

ESTUDI DE LES IMMUNOGLOBULINES

Taula rodona tinguda el dia 14 de maig de 1970,
amb la participació dels doctors

RUBEN BINAGHI

del Collège de France (París)

RAFAEL ORIOL i PALOU

del Collège de France (París)

FERNANDO ORTIZ MASLLORENS

de la Clínica de la Concepción (Madrid)

JORDI GRAS i RIERA

de l'Hospital de Nostra Dona del Mar (Barcelona)

J. VIÑAS i RIERA

Director del Servei d'Hematologia de l'Hospital
de la Santa Creu i de Sant Pau (Barcelona)

J. LL. RODRÍGUEZ i SÁNCHEZ

Adjunt a la Unitat d'Immunologia del Servei d'Hematologia
de l'Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau (Barcelona)

i

P. GARCÍA i CALDERÓN

Adjunt a la Unitat d'Immunologia del Servei d'Hematologia
de l'Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau (Barcelona)

Dr. VIÑAS

Em plau de manifestar la meua satisfacció per la presència en aquesta taula del doctor BINAGHI i del seu ajudant, el doctor ORIOL; del doctor ORTIZ MASLLORENS, ja ben conegut pels seus treballs immunològics, i del doctor GRAS, ben conegut a casa nostra pels seus estudis de les proteïnes en general i per la immunologia en particular, i des d'ara invito els presents perquè amb llurs suggeriments, consells i crítiques puguem obtenir l'elaboració de la manera més pura possible d'aquestes immunoglobulines, especialment la IgE.

Dr. BINAGHI

La pregunta que fa el doctor VIÑAS es refereix a quins serien els mètodes per a preparar aquestes immunoglobulines amb el fi d'emprar-les, ja sia per a la preparació d'antisèrums, ja sia com a patrons de comparació en fer les anàlisis, que en realitat és la cosa buscada per la investigació. Talment, per a escatir en alguns estats patològics quines són les concentracions de les diverses classes d'immunoglobulines. Evidentment, el problema s'ha complicat molt en aquests darrers anys amb el coneixement de l'heterogeneïtat de totes aquestes proteïnes. No es tracta ja de tipificar l'anticòs o de dosificar la IgG o la IgM, sinó que cal anar també més lluny, i el tipus d'investigació per a desenvolupar en els anys vinents és el de tipificar les distintes subclasses. Particularment en patologia humana deuen haver-hi diverses correlacions entre la presència d'anticossos o de gamma-globulina no específica en certs estats patològics en relació amb alguna de les subclasses. És a dir, ja no n'hi ha prou de dir que hi ha un augment d'IgG en certs estats. Caldrà, per a tenir idees més clares sobre l'etiologia i el quadre clínic, saber quines són les subclasses i, probablement, quins són els tipus de cadenes L i H que es presenten, problema que el doctor VIÑAS planteja per tal de disposar d'aquests tipus de reactius, d'interès per a tots els serveis d'immunologia. Això és força complicat i no se sap prou bé quina és la seva evolució final, perquè per a obtenir determinats antisèrums com l'anti-IgG, l'anti-IgM i l'anti-IgA hom pot emprar mètodes de purificació relativament simples que tothom va emprant: de

cromatografia amb reïnes de bescanvi iònic, el Sephadex, etc. Però per a arribar més al detall i obtenir subclasses o les immunoglobulines que hi ha en petita quantitat, caldrà emprar proteïnes de mieloma, car és l'única manera de tenir-ne una certa quantitat en estat de puresa. I això planteja el gran problema. Les proteïnes de mieloma són individuals, i són particulars en relació amb aquest mieloma, la qual cosa crea una complicació que, de moment, des del punt de vista immunoquímic, no es veu molt bé la solució a un nivell suficient de precisió. Tot sovint hom prepara un antisèrum contra una proteïna de mieloma, i com bé fou dit durant la presentació, la cosa que l'animal reconeix són aquells determinants que hi ha en gran quantitat en aqueixa proteïna, però que són particulars d'ells i no d'altres proteïnes, de forma que quan, després, hom fa la comparació amb sèrums normals, hom troba que no reconeixen certes coses que són importants; i, un altre problema més greu, és que l'estàndard que s'empra determina tota la gamma de valors que es troba en funció d'aquests antígens especials i no en funció de la mitjana de tots els antígens. Aquest problema de moment és bastant complicat. Caldria tenir molts mielomes i fabricar una espècie de proteïna normal a partir d'una barreja de molts mielomes. Això obliga a tenir una seroteca al més vasta i al més àmplia possible.

Dr. VIÑAS

En principi hom veu la possibilitat d'emprar dos camins. Un consistiria en mètodes de separació específica immunològics per a obtenir alguna d'aquestes subclasses en quantitat raonable, almenys per a immunitzar animals. L'altre consistiria a preparar el reactiu a partir de sèrums totals, d'especificitat de «classe» genèrica, per absorció i elució d'aquells anticossos més específics d'una subclasse.

Dr. BINAGHI

Hi ha un procediment que ha estat emprat durant bastant de temps i que cada vegada es fa servir més. Si hom comença per disposar d'una petita quantitat d'un antisèrum, hom pot fer una espècie d'amplificació. És a dir, començar amb un sèrum normal per un mètode d'immuno-difusió i obtenir una certa línia. Després emprar aquest precipitat fent-ne un tall de l'agar, per a immunitzar un animal i d'aquesta manera assolir la preparació d'un antisèrum. Aquest mètode va bastant bé en alguns casos, però té dificultats, com pot suposar-se. Això ens porta a considerar que hi ha tot un aspecte pel que fa al tipus d'animal que convé utilitzar per a immunitzar. De moment, nosaltres fem conills perquè

és un animal còmode de laboratori, que dóna bastant de sang i que és fàcil de criar. Conills d'Índies i rates, s'utilitzen amb menys freqüència, però poden donar resultats molt interessants i les empreses comercials que tenen interès a obtenir-ne més, utilitzen cabres. Hi ha d'altres animals que seria molt interessant investigar car donen resultats del tot fantàstics. Tenim una petita experiència amb la immunització d'ovelles, de vaques, de cavalls. El cavall és bastant bo en general, i dóna resultats que són increïbles. Actualment en dos llocs de l'Amèrica del Sud s'estudien, en col·laboració amb el nostre laboratori, anticossos en diferents animals i molt fàcilment immunitzant una ovella s'han arribat a tenir antisèrums que tenen 13, 14 i 15 mg per mil·límetre d'anticòs precipitant, la qual cosa és gran. A més a més, una ovella es pot sagnar molt: cada quinze dies se li pot treure un litre de sang, aproximadament.

Dr. VIÑAS

Les ovelles donen més anticòs que les cabres?

Dr. BINAGHI

En donen més que la cabra. Això és important perquè permet de tenir ràpidament quantitats grans de sèrum d'un animal.

Dr. GRAS

El cas del conill té avantatges però té també coses curioses. Recordo que fa anys, en obtenir antisèrum anti-gamma humà normal, trobàrem anticossos anti-gamma de conill. La reacció creuada entre gamma humana i de conill és coneguda. Però la meua sorpresa ha estat recent. Fa molt poc temps que, en immunitzar conills per a estudiar la possible relació entre poder antigènic i proteòlisi per proteïnasa intracel·lular, vaig trobar-me amb què els conills que tenia com a controls tenien anticossos anti-gamma humana, encara que a títols baixos, tot i tractant-se de conills normals. L'animal que va molt bé, si no es vol antisèrum en quantitat, en aquest cas per a l'albúmina i la gamma humana, és la gallina.

Dr. BINAGHI

Immunitzeu gallines?

Dr. GRAS

No tenim interès a obtenir antisèrums. Únicament intentem estudiar la proteòlisi per extrems de melsa, i el poder antigènic d'aquestes proteïnes en distints sistemes d'animals. I l'albumina i la globulina humanes són més immunògenes en la gallina que en el conill.

Dr. ORIOL

De quina classe d'anticòs es tracta, atès que una bona part de l'anticòs de la gallina no precipita en medi isotònic?

Dr. GRAS

Emprem l'aglutinació passiva i, atès que cal emprar força iònica elevada, emprem l'amortidor corrent a major molaritat. Aquestes proves són fetes sense adjuvant perquè amb adjuvant tenim una sèrie de problemes que en aquest cas concret és millor evitar. Però per a altres coses sí, emprem l'adjuvant.

Dr. ORTIZ

En relació a la utilització d'espècies distintes d'animals per a la immunització, hi ha dos problemes diferents. L'un és de tenir un sèrum que sigui molt precipitant, que tingui molta quantitat d'anticòs precipitants, i l'altre és, com deia fa un moment el doctor BINAGHI, diferenciar entre les diverses subclasses, o, potser, anar més enllà, encara. Llavors el problema, més que de quantitat d'anticòs precipitant, és de trobar una espècie que permeti apreciar diferències clarament, i, amb aquest fi, crec que seria millor emprar espècies més pròximes a l'home. Concretament, en refereixo als simis. Però això crea un problema pràctic, i és que no sempre és fàcil tenir simis en el laboratori. Caldrà estudiar quines són les espècies de simis més fàcils de criar en els nostres laboratoris i quins són els resultats que donen.

Dr. VIÑAS

No hi ha dubte que per a les especificitats més fines, per a les subclasses i per als detalls de grups són preferibles les espècies més pròximes, perquè, si no, en produir millor anticòs contra tota la molècula, l'espècie més distant no distingeix tan bé els detalls.

Dr. BINAGHI

En relació amb aquesta consideració, malgrat el seu gran interès, crec que encara hom està lluny de comprendre la relació existent entre les espècies. Per al cas de les subclasses de la IgG, cal acostar-se per evitar que l'animal reconegui aquelles coses que són comunes. Cal tenir també en compte que en el cas particular d'alguna d'aquestes subclasses els simis són massa pròxims. Hi ha algunes coses que són molt curioses i que no es comprenen molt bé. Per exemple, el conill té una situació especial entre els rosegadors. Ha evolucionat d'una manera diferent i reconeix coses que altres rosegadors no reconeixen i viceversa. Evidentment el problema que es presentarà, i que ja s'està presentant quan hom afina més la punteria per a obtenir anticossos dirigits a certs antígens particulars, és que segons l'espècie que hom utilitza i el mètode de preparació, és possible que s'obtinguin precisament anticossos dirigits a les coses que són constants en totes les molècules. Aquest és un problema que estudiem ara amb el doctor ORIOL en sèrums obtinguts d'animals que han estat immunitzats durant períodes relativament llargs, i en trobem alguns que són realment incomprendibles. El doctor ORIOL pot dir algunes paraules sobre aquests antisèrums que reconeixen una única classe, per exemple, en l'home.

Dr. ORIOL

Aquest és un problema bastant complicat. Si volem veure l'estructura fina a la qual hom feia referència abans, cal tenir en compte que la part constant de la cadena pesant és la que determina les classes i subclasses, i que la part variable de la mateixa cadena intervé en la formació del lloc. Doncs bé, aparentment, la part variable té un origen genètic distint del de la part constant i sembla tenir determinants que són comuns a totes les classes de gamma-globulines. Degut a això trobem sèrums de conills dirigits contra gamma-globulines de conills d'Índies, que calia que fossin específics per a gamma₂, però que precipiten 100 % de la gamma M, gamma₁ i gamma₂. Quan hom busca l'explicació resulta que és una part comuna a totes les classes, situada en el Fd de la cadena pesant, la que reacciona. Sembla que en el moment actual és molt difícil tractar d'assolir antisèrums específics contra una subclasse determinada, contra un tipus o una cadena, tractant d'obtenir l'antigen normal pur. Això referit a l'antigen normal i no al mieloma. Sembla potser més factible arribar a aquest resultat emprant un antigen menys pur i absorbir-lo amb els factors no desitjables. Perquè encara que hom tingui fraccions molt pures, sempre hi ha determinants comuns que segueixen essent vistos per l'antisèrum.

Més encara, per exemple, tenint cadenes pesants aïllades segueix havent-hi determinants comuns entre les distintes classes de gamma-globulines.

Dr. GRAS

És molt curiós i objete de preocupació que aquests determinants fossin sempre en la part comuna. O sia, els determinants de capacitat antigènica són en la part comuna.

Dr. BINAGHI

En la part variable hi ha una part realment variable, i la resta és constant, i aquesta constant és possible que tingui determinants.

Dr. GRAS

Crida l'atenció no haver pogut obtenir un anti-anticòs autèntic. Un anticòs contra determinants específics d'aquest anticòs. No hi ha manera d'obtenir-lo, possiblement degut a l'elasticitat que tenen aquestes parts variables, entenent per tal el fet que l'estructura del determinant antigènic requereix una certa fixació estereospacial i la del determinant de l'especificitat anticòs no la té. Circumstància que constitueix probablement la base del fenomen.

Dr. ORIOL

El lloc actiu de l'anticòs cal que sigui tan rígid com el determinant antigènic.

Dr. VIÑAS

L'existència hipotètica d'aquests anticossos seria molt difícil de demostrar.

Dr. ORIOL

No tenim cap element immunoquímic per a demostrar els anti-anticossos en una barreja d'immunoglobulines de distintes especificitats.

Dr. GIMFERRER

Potser per activitat biològica. Per exemple, en el cas d'un anti-VIII recuperant la funció del VIII.

Dr. VIÑAS

Un anticòs específic per a una zona molt pròxima a la zona activa també bloquejaria l'anticòs.

Dr. ORIOL

Fent anticossos anti-gamma-globulina és bloquejada l'activitat, en principi. El problema és demostrar que aquest anticòs va dirigit contra el lloc actiu. No es veu la possibilitat de demostrar aquest problema.

Dr. BINAGHI

Podria ésser possible per la inhibició amb antigen.

Dr. VIÑAS

Les subclasses de IgG poden tenir un interès biològic, i fins clínic, ja que tenen propietats biològiques distintes. No totes les subclasses d'IgG fixen complement. Pot tenir un interès, fins en patologia. Existeix, però, la dificultat de tenir antiserum.

Dr. ORIOL

En el cas de les subclasses d'IgG, hi ha potser una manera d'evitar el problema que ha citat el doctor ORTIZ, fa un moment, de manera molt pertinent. Quan hom pren una espècie allunyada per a produir l'anticòs, aquesta espècie comença per reconèixer totes les coses que són distintes a ella mateixa. Entre aquestes hi ha una sèrie de parts comunes a la gamma G que no té res a veure amb els determinants de subclasse menys aparents. Una manera de resoldre aquest inconvenient és prendre una espècie molt pròxima. Però quan hom no té accés a espècies molt pròximes, hi ha llavors un altre recurs. Hom pot injectar gamma-globulina humana a conill. Passat un mes, el conill injectat fa anticossos dirigits contra la IgG sense diferenciar els subgrups. Però si hom segueix insistint, passats diversos mesos d'immunització, llavors arriba un moment que el conill comença a veure, a més a més de totes aquelles parts comunes a totes les subclasses d'IgG, aquelles parts que són específiques a cadascun dels subgrups. Llavors cal recórrer a l'absorció. Absorbir-lo per exemple amb proteïnes de mieloma de subgrup conegut, respectant l'activitat contra els subgrups que hom vol obtenir. És un camí que dona feina i pren

molt de temps. Fins ara, hem obtingut només sèrums específics per a la subclasse de tipus 1, amb aquest mètode. Per als 2, 3 i 4, no n'hem obtingut, d'antisèrums. Però esperem d'obtenir-los.

Dr. ORTIZ

Es tracta d'una immunització molt llarga?

Dr. ORIOL

Aquests conills tenien més d'un any d'immunització.

Dr. BINAGHI

La immunització és relativament simple. És a dir, fem una injecció, o dues, amb adjuvant, en un espai de 10 dies a una setmana, i, després, un cop al mes aproximadament, li posem injeccions intravenoses i intramusculars a dosis petites de l'ordre de 50 a 150 micrograms cadascuna. Això és important: si hom empra dosis de l'ordre de mil·ligrams, hom acaba per obtenir antisèrum contra tota cosa haguda. Per pura que sigui la proteïna, sempre hi ha impureses. Passats 5 o 6 mesos, és a dir, després de cinc o sis injeccions, comença a fer-se un sèrum extraordinàriament ric i comença a haver-hi moltíssimes més coses.

Dr. VIÑAS

Haviem pensat que, potser, una doble absorció i elució podien proporcionar sèrums específics de subclasse, si s'utilitzava una proteïna de mieloma IgG₁, absorbint damunt d'aquesta proteïna un sèrum d'aquests molt rics com acaba de referir el doctor BINAGHI, anti-IgG, genèric, i s'elueix el que ha combinat aquest absorbent. A continuació aquest eluït el tornem a absorbir amb un mieloma de tipus IgG₂. La primera absorció és per a obtenir l'anticòs per a tota la proteïna menys l'específic IgG₂. Llavors la IgG₂ podrà retirar d'allí tot el que és propi per a la IgG, en general, però no l'anti-IgG₁. Aquest hauria de quedar en el que passa a través de l'immunoabsorbent.

Dr. ORIOL

És possible que existeixi l'inconvenient que hom selecciona els anticossos anti-IgG₁ o anti-IgG₂ amb un mieloma. Llavors es torna al mateix problema que si s'immunitza directament amb proteïna de mieloma.

Dr. VIÑAS

No és exactament el mateix.

Dr. ORTIZ

S'assoleix diferenciar entre aquells determinants que hi ha en la IgG_1 particular que hem emprat, i els que hi ha en la IgG_2 . Finalment no es pot estar segur, per aquest procediment, de si la diferència o les diferències que són detectades, són les que hi ha entre la subclasse 2 o entre determinants idiotípics d'aquell mieloma i d'aquell altre mieloma.

Dr. VIÑAS

En principi, si es parteix d'un sèrum obtingut amb IgG vulgar, els anticossos dirigits a determinants mieloma seran mínims. N'hi haurà molts més, relativament, dirigits a l'específic de les subclasses, que és més comú que el que és específic d'un mieloma en particular. No hi ha dubte que hi haurà quelcom, però és probable que hi hagi molt poc del que és específic d'un mieloma en particular. És distint si fem per a immunitzar una proteïna de mieloma. Partint d'un sèrum anti- IgG vulgar i corrent, potser hom s'acosta molt a un sèrum anti-subclasse.

Dr. RODRIGUEZ

La qüestió dels anticossos que obté SELA en els seus treballs d'immunització amb polipèptids sintètics, que sembla ésser que els més àcids seleccionen els anticossos més bàsics i viceversa, ¿té alguna relació amb les subclasses d' IgG_1 i d' IgG_2 ?

Dr. ORIOL

Les experiències són fetes en el conill i en el conill no s'han descrit subclasses semblants a les humanes. És conegut un sol tipus d' IgG malgrat que hi ha unes molècules que migren electroforèticament més ràpidament que unes altres.

Dr. BINAGHI

En teoria, si això fos cert, hi hauria d'haver una diferència entre els anticossos anti- IgM i anti- IgG , perquè tenen distinta mobilitat electroforètica. No sé si alguna persona ha estudiat aquest problema.

Dr. ORTIZ

Alguns autors han tractat de reproduir els resultats de SELA emprant com antígen proteïnes de mobilitats electroforètiques molt diferents, però en les condicions que ho feren no aconseguiren de trobar diferències.

Dr. BINAGHI

Això darrer es refereix a la relació entre l'especificitat i la subclasse. La cosa de què parlem cau dins una mateixa classe.

Dr. VIÑAS

És cert. Per a molts antígens, concretament per a una sèrie de grups sanguinis, hom troba l'especificitat de forma relativament homogènia en certa mobilitat electroforètica, no necessàriament en certa subclasse. Això és el que han vist amb l'antigen Rh (D). Si hom elueix IgG d'una columna de CM-Sephadex, troba l'activitat anti-D en l'última proteïna eluïda, en la que es podria anomenar la proteïna més bàsica, d'una manera molt marcada. Fins hi ha algun treball que demostra com en un mateix sèrum i dins d'una mateixa classe d'immunoglobulina, els anticossos per a certs grups sanguinis, suposem el D, estan molt homogèniament en un lloc, i els anti-C, per exemple, en un altre. Això no es refereix al fet que estiguin en subclasses diferents. No obstant això, hi ha també una preferència per certes cadenes en els anticossos per a certs antígens.

Dr. BINAGHI

Amb els haptens, en els conills d'Índies, i també en els que no són d'Índies, hi ha certament diferències netes.

Dr. VIÑAS

Sembla existir una llei general, que encara és poc coneguda, però que sorgeix com un terreny interessant per a explorar.

Dr. GRAS

Aquests conills immunitzats, al final de la immunització, ¿presenten algun canvi en relació a la natura de l'anticòs? És IgG o IgM?

Dr. BINAGHI

L'anticòs d'aquests conills és fonamentalment IgG. Ara bé, també és de suposar que hi ha IgM. La finalitat d'aquestes immunitzacions és la d'obtenir sèrums que després són emprats en immunodifusió i aquí és, fonamentalment, la IgG la que actua. Aquests conills tenen alguns mil·ligrams d'anticòs per mil i la concentració que poden tenir d'IgM total és molt petita.

Dr. GRAS

Si hom injecta a conills dosis relativament grans d'albúmina durant mesos i més mesos, l'anticòs és predominantment IgM. És mercaptoetanol sensible.

Dr. ORIOL

Això deu dependre una mica de l'antigen que hom utilitza.

Dr. BINAGHI

¿En quines concentracions es troba aquest anticòs mercaptoetanol sensible?

Dr. GRAS

No ho sé exactament. És possible que sigui de l'ordre dels mil·ligrams. Si hom immunitza el conill persistentment amb dosi constant d'antigen poc immunogènic durant mesos i mesos, l'anticòs és predominantment IgM, el qual determinem en percentatge. Anticòs total i anticòs mercaptoetanol sensible, mesurat per aglutinació. Com antigen utilitzem albúmina de bou o albúmina humana.

Dr. BINAGHI

Sembla molt relatiu el que respecta a la resposta secundària. Preparem correntment macroglobulina de rata i el mètode que fem és una resposta secundària perquè ens dóna millors resultats.

Dr. GRAS

És com un cicle: comença per la IgM i acaba en la IgG. Si la resposta és intensa, això ho fa ràpidament. Si l'estímul és petit, per més temps que sigui sostingut, sembla que es manté en la IgM. El cicle pot repetir-se. Per exemple, un conill hiperimmunitzat enfront d'un antigen molt immunogènic (particulat) que es manté a nivell baix i tot d'una, per augment bruscat de la dosi, dóna una resposta evident. Aquesta resposta és predominantment IgG, o sigui mercaptoetanol resistent. Si aquests mateixos conills se'ls deixa estar sense cap estímul antigènic i després de dos o tres mesos són tornats a immunitzar amb una sola dosi petita, hom veurà regularment IgM.

Dr. ORTIZ

Crec que seria interessant que fos determinada la identitat de la classe a la qual pertany l'anticòs per alguna cosa més que la resistència al mercaptoetanol. En la resposta d'un animal immunitzat llargament amb un material antigènic tan complex com una proteïna, probablement hi ha anticossos no solament de diferents especificitats sinó pertanyents a classes molt distintes, la resistència o susceptibilitat de les quals a la reducció amb mercaptoetanol no depèn solament d'ésser IgG o IgM. Els anticossos IgA són sensibles en part al mercaptoetanol i en altra part són resistents.

Dr. VIÑAS

Convindria conèixer exactament l'especificitat d'aquests anticossos. No perquè vagin dirigits al mateix antigen, per exemple, la gamma-globulina, han d'anar dirigits als mateixos determinants.

Dr. GRAS

L'interessant és que si hom immunitza encara que sigui amb una barreja antigènica, inicialment l'anticòs és mercaptoetanol sensible, i després amb aquesta mateixa barreja en el moment que es té el conill inhibit, la resposta a un augment bruscat de la dosi no és mercaptoetanol sensible, sinó que és resistent, la qual cosa indica que no és que respongui una cèl·lula distinta sinó la mateixa població cel·lular inhibida. Aquest mateix conill deixat sense estímul antigènic, si quatre o cinc mesos després es torna a estimular amb aquesta mateixa barreja, respon altra vegada predominantment com mercaptoetanol sensible.

Dr. ORIOL

Sempre són injectats per via intravenosa?

Dr. GRAS

Sí, per via intravenosa, a fi de fer la difusió més uniforme. Si hom hiper-immunitza amb antigen particulat o amb antigen que tingui una resposta òptima inicial, passa ràpidament a mercaptoetanol resistent i hom pot seguir aquests conills mantenint-los en aquest estat d'hiperimmunització i amb escassa mortalitat. En canvi, amb antigen soluble, amb l'albumina humana, antigen pur, poc immunogènic per al conill, els conills immunitzats persistentment durant mesos, moren en quantitat amb lesions d'amiloïdosi magnífiques, i unes melses grossíssimes amb resposta predominantment d'IgM.

Dr. VIÑAS

Podríem deixar aquest tema i passar a discutir aquestes pautes d'immunització que han preconitzat especialment els famosos Ishizakas i que nosaltres no hem provat. Consisteixen a immunitzar amb un antigen impur. Penso concretament en el cas de la IgE, que ens interessa moltíssim i que de moment no hem atacat. Si hom assolís IgE amb certes impureses, hom podria intentar aquestes pautes destinades a inhibir la resposta a les impureses, amb antigen donat en excés, simultàniament, per via intravenosa. O alternativament amb anticòs.

Dr. BINAGHI

Crec que la pauta exposada pel doctor VIÑAS sembla bona, però no estic segur que sigui absolutament general per a totes les espècies. Aquesta pauta dóna molt bons resultats per a obtenir anticossos específics de classe (anti-IgE, anti-IgM) inhibint amb un excés d'una altra immunoglobulina. Inhibint els anticossos contra el Fab en conills d'Índies, perquè aquest animal —i això ho hem demostrat fa bastant de temps— és un productor molt dolent d'anticossos anti-Fab de les altres espècies. De manera que aquí s'aprofiten dues situacions. La primera és que és un animal que per ell mateix no fa anticossos anti-Fab, i la segona és la d'ajudar aquesta situació fent una espècie de paràlisi, d'inhibició simultània.

Dr. VIÑAS

El doctor BINAGHI podria comentar una mica més aquest altre aspecte d'aprofitar aquests parentius o facilitats de produir anticossos contra un tipus o un altre de cadenes per a seleccionar l'espècie que convé emprar per a immunitzar en cada cas.

Dr. BINAGHI

L'única cosa que puc dir és que els rosegadors comuns de laboratori, amb excepció del conill, produeixen anticossos amb molta més facilitat contra el fragment Fc, la porció de cadena pesant que caracteritza o que defineix les diverses classes. En canvi, el conill, no; el conill produeix anticossos contra gairebé tots els fragments d'immunoglobulines. Això permet, per un mètode relativament ràpid sense la pretensió d'afinar gaire la resposta, obtenir antisèrums específics en dies o setmanes, en tot cas, menys d'un mes, simplement injectant conills d'Índies o rates.

Dr. ORIOL

També es poden assolir anticossos específics en el conill si prèviament hom el paralitza amb els determinants comuns.

Dr. VIÑAS

Amb antigen o amb anticòs?

Dr. ORIOL

Amb antigen. S'utilitza el mètode senzill següent: una quantitat d'IgG es posa a l'ultracentrífuga per a separar-ne la IgG agregada, i amb el sobrenedant hom paralitza un conill. Després s'immunitza amb una altra classe. S'ha fet amb IgA i amb IgM. És possible d'obtenir bons anti-IgA i anti-IgM amb conills paralitzats amb IgG.

Dr. BINAGHI

Ara cal fer notar que bé que també és possible en el conill, és molt més difícil i cal emprar dosis molt més altes. També serveixen les rates, amb l'avantatge que les rates ja tenen anticossos als quinze dies.

Dr. RODRÍGUEZ

Podeu suggerir algun procediment per a obtenir la IgE?

Dr. ORTIZ

Solament el d'Ishizaka, no gens senzill.

Dr. RODRÍGUEZ

Nosaltres hem pensat recórrer a sèrum d'allèrgics a la llana, per exemple, fent servir llana com a immunoabsorbent per a intentar de fixar els anticossos reagínics i, després, eluir-los.

Dr. ORTIZ

El sèrum del subjecte reagínic, a més a més de reagines, té altres anticossos que també es fixaran sobre la llana. En el reagínic la quantitat d'anticòs IgE pot ésser moltíssim més petita que la d'altres classes.

Dr. VIÑAS

Un individu amb una al·lèrgia evident i greu, pot tenir molt d'anticòs circulant contra l'aHergen?

Dr. ORTIZ

L'anticòs pot tenir un efecte bloquejant, el qual pot dependre de moltes coses, entre altres, de l'especificitat. Al cap i a la fi els anticossos contra la llana poden tenir moltes especificitats distintes. Suposadament, un anticòs pot ésser bloquejant sense anar dirigit al mateix determinant que l'anticòs reagínic. Pot exercir una inhibició per l'espai que ocupa.

Dr. VIÑAS

Tornant a les pautes d'immunització, una característica dels anticossos que ens interessa assolir si volem aplicar-los a l'estudi de les anèmies hemolítiques d'acord amb la idea que portem, és que cal queixin complement. És una exigència més. No ens serveix qualsevol classe o qualsevol animal. El complement que utilitzem és de conill d'Índies. Ha estat

preconitzada l'ovella com a animal productor de bons sèrums. Com funciona l'anticòs d'ovella amb complement de conill d'Índies?

Dr. ORTIZ

COOMBS publicà fa molts anys una llista molt completa sobre la capacitat de l'anticòs per a fixar el complement segons la seva espècie d'origen i crec que l'anticòs d'ovella fixa complement de conill d'Índies.

Dr. VIÑAS

Encara que no fos capaç de lisar d'una manera eficaç, mentre fixés C', per a nosaltres fóra suficient.

Dr. ORIOL

Hom pot obtenir IgE a partir del sèrum d'un malalt al·lèrgic. També partint d'animals parasitats que produeixen gran quantitat d'anticossos reagínics.

Dr. BINAGHI

El malalt de Johanson ha donat ja 150 gr de proteïna de mieloma. També es pot dir semblantment de l'altre mieloma. Passa que aquest material forma part d'un patrimoni. Aquesta situació s'aclarirà dins d'uns anys o dins d'uns mesos. Actualment la OMS distribueix petites quantitats d'anti-IgE i de sèrum ric en IgE. Aquests reactius també es venen a uns preus una mica cars. Hem intentat en el nostre laboratori, amb una mica d'anti-IgE que ens donaren a Ginebra, el següent: fer una immunodifusió, obtenir el precipitat, tallar la línia, rentar-la curosament i injectar-la a conills. I fins el dia d'avui tenim antiglobulina d'ovella! Perquè és l'ovella la que ens ha donat l'anticòs. Però no hem assolit d'obtenir res d'anti-IgE. Ara, si hom tingués una necessitat molt gran, i crec que és el que farem en el laboratori, pot refer-se el treball de Ishizaka a partir d'un litre o dos de sèrum d'un malalt al·lèrgic. No és tanta feina com es podria pensar. Si hom té la pauta no ha de presentar grans dificultats.

Dr. GARCIA

Assajarem el procediment descrit per BINAGHI per a immunitzar rates, amb IgG i amb IgA, i no obtinguérem cap resultat. Possiblement per un excés d'antigen.

Dr. BINAGHI

Nosaltres injectàrem a les quatre potes, en el palmell de la mà, una dosi entre 100 i 500 gammes per animal, total. Barrejat amb adjuvant complet de Freud.

Dr. VIÑAS

Quina quantitat fou injectada en els nostres animals?

Dr. GARCIA

De l'ordre de mig mil·ligram. La injecció fou feta per via intramuscular.

Dr. BINAGHI

Aquesta és la diferència. És absolutament crític de fer-ho en el palmell de la mà. En aquestes condicions, uns deu o dotze dies després hom disposa d'un mil·ligram i mig d'anticòs.

Dr. VIÑAS

És interessant conèixer l'eluent aconsellable per a obtenir un anticòs per elució d'un antigen insoluble o un immunoabsorbent. Hem assajat el iodur i la glicina, seguint els treballs d'AVRAMEAS, però realment és difícil tenir un criteri respecte a quin és el millor eluent quant a rendiment i quant a preservar les característiques de l'anticòs.

Dr. BINAGHI

L'elució amb glicina té l'inconvenient que el tractament a pH baix deteriora l'anticòs de forma proporcional a l'acidesa de l'elució i al temps de contacte. S'obté un rendiment millor a pH 2 - pH 2,5 que a pH 3. Com més baix, més rendiment, però també més deteriorament, bé que pot ésser deteriorament des del punt de vista biològic, i no del punt de vista immunoquímic, si hom l'han emprat com a anticòs, pel que fa a la unió amb l'antigen. Però per a la fixació de complement, per exemple, a pH 2 - 5, la fixació de complement queda anul·lada.

Dr. RODRÍGUEZ

Assajarem un sèrum anti-BJ eluït de la columna d'immunoabsorbent i sembla que fixà complement.

Dr. BINAGHI

És interessant el mètode descrit avui perquè el contacte amb l'amortidor de pH baix és ràpid.

Dr. VIÑAS

Però fins emprant aquest mètode valdria la pena de buscar les millors propietats de l'eluent per a conservar encara millor les característiques de l'anticòs.

Dr. ORIOL

Hem obtingut els millors resultats quant a preservar l'estructura de la molècula d'anticòs amb clorur magnèsic 5M, a pH neutre. AVRAMEAS ha arribat a la conclusió, després de fer un assaig comparatiu amb tots els eluents que ha emprat, que el clorur magnèsic és el menys nociu. En el ratolí, la doctora DANON arribà a obtenir anticòs purificat que conserva activitat de tipus reactiu.

Dr. VIÑAS

En les anèmies hemolítiques per anticossos, ens interessa, específicament, entrar a estudiar aquesta zona sorda, inexplorada, de nivells baixos d'anticossos anti-eritròcits. Podem imaginar tota la família d'autoanticossos anti-eritròcits com una espècie d'«iceberg». Fins ara s'ha anat explorant la cosa que surt a la superfície, però això dóna unes imatges parcials. Tenim la impressió que si fos possible de completar les dades, es podrien descobrir nivells baixos dels mateixos anticossos en persones sanes i que això tindria utilitat perquè permetria d'establir certes relacions que ara són ignorades.

Dr. BINAGHI

Crec que sí, que és molt interessant, i, precisament l'altre dia, el doctor VIÑAS va explicar-nos certes coses que potser podria desenvolupar

ara a fons. Evidentment, la limitació que hi ha amb els anticossos, els que hom empra o els que apareixen espontàniament en certs estats patològics, és que poder trobar-los i mesurar-los depèn, en bona part, de llur avidesa. Els anticossos d'afinitat dèbil no es poden posar en evidència encara que tinguin importància patològica. Per això pot ésser interessant de desenvolupar els treballs que proposa el doctor VIÑAS.

Dr. VIÑAS

RAPP, BORSOS i LINSKOTT (aquest darrer treballa amb el grup de FUNDENBERG) han demostrat clarament que amb els tres rentats clàssics, als quals són sotmesos els eritròcits per a realitzar un test d'antiglobulina o de COOMBS, desapareixen una bona part dels anticossos. En les condicions normals de força iònica i de temperatura en què es treballa, molts anticossos es dissocien. En canvi, amb els amortidors de força iònica baixa, compensats amb sucre, i de més a més a baixes temperatures, és possible de poder rentar els eritròcits preservant aquests anticossos sobre la superfície de l'eritròcit. La diferència pot ésser més o menys important segons les característiques de l'anticòs i pot arribar a ésser de més del 90 %. Això solament ja pot ajudar molt a detectar aquests anticossos que hom no sap si tindran importància clínica. Però, en tot cas, tenen importància biològica i ajuden a comprendre millor els mecanismes biològics, i no hi ha dubte que això és interessant. Si de més a més poden obtenir-se dades exactes de la quantitat d'anticòs per eritròcit i de la classe de l'anticòs, cosa que sembla possible amb els mètodes desenvolupats per aquests autors, fins a nivells molt baixos, això permetria d'obtenir dades que actualment hom desconeix del tot.

Dr. GRAS

Per a obtenir aquests tipus de dades, ¿no es podria emprar el mètode de plaques de Jerne que permet detectar nivells més baixos d'immunització?

Dr. VIÑAS

No sé fins a quin punt això seria aplicable en el present cas, perquè cal treballar amb cèl·lules vives, que caldria obtenir de persones humanes, probablement per punció de la melsa. És veritat que amb aquest mètode es poden detectar fins anticossos no hemolítics per una tècnica de «sandwich» amb anticòs de conill anti-humà que de passada podria ésser específic per a cada classe de cadenes. La dificultat principal, en tot cas,

radica en els pocs casos que es donarien per a estudiar si calgués practicar cada vegada una punció esplènica.

Amb la fixació i trànsfer de C_1 s'assoleix mesurar unes poques molècules d'anticòs per eritròcit. El que existeixi per sota d'aquests nivells dubto que tingui interès, de moment. Hom fa un descens de dos ordres de magnitud per sota del que hom ha anat mesurant fins ara.