS Beiträge 2.
— (1912), Biochemie d. Antigene, Handb. d. path. Microorg., 2. Aufl. 1, 685-868.
- PICK, E. P. und F. SILBERSTEIN (1928), Biochemie der Antigene und Antikörper. Handb. d. path. Microorg., 3. Aufl. 2, 317.
— — (1929), Charakterisierung der Toxine, Antitoxine u. ihrer Reaktionen. Handb. d. path. Microorg., 3. Aufl. 2, 383-420.
- PICK, R. (1913), Zentralbl. f. Bakt., I. Orig. 70, 435.
- PIJPER, A. (1938), J. Path. a. Bact. (Brit.) 47, 1.
- PILLEMER, L., E. E. ECKER and E. W. MARTIENSEN (1939), J. exp. Med. (Am.) 70, 387.
- PILLEMER, L., E. E. ECKER, V. C. MYERS and E. MUNTWYLER (1938), J. biol. Chem. (Am.) 123, 365.
- PILLEMER, L., E. E. ECKER and J. R. WELLS (1939); J. exp. Med. (Am.) 69, 191.
- PIROSKY, I. (1938), C. r. Soc. Biol. Paris 128, 346, 347.
- v. PIRQUET, CL. (1910), Allergie, Berlin.
- PLAUT, F. und H. KASSOVITZ (1930), Z. Immunitätschg. 66, 152.
— — (1931), Z. Immunitätschg. 71, 193.
- PLAUT, F. und H. RUDY (1933), Z. Immunitätschg. 81, 87.
- POMNERENKE, W. F., H. B. SLAVIN, D. H. KARIHER and G. H. WHIPPLE (1935), J. exp. Med. (Am.) 61, 283.

- POPE, C. G. (1938), *Brit. J. exp. Path.* 19, 245.
 — (1939), *Brit. J. exp. Path.* 20, 201.
 POPE, C. G. and F. V. LINGOOD (1939), *Brit. exp. Path.* 20, 297.
 PORTER, E. F. and A. M. PAPPENHEIMER (1939), *J. exp. Med. (Am.)* 69, 755.
 PRASEK, E. (1913), *Z. Immunitätschg.* 20, 146.
 PRAUSNITZ, C. und H. KÜSTNER (1921), *Centralbl. f. Bakt., I. Orig.* 86, 160.
 PRESSMAN, D., D. H. CAMPBELL and L. PAULING (1942), *J. Immunol. (Am.)* 44, 101.
 PRIGGE, R. (1939), *Zentralbl. f. Bakt., I. Orig.* 144, 4.
 PRZYGODE, P. (1913), *Wien. Klin. Wschr.*, S. 841.
 — (1914), *Wien. Klin. Wschr.*, S. 201.
- RAFFEL, S. (1934), *Americ. J. of Hyg.* 19, 416.
 RAFFEL, S. and M. C. TERRY (1940), *J. Immunol. (Am.)* 39, 337, 349.
 RAFFEL, S., CH. F. PAIT and M. C. TERRY (1940), *J. Immunol. (Am.)* 39, 317.
 RAISTRICK, H. and W. W. C. TOPLEY (1934), *Brit. J. exp. Path.* 15, 113.
 RAMON, G. (1922), *C. r. Soc. Biol. Paris* 86, 711.
 — (1923 a), *C. r. Acad. Scienc. Paris* 177, 1338.
 — (1923 b), *C. r. Soc. Biol. Paris* 89, 2.
 — (1923 c), *Ann. Inst. Past. Paris* 37, 1001.
 — (1924 a), *C. r. Acad. Scienc. Paris* 179, 485.
 — (1924 b), *C. r. Acad. Scienc. Paris* 179, 514.
 — (1928), *C. r. Soc. Biol. Paris* 99, 1295.
 — (1934) *Reale Accad. d'Italia, Fond. Volta* 3, 241.
 — (1939), *Revue d'Immunol. (Franc.)* 5, 385.
 — (1941 a), *C. r. Soc. Biol. Paris*, 135, 148.
 — (1941 b), *C. r. Soc. Biol. Paris* 135, 296.
 — (1943), *Bull. Acad. Méd.* 127, 653.
 RAMON, G., G. ANOUREAUX et J. POCHON (1942), *Revue d'Immunol. (Franc.)* 7, 1.
 RAMON, G., et A. BOIVIN (1943), *C. r. Soc. Biol. Paris* 137, 409.
 RAMON, G., A. BOIVIN et R. RICHOU (1938), *C. r. Acad. Scienc. Paris* 207, 466.
 — — — (1937), *C. r. Soc. Biol. Paris* 124, 32.
 RAMON, G. et P. DESCOMBEY (1925), *C. r. Soc. Biol. Paris* 93, 508, 898.
 — — (1930), *C. r. Soc. Biol. Paris* 103, 1202.
 RAMON, G. et R. RICHOU (1941), *C. r. Soc. Biol. Paris* 135, 673.
 RATNER, B. (1943), *Allergy, Anaphylaxis and Immunotherapy*, Baltimore.
 RATNER, B. and H. L. GRUEHL (1931), *J. exp. Med. (Am.)* 53, 677.
 RATNER, B., H. C. JACKSON and H. L. GRUEHL (1926), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 23, 327.
 RATNER, S., S. R. SCHÖNHEIMER and D. RITTENBERG (1940), *J. biol. Chem. (Am.)* 134, 653.
 RATNER, S., D. RITTENBERG, A. S. KESTON and R. SCHÖNHEIMER (1940), *J. biol. Chem. (Am.)* 134, 665.
 REESER, H. E. (1919), *Mededeel. v. d. Rijksteoumr.*, 2, 39, 83.
 REH, TH., M. ARMANGUE, E. NOVEL et O. DEDIE (1944), *Schweiz. Z. f. Path. u. Bact.* 7, 481.
 REINER, L. (1930), *Science (Am.)* 72, 483.

- REINER, L., FISCHER, KOPF und STRILICH (1929), Z. Immunitätsch. 61, 317, 397, 405, 459.
- RICH, R., M. R. LEWIS and M. M. WINTROBE (1939), Bull. JOHN HOPKINS Hosp. (Am.) 65, 311.
- RIESENFELD, E. (1943), Lehrbuch der anorganischen Chemie, Zurich.
- ROBERTS, E. C. (1945), J. Immunol. (Am.) 50, 1.
- ROBERTS, E. C. and L. R. JONES (1941 a), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 47, 11.
- (1941 b), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 47, 75.
- (1942 a), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 49, 52.
- (1942 b), J. Bacteriology (Am.) 43, 116.
- ROCHE, J. et V. DERRIEN (1945), C. r. Soc. Biol. Paris 139, 101.
- ROCKWELL, G. E. (1942), J. Immunol. (Am.) 43, 259.
- ROLLER, D. (1939), Klin. Wschr. (Dtsch.), S. 1592.
- RÖMER, P. (1907), Arch. Augenheilk. (Dtsch.) 56, Erg. Heft 284.
- ROSE, W. C. (1938), Physiol. Rev. (Am.) 18, 109.
- ROSENBERG, R. (1926), Centralbl. f. Bakt., I. Orig. 98, 259.
- ROSENHEIM, A. D. (1937), Biochem. Z. 35, 54.
- ROSENHEIM, A. H. (1937), Bioch. J. (Brit.) 26, 54.
- ROSENTHAL, L. (1943), J. Bacteriol. (Am.) 45, 545.
- (1904), Dtsch. med. Wschr., Nr. 7.
- RÖSLI H. (1929), Zentralbl. f. Bakt., I. Orig. 112, 151.
- ROTHEN, A. (1941/42), J. gener. Phys. (Am.) 25, 487.
- (1945), Science (Am.) 102, 446.
- ROTHEN, A. and K. LANDSTEINER (1939), Science (Am.) 90, 65.
- (1942), J. exp. Med. (Am.) 76, 437.
- ROUX, E. et L. VAILLARD (1893), Ann. Inst. Past. Paris 7, 65.
- ROUX, E. et A. YERSIN (1888), Ann. Inst. Past. Paris 1.
- (1889), Ann. Inst. Past. Paris 3, 279.
- RUSKA, H. (1942), Arch. f. Virusf. 2, 480.
- SABIN, F. R. (1939), J. exp. Med. (Am.) 70, 67.
- SACHS, H. (1928), Wenchardts Ergebnisse 9, 1.
- (1929), Handh. d. norm. u. path. Phys. 13, 405.
- SACHS, H. und A. KLOPSTOCK (1925), Bioch. Z. 159, 491.
- SACHS, H., A. KLOPSTOCK und A. J. WEIL (1925), Dtsch. med. Wschr., S. 589.
- SAHLI, H. (1920), Schweiz. med. Wschr., S. 1129, 1153.
- SALIMBENI (1908), Ann. Inst. Past. Paris 22, 172.
- SALK, J. E. (1944), J. Immunol. (Am.) 49, 87.
- SALOMONSEN, C. J. et TH. MADSEN (1898), Ann. Inst. Past. Paris 12, 763.
- SANDERS, E., I. F. HUDDLESON and P. J. SCHAIKLE (1944), J. biol. Chem. (Am.) 155, 469.
- SANDOR, G. (1938), Bull. Soc. Chim. Biol. 20, 1130.
- SATO, T. (1933), Z. Immunitätsch. 79, 117.
- SAWYER, W. A. (1931), J. prevent. Med. (Am.) 5, 413.
- VAN DER SCHEER, J. (1940), J. Immunol. (Am.) 39, 65.
- VAN DER SCHEER, J. E. BOHNEL, CLARKE and WYCKOFF (1942), J. Immunol. (Am.) 44, 165.

- VAN DER SCHEER, J., J. B. LAGSDIN and R. W. WYCKOFF (1941), *J. Immunol.* (Am.) 41, 209.
- VAN DER SCHEER J. and K. LANDSTEINER (1935), *J. Immunol.* (Am.) 29, 371.
- VAN DER SCHEER, J. and R. W. G. WYCKOFF (1940), *Proc. Soc. exp. Biol. a Med.* (Am.) 45, 634.
- VAN DER SCHEER, J., R. W. G. WYCKOFF and F. H. CLARKE (1940), *J. Immunol.* (Am.) 39, 65.
- — — (1941 a), *J. Immunol.* (Am.) 41, 349.
- — — (1941 b), *J. Immunol.* (Am.) 40, 39, 173.
- SCHIEHMANN, O. und W. CASPER (1927), *Z. Hyg. (Dtsch.)* 108, 220.
- SCHILF, F. (1926), *Zentralbl. f. Bakt., I. Orig.* 97, 219.
- SCHMIDT, H. (1933), *Wissensch. Forschungsber.* 33.
- (1940), *Grundlagen der spezifischen Therapie und Prophylaxe bakterieller Infektionskrankheiten*, Berlin.
- SCHMIDT, H. und W. SCHOLZ (1929), *Z. Immunitätsch.* 64, 226.
- SCHMIDT, S. (1930), *C. r. Soc. Biol. Paris* 105, 323.
- (1932), *Bioch. Z.* 256, 158.
- SCHÖNHEIMER, R., S. RATNER and D. RITTENBERG (1939 a), *J. biol. Chem.* (Am.) 127, 333.
- — — (1939 b), *J. biol. Chem.* (Am.) 130, 703.
- 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.
- SCHRAMM, G. und H. MÜLLER (1940), *Z. phys. Chem. (Dtsch.)* 266, 43.
- SCHÜBEL, K. (1923), *Arch. exp. Path. u. Ther.* 06.
- SCHULTZE, H. E. (1940), *Bioch. Z.* 305, 196.
- (1941), *Bioch. Z.* 308, 266.
- SEDAILLAN, P. et A. BERTOYE (1943), *Revue d'Immunol. (Franc.)* 8, 6.
- SEDAILLAN, P., F. JOURDAN et CH. CLAVEL (1938), *Revue d'Immunol. (Franc.)* 4, 220.
- — — (1939), *Revue d'Immunol. (Franc.)* 5, 227.
- SEEMÜLLER, H. (1943), *Schweiz. Z. f. Path. u. Bact.* 6, 335.
- (1944), *Schweiz. Z. f. Path. u. Bact.* 7, 468.
- (1945), *Schweiz. Z. f. Path. u. Bact.* 8, 503.
- SEIBERT, F. B. (1935), *J. Immunol.* (Am.) 28, 425.
- SELTNER, G. E. (1927), *Z. Immunitätsch.* 54, 113.
- (1930), *Z. Immunitätsch.* 68, 409.
- SENGES, H. (1938), *Z. Immunitätsch.* 92, 431.
- SHAFFER, M. F. and J. H. DINGLE (1938), *Proc. exp. Biol. a Med.* (Am.) 38, 528.
- SHAPIRO, S., V. ROSS and D. H. MOORE (1943), *J. clin. Investig.* (Am.) 22, 137.
- SHARP, D. G., A. R. TAYLOR, D. BEARD and J. W. BEARD (1942), *J. Immunol.* (Am.) 44, 115.
- SHIBLEY, G. S. (1926), *J. exp. Med.* (Am.) 44, 667.
- (1929), *J. exp. Med.* (Am.) 50, 825.
- SHOPE, R. E. (1939), *J. exp. Med.* (Am.) 69, 847.
- SHRIGLEY, E. W. (1945), *Science* (Am.) 102, 64.
- SIGNER, R. (1944), *Chemie, Phys. u. Path. d. Eiweisses. Naturf-Ges. Bern*, N. F. I, 55.

- SIMON, F. A. (1941), *J. Allergy (Am.)* 12, 610.
— (1942), *J. exp. Med. (Am.)* 75, 315.
SMETANA, H. and D. SHEMIN (1941), *J. exp. Med. (Am.)* 73, 229.
SMITH, W. (1932), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 33, 509.
SMITH, F. C. and J. R. MARRACK (1930), *Brit. J. exp. Path.* 11, 494.
V. SMOLUCHOWSKI (1918), *Z. physikal. Chem.* 92, 137.
SNAPPER, I. and A. GRÜNBAUM (1936), *Brit. J. exp. Path.* 17, 361.
SOMMER, H. (1936/37), *Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 35, 520.
SOPER, F. L. and A. DE ANDRADE (1933), *Americ. J. Hyg.* 18, 588.
SORDELLI, A., J. FERRARI, I. GRITZMAN, F. MODERN, G. RUF y O. REPETTO (1943), *Rev. inst. bact. "Dr. c. G. Malbran"* 12, 83.
SORDELLI, A., H. FISCHER, R. WERNICKE y C. PICO (1918), *Rev. del Ist. bact., Buenos Aires* 1, 229.
SORDELLI, A., et E. MAYER (1931), *C. r. Soc. Biol. Paris* 107, 736.
SÖRENSEN, S. P. L. (1930), *Kolloid-Z.* 53, 102, 170, 300.
SPIEGEL-ADOLF, M. (1926), *Bioch. Z. (Dtsch.)* 170, 126.
STANDENATH, F. (1923/24), *Z. Immunitätsch.* 38, 19.
STANLEY, W. M. (1940), *Ann. Rev. Biochem. (Am.)* 9, 545.
STARIN, A. (1918), *J. inf. diseases. (Am.)* 23, 139.
STAUB, A. M. et P. GRABAR (1944), *Ann. Inst. Past. Paris*, 69, 268.
STENHAGEN, E. (1938), *Biochem. J.* 32, 714.
STERN, E. (1922), *Arch. f. Hyg. (Dtsch.)* 91, 165.
STOCKES, J. and NEEFE (1945), *J. Americ. med. Assoc.* 127, 144.
STOCKES, J., E. P. MARIS and S. S. GELLIS (1944), *J. clin. Investig. (Am.)* 23, 531.
STOCKINGER, H. E. and M. HEIDELBERGER (1937), *J. exp. Med. (Am.)* 66, 251.
STUART-HARRIS, C. H. (1943), *J. exp. Path. (Brit.)* 24, 33.
STULL, A. and ST. F. HAMPTON (1941), *J. Immunol. (Am.)* 41, 143.
STUMNER, J. B. (1941), *Antienzyme. In Methoden der Fermentforschung* 3, 1471.
THE SVEDBERG (1930), *Kolloid-Z. (Dtsch.)* 51, 10.
— (1937), *Nature (Brit.)* 139, 1051.
— (1939), *Proc. Royal Soc., London*, B 127, 5.
THE SVEDBERG und K. O. PEDERSEN (1940), *Die Ultrazentrifuge, Dresden und Leipzig*.
THE SVEDBERG and B. S. SJÖGREN (1930), *J. Americ. Chem. Soc.* 52, 2855.
SVENSSON, H. (1930), *Kolloid-Z.* 87, 181.
— (1940), *Kolloid-Z.* 90, 141.
— (1941), *J. biol. Chem. (Am.)* 139, 805.
— (1943), *Ark. f. Kemi, mineral. och geologi* 17, 1.

TAMURA, J. T. and M. J. BOYD (1938), *Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 38, 909.
TANI, SHIGERU (1933), *C. r. Soc. Biol. Paris* 114, 237.
TANIGUCHI, T. (1921), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 24, 241.
TARNOWSKI, C. (1942), *Acta path. et microb. scand.* 19, 300.
TAYLOR, G. L. (1931), *J. Hyg. Cam.* 31, 56.
— (1933), *J. Hyg. Camb.* 33, 12.
TAYLOR, G. L., G. S. ADAIR and M. E. ADAIR (1932), *J. Hyg. Camb.* 32, 340.
TAYLOR, G. L. and A. KEYS (1943), *J. biol. Chem. (Am.)* 148, 379.

- TAYLOR, R. M. (1941), *J. Immunol. (Am.)* 40, 373.
- TEN BROECK (1944), *J. biol. Chem. (Am.)* 17, 369.
- THOMSEN, O. (1917), *Z. f. Immunitätschg.* 26, 213.
- TIMMERMAN, W. A. (1934), *Ann. Inst. Past. Paris*, 52, 146.
- TISELIUS, A. (1930), *Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsaliensis* 7, Ser. 4, No. 4.
- (1937 a), *Bioch. J.* 31 II, 1464.
- (1937 b), *Bioch. J.* 31 I, 313.
- (1937 c), *Transact. Faraday Soc.* 33, 524.
- (1937 d), *J. exp. Med. (Am.)* 65, 641.
- (1938 a), *Kolloid-Z.* 85, 129.
- (1938 b), *XII. Verh.-Ber. d. Kolloid-Ges., Dresden und Leipzig*, S. 129.
- (1939/40), *The Harvey Lectures, Ser. XXXV*, 37.
- TISELIUS, A. und S. GARD (1942), *Naturwiss. (Dtsch.)* 30, 728.
- TISELIUS, A. and E. A. KABAT (1939), *J. exp. Med. (Am.)* 69, 119.
- TODD, J. L. (1903), *Brit. med. J.*
- TOMCSIK, J. and T. J. KUROTKHIN (1928), *J. exp. Med. (Am.)* 47, 379.
- TOPLEY, W. W. C. (1930), *J. Path. a. Bact. (Brit.)* 33, 339.
- (1933), *An outline of immunity*, London.
- TOPLEY, W. W. C., RAISTRICK, WILSON, STACEY, CHALLINOR and CLARK (1937), *Lancet*, S. 252.
- TOPLEY, W. W. C. and G. S. WILSON (1936), *The Principles of bacteriology and immunity*, 2. Edit., London.
- TOPLEY, W. W. C., J. WILSON and J. T. DUNCAN (1935), *Brit. J. exp. Path.* 16, 116.
- TREFFERS, H. P. (1944 a), "Immunity" in *Handbook of medical physics*, Chicago.
- (1944 b), *Advances in Protein Chemistry*, Nueva York, Academic Press.
- TREFFERS, H. P. and M. HEIDELBERGER (1941 a), *J. exp. Med. (Am.)* 73, 125.
- — (1941 b), *J. exp. Med. (Am.)* 73, 293.
- TREFFERS, H. P., D. H. MOORE and HEIDELBERGER (1942), *J. exp. Med. (Am.)* 75, 135.
- TROMMSDORFF, R. (1909), *Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt* 32, 560.
- (1921), *Z. Immunitätschg.* 32, 379.
- TROPP, C. und A. BASERGA (1934), *Z. Immunitätschg.* 83, 234.
- TSAI LEN HWON (1933), *J. Immunol. (Am.)* 33, 471.
- TSCHISTOWITSCH (1899), *Ann. Inst. Past. Paris* 13, 406.
- TWYBLE, E. and H. C. MASON (1944), *J. Immunol. (Am.)* 49, 73.
- TYLER, A. (1945 a), *J. Immunol. (Am.)* 51, 157.
- (1945 b), *J. Immunol. (Am.)* 51, 329.
- TYLER A. and ST. M. SWINGLE (1945), *J. Immunol. (Am.)* 51, 339.
- UHLENHUTH, P. (1903), *Festschrift f. ROBERT KOCH*, Jena.
- (1905 a), *Dtsch. med. Wschr.*, S. 564.
- (1905 b), *Dtsch. med. Wschr.*, S. 1673.
- UHLENHUTH, P. und HAENDEL (1910), *Z. Immunitätschg.* 4, 761.
- UHLENHUTH und W. SEIFFERT (1930), *Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels der Präzipitation*, *Handb. d. path. Microorg.*, 3. Aufl. LII, 1, 365-468.
- UWAZUMI (1934), *Arb. med. Fak. Okayama* 4, 53.

- VELLIZ, L. (1933), C. r. Soc. Biol. Paris 113, 684.
— (1934), C. r. Soc. Biol. Paris 116, 981.
— (1937), VI Congr. Chim. biol., S. 173.
— (1938), C. r. Soc. Biol. Paris 127, 35.
VOSS, E. A. (1937/38), Z. f. Kinderheilk. (Dtsch.) 59, 612.
— (1938), Z. f. Immunitätsföschg. (Dtsch.) 94, 280.
- WADSWORTH, A., E. und F. MALTANER (1934), J. Immunology 26, 25.
— — (1935), J. Immunology 29, 195.
WALBUM, L. E. (1929), Toxine und Antitoxine, Handb. d. path. Micoorg., 3. Aufl. II, 513-574.
WALDSCHMIDT-LEITZ, E., F. ZIEGLER, A. SCHÄFFNER und L. WEIL (1931), Z. physiol. Chem. 197, 219.
WATZKA, M. (1937), Z. f. mikr.-anat. Föschg. 41, 498.
WEIL, A. J. (1942), J. Immunol. (Am.) 45, 187.
WEIL, A. J. und F. BESSER (1932), Z. Immunitätsföschg. 76, 76.
WEIL, A. J., A. M. MOOS und F. L. CLAPP (1939), J. Immunology (Am.) 37, 413.
WEIL, A. J., I. A. PARFENTJEV und K. L. BOWMAN (1938), J. Immunol. (Am.) 35, 399.
WEIL, E. und A. FELIX (1917), Wien. klin. Wöchr., S. 1509.
WEIL, R. (1913), I. medic. Res. (Am.) 27, 497.
WEINBERG, M. et P. GOY (1924 a), C. r. Soc. Biol. Paris 90, 269.
— — (1924 b), C. r. Soc. Biol. Paris 91, 148, 1140.
WEINECK, E. (1942), Kolloid-Z. 100, 403.
WELLS, G. H. (1908), J. inf. diseases. (Am.) 5, 440.
— (1911), J. inf. diseases. (Am.) 9, 147.
— (1929), The chemical aspects of immunity. 2. Edit. Nueva York.
WELLS, G. H. and TH. OSBORNE (1911), J. inf. diseases. 8, 66.
— — (1913), J. inf. diseases. 12, 341.
— — (1914), J. inf. diseases. 14, 377.
— — (1915), J. inf. diseases. 17, 259.
— — (1916), J. inf. diseases. 19, 183.
WELLS, G. H., LEWIS and JONES (1927), J. infect. diseases. 40, 326.
WENT, ST. und K. LISSAK (1934), Z. Immunitätsföschg. 82, 474.
WESTPHAL, O. (1940), Fermente und Immunchemie. Handb. d. Enzymologie, Leipzig.
WHITE, B. and O. F. AVERY (1913), J. inf. diseases. 13, 103.
WHITE, P. B. (1937), J. Path. a. Bact. (Brit.) 44, 706.
WIEDEMANN, E. (1944), Schweiz. med. Wöchr., S. 566.
— (1945), Schweiz. med. Wöchr., S. 229.
— (1946), Schweiz. med. Wöchr., S. 241.
WIENER, A. S. and M. HERMAN (1939), J. Immunol. (Am.) 36, 255.
WILLIAMS, R. C. and R. W. G. WICKOFF (1945), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 58, 265.
WILLIAMS, J. W., M. L. PETERMAN, G. C. COLOVOS, M. B. GOODLOE, J. L. ONCLEY und S. H. ARMSTRONG (1944), J. clin. Investig. (Am.) 23, 433.
WINKLER, W. und O. WESTPHAL (1944), Z. Immunitätsföschg. 105, 154.

- WOLLMAN, E. et M. BARDACH (1935), C. r. Soc. Biol. Paris 118, 1425.
WITEBSKY, E. (1928), Z. Immunitätsch. 58, 297.
— (1929), Handb. d. norm. und path. Phys. 13, 473.
WITEBSKY, E. und J. STEINFELD (1927), Zentralbl. f. Bakt., I. Orig. 104, 144.
— — (1928), Z. Immunitätsch. 58, 271.
WOLFE, H. R. (1929), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 27, 146.
— (1933), Physiol. Zoology 6, 55.
— (1935), J. Immunology (Am.) 29, 1.
WORMALL, A. (1930), J. exp. Med. (Am.) 51, 295.
WRIGHT, G. G. (1942), J. inf. diseases. (Am.) 70, 103.
— (1944), J. exp. Med. (Am.) 79, 455.
WU, HSEN (1931), Chines. J. Physiol. 5, 321.
WU, HSIEN, L. H. CHENG and C. P. LI (1928), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 25, 407.
— — — (1927), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 25, 853.
WU, H. and S. M. LING (1927), Chines. J. Physiol. 1, 407.
WU, H., P. P. T. SAH and C. P. LI (1929), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 26, 737.
WUHRMANN, F. und Ch. WUNDERLY (1943), Die Bluteiweißkörper in der klinischen Medizin. Basel.
— — (1943), Helvetia medica acta, Suppl. X.
— — (1945), Schweiz. med. Wschr., S. 234.
— — (1946), Schweiz. med. Wschr., S. 251.
- ZIA, S. H., B. F. CHOW and F. TUNG (1938), Proc. exp. Biol. a. Med. (Am.) 38, 688.
ZOZOYA, J. (1932), J. exp. Med. (Am.) 55, 325.
ZOZOYA, J. and J. CLARK (1933), J. exp. Med. (Am.) 57, 21.

INDICE ALFABETICO DE MATERIAS

- Acción de campo como determinante,** 167, 173.
- Acción a distancia,** 87.
- Aglutinación,** 191, 208, 227, 228.
 — precipitación y, 191 a 194.
 — tipos H y O de, 228, 229.
 — — imagen microscópica de los, 228, 229.
- Albúmina, actividad antigénica,** 23, 111.
 — contenido de aminoácidos en la, 123.
 — desnaturalización reversible, 82, 88.
 — diferenciación de globulinas, 112.
 — duplicidad en el mismo suero, 26, 110.
 — función fisiológica, 44, 48.
 — influencia sobre la desnaturalización de las globulinas, 90.
 — reducción de y aumento de las globulinas, 40, 41, 42, 44, 48.
- Alergia,** 5.
- Aminoácidos, aromáticos,** 130.
 — — especificidad de especie, 130.
 — componentes de los anticuerpos, 63 y siguientes.
 — existentes en diversas proteínas, 64, 65, 123 a 125.
 — existentes en globulinas inmunes, 65, 122.
 — marcados por N¹⁵, 47, 63, 78.
- Anafilaxia, activa, duración,** 52, 53.
 — — especificidad, 103.
 — — periodo de latencia, 52.
 — anticuerpos sésiles y, 50 y 51.
 — heredada, 8, 51.
 — pasiva, duración, 67.
- Anafilaxia pasiva, especificidad,** 103.
 — — reversión (pasiva inversa), 50.
- Anticuerpos, véase también globulinas inmunes, 1.**
 — alteraciones de la especificidad por hiperinmunización, 33, 56, 103, 118, 119, 170, 171, 172.
 — cantidad producida respecto a masa antigénica, 5 y ss., 67.
 — capacidad de combinación, 2, 14, 43.
 — circulantes, 2, 20.
 — — periodo de latencia, 4.
 — contra antígenos marcados químicamente, 8.
 — cristalizado, 58.
 — definición, 1.
 — denominación, 2, 192, 230.
 — desespeciación (véase ésta).
 — desnaturalización, por adsorción en el antígeno, 237.
 — — por el calor, 91.
 — — reversible, 88.
 — diferenciación entre capacidad de combinación y de floculación, 91.
 — diversidad de los originados por un antígeno unitario, 178, 182.
 — exentos de proteínas, 21.
 — formación en cultivos de tejidos, 9.
 — — en el organismo, 2, 8, 11, 18, 47, 60 y ss., 65, 78 a 81.
 — — *in vitro*, 10 a 17, 81.
 — — local, 48.
 — función antigénica, 72, 247.
 — imperfectos, 43, 71, 185, 186.
 — inmunes, 1.
 — marcados, 65 a 67, 108.

- Anticuerpos, molécula (véase ésta).
 — mono o polivalencia, 81, 220 a 223.
 — naturales, 1.
 — origen celular, 4 y ss., 60.
 — película (véase ésta).
 — persistencia (véase ésta).
 — separación del antígeno, 79, 245.
 — sétiles, 3, 20, 49, 54.
 — unidad o pluralidad, 230 y ss.
- Antideterminantes, 173, 176 y 186.
- Antígenos, activación, 146.
 — actividad, 159 y ss.
 — concurrencia, 159.
 — específicos de especie, 100.
 — — de especies emparentadas, 102.
 — marcados, 8, 22, 47, 108.
 — peso molecular, 218.
 — procedentes del organismo propio, 115 a 117.
 — de la propia especie, 115 a 117.
 — — diferencias serológicas, 113, 116, 117.
 — proporción con los anticuerpos producidos, 5, 6, 67.
 — recubrimiento por anticuerpos, 217 a 219.
 — zonas de reacción de su superficie, 129, 209, 210.
- Antitoxinas, adsorción en partículas de colodión, 240.
 — calentamiento, 35.
 — capacidad de neutralización, 234, 238, 239, 242, 246.
 — comportamiento electroforético, 32.
 — cristalización, 58.
 — diftérica, 13.
 — — y hemaglutinina, 13.
 — — heterogeneidad, 33.
 — — cristalizada, 58.
 — heterogeneidad, 33, 59.
 — reacción de floculación, 230.
 — — óptimo de la, 230.
- Azoproteínas, 134 y ss.
 — aminoácidos capaces de copulación, 134, 151, 153, 154.
 — componente azoico, 156.
 — — grupos ácidos del, 160, 161, 162.
- Azoproteínas, grupos no polares del componente azoico, 161, 162.
 — componente proteico, 142, 151, 155.
 — — carga con el componente azoico, 144, 153.
 — — exclusión del, 142, 156, 158.
 — máximo de copulación, 144.
 — desencadenamiento del choque por, 157.
 — mínimo de copulación, 154, 219.
 — péptidos como determinantes en las, 126, 168.
 — resultados de la investigación con, 172 y ss.
- B**
- Bushy-stunt, virus de, 229.
 — — precipitación (tipo O), 229.
- C**
- Cadenas laterales alifáticas, 163, 168.
- Cantidad de anticuerpo y masa de antígeno, 5, 66.
- Caseína de la propia especie como antígeno, 118.
- Cerebro (antígenos), aminoácidos, 116, 125, 132.
 — especificidad, 116.
 — lípidos de los, 116.
- Clupeína, 144.
- Coagulininas, 178.
- Cobra (veneno de), 12.
 — contra-antígeno del, 12.
- Colodión (partícula de), adsorción en, 87, 193, 239, 240.
 — — de antígenos y anticuerpos, 87, 193.
 — — serie de componentes, 87, 239, 240.
- Combinación (inmunización de), 145 y ss.
 — esterinas, 147.
 — extractos alcohólicos de órganos, 148, 149.
 — Forssman (antígeno de), 145, 146.
 — fosfátidos, 147.
 — lecitina, 147.
 — — sintética, 147.
 — lípidos, 147, 150.
 — mecanismo de la, 146, 150.
 — sales de metales pesados, 149.

- Concurrencia de los antígenos, 111, 160.
 — de los determinantes, 113, 117, 136, 159, 162.
- Contra-antígenos del Loiseleur, 11 a 13.
 — especificidad, 12.
- Cristalino (antígenos del), 116 y ss., 123, 124.
 — componente lipóideo, 116.
 — contenido de cisteína, 123.
 — especificidad, 116, 123.
- D**anysz, fenómeno de, 242.
- Demolición de los anticuerpos, 52.
 — administrados pasivamente, 51, 68.
 — producidos por vía activa, 67.
- Desespeciación de los anticuerpos, 34, 57, 92.
 — por digestión, 34, 57, 93, 94.
 — por luz ultravioleta, 38.
 — comportamiento electroforético, 34, 92.
 — forma de la molécula, 95.
 — peso de la molécula, 95.
- Determinantes inmuñoquímicos, 99, 122, 126, 158.
 — acción de campo, 78, 167, 173.
 — actividad de los, 172, 173.
 — apolares, 161, 173, 175.
 — cadenas laterales alifáticas, 163.
 — grupos carbonilos y, 162.
 — isomerías de los (véase isomerías).
 — múltiples, 122, 158.
 — — concurrencia de los, 103, 113, 117, 136, 159, 162.
 — tamaño máximo, 128.
 — tamaño mínimo, 126, 127.
- Dipéptidos, 126.
- Disimetría, de la molécula proteica, 75, 82, 85, 128.
 — de la antitoxina diftérica, 95.
 — de la seroalbúmina equina, 86.
 — de la seroglobulina de conejo, 86.
- E**lectroforesis, 24.
 — de proteínas envejecidas, 34.
 — de sueros inmunes, 30.
- Electroforesis, de sueros antibacterianos, 30, 31.
 — — antitóxicos, 32.
 — — calentados, 35.
 — — digeridos, 34.
 — — fotooxidados, 37.
 — — irradiados, 38.
 — de sueros normales, 24, 44.
 — de sueros de diversas enfermedades, 43 y ss.
- Electrolitos en las reacciones de floculación, 234 a 237.
- Enfermedad del suero pasiva inversa, 50.
- Enzimas, función antigénica, 239.
 — neutralización por anticuerpos, 239.
- Especificidad química, 118 y 119.
 — artificial, 133.
 — — por sustitución, 133, 137.
 — — — máximo de copulación, 144.
 — — — mínimo de copulación, 154, 219.
 — — por combinación (véase combinación, inmunización de).
 — natural, 121, 132.
 — inmunológica, 99 y ss.
 — de la hemoglobina, 125, 130.
 — en la hiperinmunización, 33, 55, 103, 118, 119, 170, 182.
 — de las proteínas, específicas de organismo, 118.
 — — de la propia especie, 115 y ss.
 — — — diferenciación, 114 y ss.
 — — del propio organismo (véase isoprecipitinas).
 — — vegetales, 121.
 — — de la seroproteína, 101.
 — — especificidad de especie, 100, 120, 134.
 — — — de especies emparentadas, 102.
 — — — — diferenciación, 102.
 — — — — inmunización cruzada, 104, 105.
 — — especificidades de orden más alto, 107.
 — — — especificidad de mamífero, 109, 114.
 — — especificidades particulares y especificidad de especie, 110, 112, 113.
 — — influencia del calor, 114.

- Espumación, 89.
 — de la ovalbúmina, 89.
 — de la seroproteína, 89.
 — del virus de Lapine, 89.
 — del virus de la peste aviar, 89.
- Esterinas, inmunización de combinación, 147, 149, 150.
- Euglobulinas, 23, 24, 65, 72.
- Extinción, fenómeno de la, 57.
- Fibrinógeno, especificidad, 110.**
- Fibroblastos, producción de seroproteínas, 63.
- Fibroína de la seda, 127.
 — determinantes de, 127.
- Flagelos (de las bacterias), 92, 212.
 — aglutininas de los, 92.
 — — resistencia al calor, 92.
 — — resistencia a la digestión, 92.
 — fijación de anticuerpos a, 212, 213.
- Floculación (reacciones de), véase también precipitinas (reacciones de), 191.
 — aspecto exterior, 193, 197.
 — — transformación del, 193.
 — las dos fases de la, 234.
 — papel de los electrolitos, 234 a 236.
 — número mínimo de partículas, 194, 197.
 — — superficie total con el, 194, 197.
 — tamaño de la partícula, 193, 194 y ss.
 — de virus, 214, 229.
- Formoltoxoides, 243.
- Forssman (antígeno de), 145.
 — estructura química, 145.
 — forma hapténica, 145.
 — — activación, 145, 146.
 — — — por adsorbentes, 146.
 — — — por antígenos proteicos, 146.
- Fosfátidos, inmunización de combinación, 147, 149, 150.
- Fotooxidación de antisueros, 37.
 — antitóxicos, 38.
 — capacidad de floculación, 37.
- Gelatina, 130, 143.**
 — aminoácidos en, 143.
 — función antigénica, 130, 143, 145.
 — productos de copulación antigénicos, 143, 156.
- Globoglucóide, 111.
- γ -globulina, aminoácidos de la, 46.
 — concentrados de, 30, 54.
- Glucósidos, especificidad de, 166, 167.
- Haptenos, 22, 128.**
 — activación, 145.
 — — por adsorción, 146.
 — — por antígenos proteicos, 145.
 — por copulación, 134.
 — especificidad de especie, 129.
- Hemaglutininas, antitoxina diftérica y, 13.
 — virus y (véase virus).
- Hemocianinas, 22, 75, 77, 129.
 — peso molecular, 129.
 — precipitados, 129.
 — unidades subordinadas, 77, 127.
 — zonas de fijación, 129.
- Hemoglobina, 125.
 — actividad antigénica, 130.
 — aminoácidos, 125.
 — contenido de cisteína en, 126.
 — contenido de S en, 126.
 — especificidad de especie, 126, 130.
 — — de especies próximas, 125.
- Hepatitis epidémica, anticuerpos, 55.
- Hidrógeno (enlaces de), 76, 177.
- Hiperglobulinemia, 40, 41, 45.
 — hipoalbuminemia y, 40.
- Hiperinmunización, 33, 55, 103, 118, 119, 170, 182.
- Hiperproteinemia, 40, 46, 47.
- Histidina, 132, 134, 151, 154.
- Histonas, 143.
 — diazotación, 143.
 — función antigénica latente, 143.
 — peso molecular, 143.
- Horror autotoxicus, 115.

Índice de amino, 123.

Inhibición (reacción de), 127, 139, 153, 157, 158, 166.

Inhibición (zona de), 221.

— en la aglutinación bacteriana, 222.

— en el exceso de anticuerpos, 210.

— en el exceso de antígeno, 222.

Inmunes (globulinas), 23, 31, 42.

— como antígenos, 72, 247.

— desespeciación (véase ésta).

— electroforesis, 31.

— — γ -globulinas, 31.

— — — heterogeneidad, 25.

— — — variante L, 34, 45, 46.

— — — variante T, 32, 44, 46.

— formación, en el sistema reticuloendotelial, 60 y ss.

— — en los linfocitos, 47, 62.

— en el metabolismo, 63 y ss.

— molécula, forma, 82, 83, 84, 85, 213.

— — peso, 38, 86.

— — — de tipo caballo, 38.

— — — — de tipo conejo, 39.

— — — — desviaciones, 39.

— y normales, 23, 24, 31, 70 a 73, 249.

— pesadas, 38, 39.

— — desdoblamiento, 56.

— síntesis, 63 y ss., 78, 79.

Inmunes (sueros), 1.

— desnaturalización, 34 a 38.

— — reversibilidad, 88.

— desespeciación, 34, 57, 93 a 97.

— — ventajas terapéuticas, 97.

Isomerías, como determinantes, 162 y ss.

— de posición, 162.

— esteroisomerías, 165.

Isoprecipitinas, 117, 118.

— caseína, 118.

— cristalino, 116, 117.

— extracto de testículo, 118.

— ovalbúmina, 118.

— tireoglobulina, 118, 119.

Isósteras (combinaciones), 167.

Isótopos, como medio de marcar, 69.

Latencia (período de), formación de anticuerpos, 4.

Lecitina, inmunización de combinación, 147.

Leucosis de las gallinas, 33, 34, 45.

— globulina L, 34.

Linfocitos, producción de anticuerpos, 47, 62.

Lipoides, 147.

— en las reacciones de floculación, 91, 149, 150.

— función antigénica, 148, 149, 150.

— en la inmunización de combinación (véase ésta).

Metálicas (sales), inmunización por, 150.

Metanílico (ácido), anticuerpos, 179, 180.

Mieloma (plasmocitoma), 45, 48.

— aumento de globulinas en, 45, 48.

— — lugar de producción, 47.

Molécula de anticuerpo, configuración, 95, 128, 176, 177, 213.

— peso, 38, 86, 95, 242.

— relaciones de posición respecto a las moléculas de antígeno, 219.

— superficie del antígeno y, 209, 213, 214, 215, 217.

Mosaico del tabaco (virus del), 213, 229.

— floculación por anticuerpos, 213, 214, 229.

— — disposición de los anticuerpos, 214.

Nitroproteínas, 134, 137, 140, 141.

Ovalbúminas, electroforesis, 34.

— contra-antígenos, 11, 12, 13.

— isoprecipitinas, 118.

— moléculas, zonas de fijación, 129.

— películas, 86, 89.

— peso molecular, 129.

— racemizadas, 143, 144.

— — copulación con atoxilo, 144.

Parentesco (reacciones de), 121 y ss., 177 y ss.

- Películas monomoleculares**, 84 y ss.
 — de anticuerpos, 86, 129, 215 y ss.
 — — espesor de, 215 y ss.
 — — fijación de antígeno, 87, 96.
 — — superficies de antígenos y, 237.
 — de antígenos, 86, 87.
 — — fijación de anticuerpos, 86.
 — — de varias capas, 86 a 87.
 — — — acción a distancia, 87.
 — — — fijación de anticuerpos, 87.
 — comportamiento de los grupos polares, 85.
 — espesor, 86, 87.
 — de fermentos, 89.
 — de proteínas, 85.
 — — desplegamiento de esferoproteínas, 85, 88.
 — — — reversibilidad, 89.
 — de toxinas y antitoxinas, 96.
- Péptidos**, determinantes de los, 168 a 170, 182.
 — especificidad, 168, 182.
- Persistencia de los anticuerpos**, 52.
 — en anafilaxia, 52.
 — en la fiebre amarilla, 53.
 — en el sarampión, 52.
 — mecanismo de la, 52 y ss., 56.
 — en la enfermedad de Weil, 54.
- Plasmaferesis**, 7, 47, 69.
- Plasma (proteínas del)**, desespeciación, 38.
 — fraccionamiento, 23, 28 y ss.
 — lugar de la formación, 47, 64.
 — metabolismo proteico y, 7, 46, 49, 64, 68.
 — producción por fibroblastos, 63.
 — proteínas tisulares y, 7, 69.
- Polaridad**, 173.
 — de los determinantes, 173, 174.
- Polipéptidos**, cadenas de, 74, 90, 126.
 — ordenación en proteínas, 75, 76.
 — plegamientos en la molécula proteica (forma ovillada), 10, 76, 82.
 — — desplegamiento, 10, 11, 82.
 — — estabilización, 75, 76.
 — poder rotatorio, 75.
- Polisacáridos bacterianos**, 10, 22, 68, 86, 88, 91, 131 y ss., 181, 191, 202, 248.
- Precipitinas (reacción de)**, [véase también *floculación (reacciones de)*], 22, 100, 190.
 — aglutinación y, 191 a 193.
 — análisis de los productos de floculación, 22, 23, 198.
 — bacterianas, 192.
 — equivalencia (zona de), 198, 211.
 — exaltación de la especificidad, por dilución del antisuero, 104.
 — — por exclusión de las precipitinas secundarias, 104.
 — formulación matemática, 211.
 — masa de precipitado, 200.
 — — composición molecular, 202.
 — — contenido de N, 198.
 — — crecimiento, 225.
 — — estructura (teoría reticular), 223, 227.
 — — proporción anticuerpo: antígeno, 202.
 — proporción óptima de floculación, 199, 204 y ss.
 — — de los tipos H y R, 205.
 — — en los métodos α y β , 199, 204.
- Proteínas naturales**, especificidad, 121, 131, 132.
 — espectro de aminoácidos, 123 a 125.
 — función antigénica, 82.
 — índice de amino, 123.
 — molécula, 6, 85, 128.
 — — disimetría, 85, 128.
 — — esférica, 11, 75.
 — — estructura, 74 y ss., 90.
 — — — periodicidad, 129.
 — — — unidades subordinadas, 77, 127.
 — — filamentosa, 11, 75.
 — vegetales, 121.
- Queratina**, 124, 125.
 — aminoácidos, 124.
 — especificidad de especie, 124.
- Reacciones cruzadas**, 56.
- Reaginas**, alérgicas, 2.
 — — carácter de globulinas, 39.

- Reaginas sifilíticas, 39.
 — — peso molecular, 39.
 — — transmisión pasiva, 50.
- Recubrimiento (hipótesis del), 238, 240, 242.
- Reticular (teoría), 223, 227, 235.
- Reticuloendotelial (sistema), producción de anticuerpos, 9, 60 y ss.
- Sangría, nivel de anticuerpos en la, 6 a 8.
- Secundarias (precipitinas), 104 y ss.
 — — eliminación, 106 .
- Seroglobulinas normales, 24 y ss.
 — — aumento y disminución de albúminas, 41, 42.
 — — contenido de lipoides, 47.
 — — electroforesis, 24.
 — — estructura química, 74.
 — — número, 24, 27.
 — — peso molecular, 73.
 — — propiedades, 26.
 — — salado, 23.
- Seroglucoide, 111.
- Seromucóide, 110, 111.
- Seroproteínas [véase también plasma (proteínas del)], 24.
 — — lugar de formación, 47, 48.
- Seroproteínas, número de componentes, 24 y ss., 110, 111.
- Shigella paradysenteriae, 181.
 — — análisis de antígeno, 181.
- Tartáricos (ácidos), isómeros, 165.
- Testículo (extracto de) de la propia especie, 118.
- Tireoglobulina, 118, 119.
- Tirosina, 132, 134, 151, 154.
- Toxina-antitoxina (flóculos de), 244.
 — — carencia de toxicidad, 246.
 — — disociación, 245.
- V**irus, desdoblamiento reversible, 128.
 — — especificidad, 255 y ss.
 — — formas, 76, 77.
 — — hemaglutinación, 250 y ss.
 — — tipos de floculación, 229.
- X** (virus), 229.
 — — precipitación, 229.
- Xantoproteínas, 137.
- Y**odo (especificidad de), experimental, 137.
 — — — fundamentos químicos, 137, 138, 139, 140.

Precio: 65 pesetas