

Sesión científica del día 4 de mayo de 1931

PRESIDENCIA DEL DR. PI SUÑER

Los lipoides en la inmunidad.

POR EL DR. P. GONZALEZ

Deseamos demostrar en esta conferencia que los lipoides pueden actuar como antígenos completos, sin que sea necesario para ello la colaboración de las proteínas, como hasta aquí se había creído. Nuestras ideas sobre este punto se basan sobre una serie experimental de hechos observados en colaboración con el Dr. D. M. Armangué.

Entrando ya en materia, debemos definir primero el alcance que nosotros damos a las palabras que componen el enunciado: "Los lipoides en la inmunidad", generalmente se definen, los lipoides, como sustancias que tienen con las grasas una cierta analogía, teniendo como propiedad común la de ser solubles en los mismos disolventes.

No se nos escapa que en esta definición no están comprendidos algunos lipoides que no gozan de esta propiedad, y que en ella pueden figurar sustancias que no tienen con los lipoides relación alguna.

En todas nuestras experiencias hemos empleado los extractos llamados lipóidicos, obtenidos por procedimientos similares a los empleados en la preparación de antígenos para la práctica de la reacción de Wassermann. En muchos de ellos se ha comprobado, por reacciones especiales, la ausencia completa de proteínas.

Muchas veces el material empleado ha sufrido el tratamiento previo con la acetona, utilizando como disolvente final el alcohol absoluto. En nuestros extractos, por lo tanto, podemos asegurar que están presentes las lecitinas. No dudamos que con cuidado más exquisito en los procedimientos de obtención y purificación de las sustancias obtenidas, podrán ser un día más precisos los resultados obtenidos.

Con los materiales obtenidos en la forma indicada se han hecho las investigaciones inmunológicas, estudiándolas solamente bajo el punto de vista antigénico.

Aceptando como definición de antígeno aquella que dice que debe ser considerada como antígeno, toda sustancia que, introducida en los tejidos y en la circulación de un animal, es capaz de engendrar o provocar, más o menos pronto, la aparición en la sangre de sustancias llamadas anticuerpos, capaces de combinarse específicamente con el mismo antígeno o sustancia inyectada.

El Dr. Böez, profesor de la Facultad de Medicina de Strassbourg, en una conferencia titulada "Las teorías físico-químicas de la inmunidad", nos da una idea completa de las condiciones que hasta ahora se consideraba debía reunir una sustancia para que pudiera ser considerada como antígeno completo, para llenar todas las condiciones indicadas en la definición dicha anteriormente.

No todas las sustancias extrañas al organismo, tóxicas o no, tienen el poder de producir anticuerpos; pero por regla general todas las sustancias antigénicas son proteínas, y hasta ahora dice el Dr. Böez, no ha sido demostrado que sustancias no proteicas hayan manifestado aisladamente una real actividad antigénica y podido producir anticuerpos específicos. Por el contrario, se admite que con todas las proteínas solubles, a condición de reservar el nombre de proteína o los agregados coloidales que contienen la totalidad de los ácidos amínicos que entran en la composición de las proteínas completas, son antigénicas.

El estado físico-químico de la molécula proteica determina, en cierto modo, su poder antigénico. La estabilidad del antígeno, parece ser una condición importante de su actividad. La coagulación completa o irreversible priva a las sustancias proteicas de su poder antiséptico, o po-

niéndose probablemente a su penetración hasta el lugar celular de formación de los anticuerpos. Pero si la coagulación es reversible, la proteína redisuelta vuelve a ser otra vez antigénica, a condición de que ella no haya sufrido alteraciones profundas (desnaturalización). Así el suero coagulado por el alcohol, puede ser redisuelto en agua después de la eliminación del alcohol y dar una solución activa. Por el contrario, la albúmina de huevo coagulada por el alcohol, prácticamente irreversible, está desprovista de poder antigénico. Las sustancias proteicas no coagulables por el calor y que no son alteradas de manera apreciable por la ebullición, como la caseína, las proteínas vegetales y las mucinas pierden sus propiedades antisépticas. Las proteínas bacterianas, lo mismo que las proteosomas vegetales conservan el poder de engendrar anticuerpos después de un tratamiento previo con alcohol.

La integridad de la molécula proteica parece ser una condición necesaria para su actividad como antígeno.

Hemos dicho que las proteínas están constituidas por combinaciones de ácidos amínicos. Los ácidos amínicos no son antígenos. El poder de producir anticuerpos desaparece durante la dislocación de la molécula proteica en sus elementos amino-ácidos. Se ignora, aún a qué grado de descomposición corresponde la desaparición de las propiedades antigénicas. Ciertos autores, no obstante, han atribuido actividad antigénica a las peptonas, a los polipeptidos y a los mismos ácidos amínicos.

Estos resultados deben mirarse con reserva, porque la mayor parte de las experiencias han sido conducidas con productos de digestión difíciles de obtener puros, y debe tenerse en cuenta también, que la actividad antigénica se ha demostrado, generalmente, valiéndose de reacciones anafilácticas, sin considerar que la mayor parte de estas reacciones pueden ser producidas, según ha demostrado Arthus, por la simple inyección de peptonas o de diversos productos de la descomposición de las albúminas.

Pero, si los ácidos amínicos, por si solos son incapaces de engendrar anticuerpos, se comportan como un factor esencial en la determinación del carácter antigénico de las sustancias proteicas. Parece que el poder antigénico de las proteínas está ligado a la presencia de ácidos amínicos aromáticos. Así se explicaría que la gelatina está desprovista de esta propiedad. Esta sustancia está, en efecto, caracterizada desde el punto de vista químico, por la ausencia de radicales aromáticos. No contiene ni triptófano ni tirosina, y si una pequeña cantidad de fenilalanina. Según Vaughan, las sustancias proteicas pueden ser divididas en dos fracciones, tóxicas y no tóxicas; la primera, que contiene los radicales aromáticos, es la sola antigénica.

Las toxinas bacterianas y vegetales, cuyo poder antigénico es bien conocido, y a pesar de que su naturaleza proteica ha sido puesta en duda algunas veces, cree la casi totalidad de los investigadores, que el poder antigénico, no está demostrado de un modo indiscutible, más que para las sustancias proteicas, por lo difícil que resulta obtener sustancias orgánicas, limpias de toda traza de proteínas.

En cuanto a los lipoides, es comprensible que desde larga fecha se haya querido estudiar su papel como antígeno (dando a la palabra antígeno el valor de la definición escrita), sobre todo después del descubrimiento de la reacción de Wassermann. En 1912, Fritzgeralt y Leathes, en 1913, Thich y Embleton, estudiando los lipoides extraídos de los glóbulos rojos obtuvieron resultados negativos. Joy y Adler (1908) estudiaron con los mismos resultados los lipoides del suero.

En 1914, Kust y Meyer demostraron que los extractos lipídicos de gusanos parásitos no hacen aparecer anticuerpos (reveladas por la anafilaxia) sin la condición de contener albuminoides.

Bang y Forsmann, en 1906, del extracto etéreo de los estromas de glóbulos rojos, aislaron una sustancia que, inyectada a los animales, provocaba la formación de una hemolisina específica. La experiencia fué confirmada por Landsteiner y Dantwits. Frouin, en 1907, obtenían también una hemolisina por inyección de extracto lipídico de glóbulos, diferenciándose del anterior en que, el antígeno estaba constituido por la parte soluble en acetona. En esta experiencia, Frouin demostraba que los estromas quedaban desprovistos del poder hemolisinógeno, pero unidos al líquido lipídico aumentaban su poder en seis veces. Dicho inmunólogo fué el primero en presentar el concepto de asociación de albúminas y lipoides.

Bergel, en 1918, obtuvo por la inyección a diferentes animales de extractos etéreos de glóbulos, diversas hemolisinas tan activas como las producidas con la inyección de glóbulos enteros.

Wang, en 1919, demostró que el poder antigénico de los lipoides extraídos por el éter de los glóbulos de caballo, era superior al producido por el residuo albuminoso de la extracción.

Wang parece haber demostrado, según Ribelire y Miller, que los lipoides de clara de huevo son incapaces de provocar la formación de anticuerpos.

Much, Sieber y Kurt y Meyer, están de acuerdo en que los lipoides del bacilo tuberculoso dan anticuerpos. Sus experiencias, sin embargo, son contradictorias. Fraccionando los lipoides, los antígenos más activos son, según Much, las grasas neutras. Estas, según Kurt y Meyer, no tienen ninguna actividad.

De estas experiencias contradictorias no cabía considerar de un modo incontrovertible a los lipoides como antígenos verdaderos. Pick, Ehrlich, Vachs y Landsteiner, habían ya opuesto a las conclusiones de Bang y Forsmann el siguiente reparo: puede ser que el antígeno sea una sustancia no lipóide, arrastrada por los lipoides en sus disoluciones.

Si la primera parte de la definición de antígeno, por lo que se refiere a los lipoides, no estaba, como hemos visto, demostrada la condición que éstos tienen de combinarse a los anticuerpos obtenidos con antígenos normales, ha sido largamente estudiada.

En 1911, Forsmann descubrió el hecho siguiente: los conejos inyectados con suspensiones acuosas de órganos de cobayo, caballo, gato, etc., producen anticuerpos capaces de hemolizar los glóbulos rojos de carnero. Después de un estudio detenido, se vió que estos antígenos están presentes en muchos animales, y en otros no. Encontrándose además de las ya anotadas en el perro, gallina, ratón, tortuga, etc., y en cambio no se encuentran en el buey, cerdo, hombre, palomo, etc.

Estos antígenos fueron estudiados por Doerg y Pich, que comprobaron la resistencia del antígeno al alcohol. Sentz Georgy, usando extractos alcohólicos para sus experimentos. Andelli y sus colaboradores comprobaron que los extractos alcohólicos de estos antígenos de Forsmann, están desprovistos del poder de producir anticuerpos cuando son inyectados a los conejos.

Estos autores afirman que los anticuerpos pueden ser generados con la inyección del residuo insoluble dejado por el alcohol, a pesar de su inactividad contra los anticuerpos *in vitro*.

Landsteiner, Taniguchi y nosotros hemos obtenido resultados similares.

En el curso de todos estos trabajos anotados, se habían conquistado, sin embargo, varios hechos: 1.º El alcohol no destruye el antígeno. 2.º La porción soluble en alcohol (lipóide), no engendra anticuerpos. 3.º El residuo albuminoso insoluble, genera anticuerpos, pero no reacciona frente a los mismos. 4.º Frente a estos anticuerpos reacciona la porción soluble en alcohol. Un estudio completo sobre esta cuestión, ha sido publicado, en 1921, en una revista inglesa por Taniguchi.

Hemos visto anteriormente que Kurt y Meyer (1914) habían demostrado que los lipoides de gusanos parásitos no engendran anticuerpos si no van acompañados de sustancias albuminoideas.

Landsteiner, intentó explicar los hechos conocidos, considerando los antígenos heterólogos como compuestos de dos partes combinadas entre sí y capaces de ser separadas por la acción del alcohol. Una parte sería una proteína, y es necesaria para la producción de anticuerpos. La otra sería alcohol soluble, quizás un lipóide, y tendría el grupo específico, pero sin poder antigénico marcado, y sería activo como antígeno, al combinarse con las proteínas.

Con el fin de continuar el curso de nuestra disertación, y según los argumentos de Landsteiner, expondremos unas pocas ideas sobre la especificidad, y las diferentes maneras como ésta puede ser modificada.

Por regla general, los antígenos capaces de engendrar anticuerpos, están caracterizados por la especificidad de sus reacciones inmunológicas.

Sin embargo, la diferenciación específica, es tan más acusada cuanto los antígenos comparados pertenecen a proteínas procedentes de especies más alejadas entre sí en la escala de los seres vivos.

Entre especies muy vecinas la diferenciación inmunológica es frecuentemente difícil de poner en evidencia. Así, por la reacción de las precipitinas, puede distinguirse fácilmente la sangre humana de la del caballo, siendo bastante más difícil diferenciar la misma sangre de la de los monos inferiores, y casi imposible diferenciarla con certeza de la de los monos antropoides.

Puede observarse, no obstante, en una misma especie animal pluralidad de antígenos y encontrar un mismo antígeno en especies diferentes. Como ejemplos elocuentes de lo que acabamos de anotar, citaremos los cinco antígenos que se pueden diferenciar en el huevo de gallina y las proteínas de los cristalinos de diferentes animales que no pueden distinguirse inmunológicamente.

La especificidad actualmente debe relacionarse más con la especie química que con la especie zoológica o botánica de que procede el antígeno.

Las reacciones de grupo observadas en bacteriología, en los antígenos de Forssmann y en reacciones de precipitinas, se explican por la presencia en los diferentes antígenos de proteínas idénticas presentes en los diferentes casos observados.

Resumiendo: la especificidad debe ser interpretada desde el punto de vista químico y como los antígenos deben sus propiedades a las proteínas, se puede ver que la variedad infinita de los caracteres de especificidad está ligada a la complejidad extrema de las proteínas. Las proteínas ofrecen una variedad de composición insuficiente por replicar las innumerables manifestaciones de especificidad.

Los antígenos pueden desnaturalizarse, creando una especificidad nueva. En 1903, Yros llamó ya la atención sobre el hecho de que bastaran mínimas alteraciones sufridas previamente por el material bacteriano inoculado en los animales, para que éstos puedan repercutir sobre los anticuerpos formados.

Se ha empleado el calor y acciones químicas por diferentes autores y se ha podido demostrar muchas veces el cambio de especificidad.

Landsteiner y sus colaboradores han trabajado mucho en este sentido y han dado el nombre de *haptenes* a los radicales químicos capaces de combinarse con las sustancias proteicas dándoles caracteres específicos nuevos.

De esta manera se han podido elaborar antígenos diferentes con los tres ácidos tartáricos (levo, dextro inactivo).

Considerando Landsteiner los lipoides como *haptenes* capaces de modificar la especificidad de las proteínas, desarrolló en 1923, una serie de experimentos, mediante los cuales, llegó a demostrar que la porción soluble en alcohol, de los antígenos de Forssmann es incapaz por sí sola de engendrar anticuerpos. Al ser mezclada a una cantidad de suero de cerdo o suero humano antes de la inyección, provoca la aparición en la sangre del conejo, de los anticuerpos correspondientes. La inyección del suero humano y de cerdo no acusa nunca la formación de hemolisinas.

En sus conclusiones, Landsteiner hace responsable de los efectos inmunizantes a las proteínas, cuya especificidad sería modificada por la parte soluble en alcohol de los anticuerpos de Forssmann.

Recientemente Cesari (mayo 1930) ha repetido, sin conocerlas, las experiencias de Landsteiner, empleando como proteína para mezclar a los lipoides, suero de bué, de cerdo y de conejo.

En sus conclusiones, este autor indica como condición precisa para la obtención de anticuerpos, que es indispensable que la proteína sea heteróloga, siendo indiferente la procedencia del lipóide empleado, que puede pertenecer incluso a la misma especie productora de los anticuerpos. Hechos parecidos se han podido demostrar con los hidratos de carbono. Se sabe que el pneumococo comprende pluralidad de razas que pueden ser diferenciadas entre sí por reacciones de aglutinación y precipitación. Averi y Heilderberger han aislado una proteína común a todas ellas, y muchos polisacáridos especiales y característicos de cada una de las razas. Según estos autores, los antígenos pneumocócicos estarían constituidos por un complejo formado por una proteína común, de la que dependería la especificidad de grupo, y de hidratos de carbono, los cuales marcarían la especificidad de raza.

Hidratos de carbono específicos para el pneumococo han podido ser extraídos de las gomas vegetales (goma arábiga), de la levadura de cerveza, etc.

Combinando una proteína con el polisacárido aislado de la goma de acacia, el compuesto formado da la reacción de precipitina a la dilución de 1/25.000 en presencia del suero antipneumocócico II y que no da precipitado con el suero antipneumocócico I.

Como se ve, la importancia señalada a las proteínas por los diferentes autores que han investigado la constitución química de los antígenos es enorme.

Turró, inolvidable maestro, en un libro titulado *Fermentos defensivos en la inmunidad na-*

tural y adquirida, no está conforme con las consecuencias teóricas que de los hechos explicados en esta forma pueden derivarse. Turró defendía siempre la especificidad debida a la especie química y consideraba a las bacterias como formadas por coloides, en los que estaban representados los lipoides, los hidratos de carbono, las proteínas y cada una de estas especies diferenciadas, tenía una norma especial de anabolizarse.

Faltaba la prueba experimental en lo tocante a los lipoides y a los hidratos de carbono, ya que las pruebas que se poseen respecto a las proteínas, parecen irrefutables.

Nosotros creemos haber demostrado que los lipoides son antígenos completos, es decir, son substancias que, introducidas en los tejidos o en la circulación de un animal, engendran o provocan la aparición en la sangre de anticuerpos capaces de combinarse específicamente con ellos.

Linossier, en un libro intitulado "*Los lipoides en la infección y en la inmunidad*", después de analizar los resultados contradictorios de los trabajos que ya hemos analizado anteriormente, dice: "Que para obtener la prueba de que en una mezcla compleja es a los lipoides que corresponde la acción antigénica, no es suficiente constatar que, después de la extracción y purificación, estos lipoides son antígenos, sino, que es preciso a demás.

1.º Que se encuentre condensada en ellos sensiblemente toda la actividad antigénica de la mezcla de que han sido extraídos; y

2.º Que el residuo de la extracción de los lipoides haya perdido todas sus propiedades de antígeno.

Como hemos dicho anteriormente, la segunda de las condiciones ha sido demostrada por diversos autores, y entre ellos Sordelli y sus colaboradores, y Landsteiner.

Sachs, en 1925, trabajando con lipoides bien definidos, lecitina y colestérina, demuestra que pueden actuar como antígenos mezclados con proteínas y aunque supone que la proteína actúa de remolcador para el lipóide, después de formar con el *in vitro* un compuesto lábil por absorción, la proteína protege el lipóide contra las proteínas plasmáticas del animal generador, permitiéndole llegar a los tejidos productores de anticuerpos.

La idea madre que presidió la orientación de nuestras investigaciones (González--Armangué 1930), es la siguiente: cuando se inyectan glóbulos rojos de carnero a un conejo para obtener hemolisinas, los lipoides que tienen los glóbulos, están fijados sobre el estroma de los mismos. Si inyectamos lipoides emulsionados con agua, éstos pueden fijarse sobre las células, o bien pueden ser rápidamente eliminados del medio interno.

Entonces decidimos substituir la materia fijadora del estroma, por otra substancia inerte que gozase de esta propiedad, y utilizamos desde el primer momento el caolín.

Los primeros ensayos fueron contradictorios, faltos de una técnica precisa para asegurar la fijación de los lipoides.

Para la obtención de éstos, hemos utilizado la técnica de Landsteiner, que explicaremos seguidamente. Esta tiene la ventaja de ser conocida, y comprobada la condición de no producir anticuerpos los lipoides obtenidos con ella, cuando se inyectan emulsionados solamente con solución salina.

La técnica de Landsteiner es como sigue: 150 gramos de riñón de caballo, por ejemplo, son triturados finamente; a la pulpa se añaden 750 c. c. de alcohol de 95° y la mezcla permanece 2 días a la temperatura ordinaria. La suspensión se filtra, y al residuo se le añaden 450 c. c. del mismo alcohol. El primer extracto es evaporado hasta sequedad a baño-maría. Entonces se disuelve en el filtrado de la segunda extracción por el calor.

Nosotros filtramos en caliente y evaporamos hasta sequedad, parte en presencia de caolín, y parte, la que sirve de control, sola.

Los primeros resultados obtenidos y que comunicamos al Primer Congreso Internacional de Microbiología de París eran ya muy halagadores.

Como animal suministrador de anticuerpos empleamos el conejo. Como anticuerpos, los heterólogos de Forsmann procedentes del riñón de caballo y de cobayo y los anticuerpos investigados, las hemolisinas para los glóbulos rojos de carnero.

La investigación y titulación del poder hemolítico se hacía después de recibir el conejo una sola inyección.

Los resultados obtenidos en tres series de conejos fueron:

1. ^a serie	1/115	—	1/300	—	1/600.	} conejos inyectados con lipoides absorbidos por caolín.
2. ^a "	1/150	—	1/300	—	1/500.	
3. ^a "	1/100	—	1/20.			

En las tres series de conejos (9 conejos) inyectados con lipoides solos no se encontró poder hemolítico diferente al de los conejos normales.

Recientemente, y en nota presentada a la Sociedad de Biología de Barcelona, comunicamos los resultados obtenidos, utilizando en vez de una sola inyección, cinco inyecciones. Observando que la formación de los anticuerpos empieza del 4.º al 6.º día, después de la última inyección.

El título hemolítico máximo obtenido en tres conejos inyectados con lipoides de riñón de caballo absorbidos por el caolín, son: 1/1.200 — 1/8.900 — 1/2.000. Los conejos inyectados con los lipoides solos y los inyectados solamente con caolín, han dado siempre hemolisis negativa a la dilución de 1/100.

Hemos obtenido resultados parecidos utilizando lipoides de riñón de cobayo y de glóbulos rojos de carnero.

En los sueros de los conejos de estas últimas series hemos investigado el poder floculante frente a los lipoides empleados, la fijación del complemento, la toxicidad para el cobayo.

El suero procedente de los conejos tratados con los lipoides absorbidos por el caolín se comporta como los sueros de conejos tratados con antígenos normales (emulsión fresca de riñón de cobayo o de caballo, glóbulos rojos de conejo) en cuanto se refiere a la reacción de floculación y fijación del complemento. Por lo que afecta a la toxicidad para el cobayo, los sueros hemolíticos con títulos superiores a 1/2.000, se han comportado como no tóxicos. Como control para pruebas de toxicidad, hemos utilizado sueros obtenidos con antígenos normales de riñón de cobayo o de glóbulos rojos de carnero, con títulos hemolíticos algunas veces inferiores a 1/200.

Las pruebas de floculación, de fijación del complemento y de toxicidad de los sueros obtenidos en las series experimentales testigos (conejos inyectados con lipoides solos o con caolín), han sido siempre negativos.

Observada la diferencia que existe referente a la toxicidad para el cobayo, entre los anticuerpos obtenidos con lipoides absorbidos por el caolín (no tóxicos) y los anticuerpos obtenidos con los antígenos normales (tóxicos), nos ha parecido conveniente estudiar el suero preparado con la maceración proteica del riñón, después de numerosos lavados con alcohol.

El suero de conejo tratado con 5 inyecciones de esta maceración (una sola experiencia) ha dado un título hemolítico de 1/400 y 1/600, y se ha mostrado muy tóxico para el cobayo, al que le produce la muerte, con los síntomas característicos, idénticos a los obtenidos con los sueros preparados con antígenos normales, y a las mismas dosis.

Con estos sueros, procedentes del residuo albuminoso, no se han obtenido floculaciones, ni reacciones de fijación del complemento positivas.

Hemos observado en estos sueros una precipitación activa para la maceración albuminoide de que proceden, y para los antígenos normales preparados con riñón de cobayo.

Actualmente estamos aplicando esta nueva técnica de estudio de los antígenos de Forsmann a los lipoides bacterianos y a los parásitos superiores, del resultado de los cuales daremos cuenta posteriormente.

Creemos haber demostrado con estas experiencias que los lipoides pueden ser considerados como antígenos completos; que las proteínas no son necesarias como antígenos para la generación de los anticuerpos que intervienen en la hemolisis, reacción de floculación y fijación del complemento. Hemos demostrado también que en los lipoides se encuentra sensiblemente toda la actividad antigénica para la producción de los mismos anticuerpos, con lo que creemos haber conseguido las dos condiciones exigidas por Linoissier, que hemos citado anteriormente: