

# AUGMENT DE CRIOAGLUTININES PER ERITROFÈRESI

Comunicació presentada el dia 29 de maig de 1967 per

**J. GRAS i RIERA**

Cap de la Secció d'Immunoquímica del Departament d'Investigació  
de l'Hospital d'Infecciosos de Barcelona

i

**A. M. LLUCH i SÀNCHEZ**

Col·laboradora de la Secció d'Immunoquímica del Departament  
d'Investigació de l'Hospital d'Infecciosos de Barcelona

El 1956, un de nosaltres demostrà que la repetida injecció de globulina gamma humana al conill conduïa finalment a una desaparició d'anticossos precipitants demostrables per doble difusió en agar (GRAS<sup>1</sup>), donant a aquest fenomen el nom d'«inhibició d'anticossos circulants per hiperimmunització». La seva existència fou confirmada el 1960 (GRAS<sup>2</sup>) amb eritròcits humans, *Brucella abortus* i sèrum de cavall. El 1963 (GRAS i WOESSNER<sup>3</sup>) fou investigat en forma més completa, també en el conill, enfront de *Brucella abortus*; en aquest treball s'estudiaren les ones inicials de formació d'anticossos i la seva influència pels canvis o interrupcions de l'estímul antigènic, l'especificitat de l'estat final d'inhibició, el títol d'anticòs en òrgans, la resposta citològica en la melsa i el moll d'os, i la desaparició de l'estat d'inhibició un cop suspesa l'estimulació antigènica. Amb una dosi mínima d'estímul antigènic, almenys en el conill injectat amb eritròcits humans (GRAS i DALMAU<sup>4</sup>), apareix tan sols una corba única, perllongada, amb augment i descens del títol d'anticossos, que porta directament a l'estat d'inhibició. Aquest fenomen fou descrit poc abans per ZDRODOWSKI<sup>5</sup>, simultàniament per STERZL<sup>6</sup>; poc després per HARD<sup>7</sup>, i confirmat per ALIVISATOS i col·laboradors<sup>8</sup>.

La considerable inhibició o fins desaparició dels anticossos circulants s'ha observat, en els treballs del nostre laboratori, generalment després dels 300 dies de la hiperimmunització, amb oscil·lacions depenent dels animals, sistemes i dosis. Per al cas dels antígens proteics<sup>1</sup>, la inhibició s'obtenia amb una dosi total (administrada a petites fraccions durant aquest temps perllongat), molt superior a la necessària per a produir la tolerància immunològica en el període perinatal. El fet interessant és que la inhibició s'obté amb una dosi relativament petita, òptima com a estímul antigènic i que es manté per la seva administració continuada. Això permet d'estudiar en l'animal inhibint l'efecte de l'augment bruscat de la dosi, mantenint-la encara en els límits de la intrínsecament efectiva i no paralitzant.

Una vegada obtinguda la inhibició, un augment de l'estímul antigènic no condueix a una disminució del títol d'anticossos<sup>2, 3, 4</sup>, cosa que indubtablement es produiria, si la inhibició fos deguda tan sols a una combinació de l'anticòs format amb un excés d'antigen circulant i subse-

güent retirada de la circulació. Hem indicat també com la inhibició desapareix en suspendre l'estimulació antigènica. Per tant, això portà a interpretar aquest estat d'inhibició, no pas com una modificació permanent de la cèl·lula immunocompetent, sinó com un estat dinàmic i transitori de la cèl·lula, és a dir, com a resultat d'un equilibri immunològic entre estímul antigènic persistent i resposta en anticossos.

Formulada l'existència d'aquest equilibri immunològic entre estímul antigènic persistent i resposta en anticossos, sembla lògic de pensar que pot establir-se a diferents nivells absoluts, depenent, almenys en part, de la dosi d'estímul antigènic o de la capacitat antigènica dels diferents antigens, cosa que hem vist en els treballs abans esmentats, ja que s'observa la presència d'anticossos a títols baixos o la seva absència. Igualment sembla lògic que, essent un equilibri dinàmic, es pugui trencar pels dos mem-

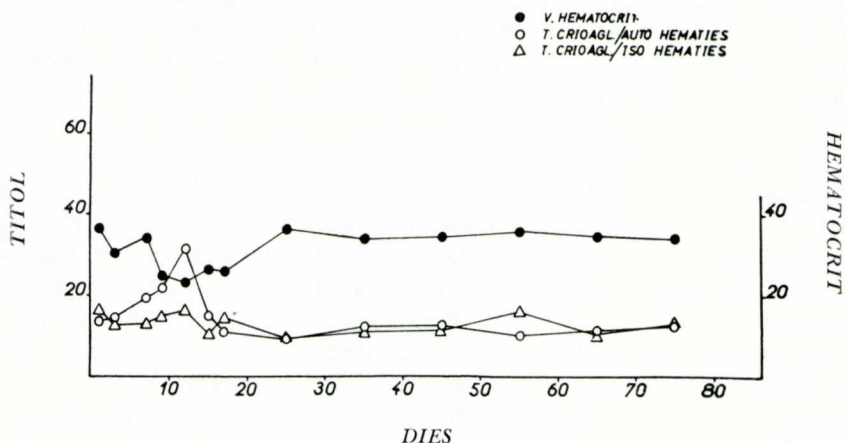


FIG. 1. — Corbes del valor mitjà d'hematòcrit (●) i crioaglutinines, amb autohematies (○) i isohematies (△) en una sèrie d'onze conills sotmesos a l'eritrofèresi

bres de l'equació d'equilibri, és a dir, per una modificació del nombre de cèl·lules immunocompetents o de la seva capacitat de formació d'anticossos o bé pel costat d'una modificació de l'estímul antigènic.

La possibilitat de trencar aquest equilibri per un augment bruscat de la dosi antigènica, l'hem demostrada, com ja hem indicat, en treballs anteriors<sup>2, 3, 4</sup>, i per això era interessant de provar de demostrar la possibilitat inversa, és a dir, de fer-ho per una disminució brusca de l'estímul antigènic.

L'existència de crioaglutinines en pràcticament tots els individus normals és coneguda de temps, però fins fa poc, a partir dels treballs de WIENER, no sabíem que en la gran majoria dels casos són anticossos anti-

antigen I, o sigui que representen un cas d'existència normal d'autoanticossos. Per això poden representar un sistema òptim per a comprovar si el títol es modifica practicant una disminució d'eritròcits, per eritrofèresi, experiència que hem portat a cap en el conill, animal que també presenta normalment crioaglutinines.

Una sèrie d'onze conills foren sagnats amb reinjecció del corresponent plasma, disminuint el valor hematòcrit a un valor mitjà d'un 63% del valor mitjà inicial. El títol de crioaglutinines augmentà d'1/13,9 a 1/31,9 amb autohematies i sense modificació amb isohematies. La diferència entre el valor inicial i l'augment màxim era estadísticament significativa ( $p < 0,01$ ). El títol de cada conill fou determinat per doble dilució en dues sèries intercalades amb dilucions inicials del 1/2 i el 1/3 (fig. 1).

En una altra sèrie d'onze conills practicàrem l'eritrofèresi més moderada, de manera que el valor mitjà de l'hematòcrit baixa a un 74,4 % del valor inicial. El títol de crioaglutinines augmentà de 1/11,6 a 1/24,9,

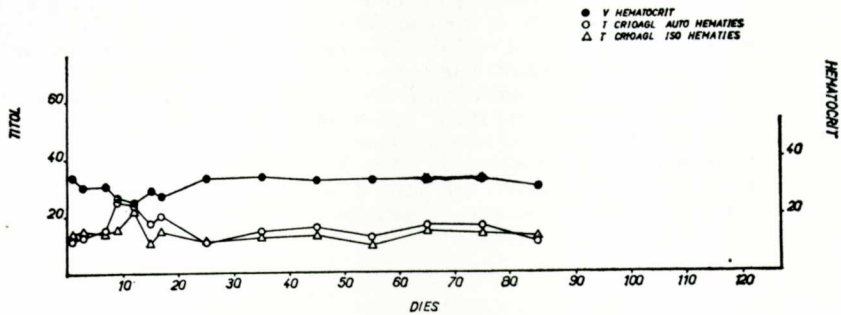


FIG. 2. — Corbes del valor mitjà d'hematòcrit (●) i crioaglutinines, amb autohematies (○) i isohematies (△) en una altra sèrie d'onze conills sotmesos a l'eritrofèresi

amb autohematies, i de 1/14 a 1/21,8 amb isohematies. Les diferències entre els valors inicials i els màxims són estadísticament significatives (fig. 2). Una resposta semblant, l'hem obtinguda en dues sèries més de conills en els quals variava lleugerament alguna de les condicions experimentals.

L'augment de crioaglutinines que es produeix per eritrofèresi és petit, però creiem que té plena significació i no pot atribuir-se a un fet d'atzar, perquè l'hem reproduït en quatre sèries experimentals, que comportaven lleugeres variants de mètrica, però que estadísticament presenten una diferència significativa ( $p < 0,01$ ), perquè és més accentuat amb autohematies que no amb isohematies, i, finalment, perquè es presenta única-

ment, malgrat perllongar l'experiència, en algun cas fins a quatre mesos, en el moment just del descens del valor hematòcrit.

Per tant, creiem que pot acceptar-se com un fet que l'eritrofèresi comporta un augment de crioaglutinines, fet que és una prova més de l'existència de l'equilibri immunològic que hem postulat, i de la seva possible modificació per una disminució brusca de l'estímul antigènic. D'altra banda, aporta també una possible explicació als augments de crioaglutinines que s'observen en clínica humana, almenys en algunes de les seves formes.

#### BIBLIOGRAFIA

1. GRAS, J. — *Inhibición de anticuerpos circulantes en los sistemas proteína-antiproteína por hiperinmunización*. «Rev. Esp. Fisiol.», 12: 251-258, 1956.
2. GRAS, J. — *Le phénomène de l'inhibition d'anticorps circulants par hyperimmunization*. «Rev. Immunol.», 24: 354-366, 1960.
3. GRAS, J. i WOESNER, S. — *Studies on the «Inhibition by hyperimmunization of circulating antibodies»*. «Path. Microbiol.», 26: 439-454, 1963.
4. GRAS, J. i DALMAU, M. — *Antibody inhibition by a minimal dose of antigen and response to a sudden increase of the dose*. «Nature», 210: 430-431, 1966.
5. ZDRODOWSKI, M. P. — *Essai d'analyse physiologique de quelques processus infectieux et immunologiques*. «Rev. Immunol.», 21: 341-355, 1957.
6. STERZL, J. — *Long term immunization. I. Decrease of antibody by everyday immunization*. «Excerpta med.», Sect. IV, 9: 595, 1956.
7. HARD, S. — *The decrease in the concentration of precipitating antibodies in rabbits after long-term antigen administration*. «Acta Allerg.», 13: 1-7, 1959.
8. ALIVISATOS, G. P.; MARKETOS, N. and VAVA, Z. — *Die Immunitätsparalyse bei Brucellosen*. «Z. Immun. Forsch.», 122: 291-307, 1961.

#### DISCUSSIÓ

Dr. ALEMANY

En els casos de sensibilitat a la poli, es donen moltes injeccions de poli, una cada cinc dies; no s'arriba a una immunització completa, de manera que si reacciona bé, disminueix, però no desapareix. ¿Es tracta d'un cert grau de tolerància? No en tots els casos, perquè hi ha casos en què amb poques injeccions de poli s'obté una immunització, però, generalment, cal donar injeccions anys, i mesos. ¿Es tracta d'un fenomen de tolerància més que d'immunitat pròpiament dita? Pregunta també si han trobat crioglobulines positives convincents, ja que són normals en la majoria dels individus. Demana si en el cas de sensibilitat al fred amb trastorns clínics, han vist una profusió més alta de crioglobulines.

Dr. PERMANYER

Demana una explicació de la tècnica emprada per a la determinació d'aquestes crioaglutinines.

Dr. GRAS

Diu que cal parlar de crioaglutinines, no de crioglobulines. De crioglobulines, no sap si n'hi ha en els conills. En l'home s'ha arribat a la conclusió que tots tenim crioglobulines en mínima quantitat. Sembla evident que hi ha una relació entre l'augment d'aquestes crioglobulines i alguns fenòmens al fred, però no té res a veure amb el que han fet ells, que han investigat variacions de crioaglutinines. Quant al problema de la sensibilitat a la poli, no en té cap experiència. Cal parlar d'anticossos de tipus precipitant, aglutinant, etc., no dels fenòmens de sensibilització en què intervenen altres factors, com el de transferència, etc. No tenen cap experiència directa en això. Pel que saben, sembla que passa el mateix. O sigui, que l'estímul antigènic perllongat dóna lloc també a la desaparició d'aquests fenòmens, de la mateixa manera que dóna lloc a la desaparició de l'anticòs, del macro-anticòs, o de l'anticòs 7S.

Quant a la tècnica, és ben senzilla: han fet totes les titulacions en dues sèries intercalades, començant en dilucions d'1 × 2, i d'1 × 3, i afegint 0,1 ml de suspensió l'eritròcit a l'1 % per cada 0,5 ml de dilució. Mantenen, almenys, 16 hores en nevera, temperatura de 4 graus, i després fer la lectura molt ràpidament. La crioaglutinina desapareix amb relativa facilitat. Si ho agitem i ho deixem estar un moment, la crioaglutinina desapareix. Només cal fer la valoració global del títol límit i no la intensitat del fenomen; moltes vegades en les primeres dilucions queda al fons del tub un aglomerat d'eritròcits relativament difícil de desfer. S'ha d'anar amb compte, perquè moltes vegades es donen falses crioaglutinacions, i ara que tenen una experiència llarga en això, no creuen que els resultats siguin deguts a errors de lectura. Precisament la primera sèrie, que era feta amb 18 conills, va sortir meravellosa. I com que és un fenomen que pot tenir un extraordinari interès, en volen estar molt segurs. Actualment, ja n'han fet 4 sèries; la primera, com han dit, encara sortia molt més manifesta que aquesta, potser precisament per no conèixer bé la tècnica. Fer la prova amb auto i isohematies fou inicialment per obtenir un major marge de seguretat. En el cas de l'home sembla que hi ha relació entre l'antigen I i els antigens de grup. O sigui, que llavors potser es com-

prendria per què troben diferències. En el cas del conill, no sap quina explicació hom pot donar, però és evident que amb antihematies aquest fenomen es veu molt més que amb isohematies. Adhuc hi ha sèries, com en la primera, en què no es veu res amb isohematies i, en canvi, amb autohematies és significativa. Han fet un estudi estadístic amb tots els conills, que arriben ja a 70, de la significació de la diferència entre el títol de crioaglutinina inicial i el corresponent al mínim de valor hematòcrit, i surt una diferència netament significativa. Totes aquestes diferències, bé que semblen petites, s'han de valorar tenint en compte que corresponen a dues sèries intercalades. L'experiència es perllonga molt, fins a dos mesos, i no es torna a observar res, ja que les corbes són pràcticament paral·leles; només es dissocien en aquests moments en què hi ha la baixa d'eritròcits. Creuen que és lògic que aquest augment sigui petit; no es pot esperar un augment gran. I és una dada més a favor precisament d'aquesta idea d'ells de l'existència d'un equilibri immunològic que pot trencar-se, com han demostrat experimentalment en sentit invers, o sigui per augment bruscat de l'estímul antigènic. Aquí és un cas invers, un equilibri amb autoanticossos normals que ells trenquen al revés, és a dir, per disminució brusca de l'estímul antigènic.