

**INTERACCIÓ DE L'ANTIGEN DE DETERMINATS
LIMFÒCITS T EN LA REGULACIÓ DE LA RESPOSTA
IMMUNOLÒGICA PELS ANTICOSOS IgE:
ALGUNS DETALLS DE LA DINÀMICA D'AQUESTS
ANTICOSSOS**

Comunicació presentada el dia 27 de novembre de 1975
pel doctor

JOSEP VIÑAS I RIERA

INTRODUCCIÓ

A l'estudi de la dinàmica d'acció dels anticossos reagínics o de la classe IgE interessa estudiar:

- a) La interacció de les molècules d'IgE amb les cèl·lules basòfiles.
- b) La dinàmica de la producció d'anticossos reagínics.
- c) El mecanisme desencadenant de l'alliberament de substàncies actives dels basòfils per la interacció antígen-anticòs.

Avui em proposo comentar unes dades experimentals de la literatura que contribueix a aclarir els dos primers aspectes.

No és casual que la major part de les dades que serviran de base per a aquesta posada al dia vinguin de ISHIZAKA, el mateix investigador que va identificar la classe d'immunoglobulina responsable de l'activitat reagínica, la qual, més tard, havia de rebre el nom d'IgE. El treball d'aquest autor és d'un plantejament i una realització tan perfectes que, encara que en allò que tractarem avui els resultats no han estat confirmats plenament per altres autors, hom pot arriscar-se a prendre'ls per establerts.

NOMBRE DE MOLÈCULES D'IGE PER CÈL·LULA

La primera pregunta que hom es planteja és el nombre de molècules d'IgE fixades a la membrana de cada cèl·lula basòfila.

És molt difícil obtenir basòfils dels teixits. Això ha obligat a fer

aquests càlculs amb granulòcits basòfils de la sang. Cal suposar que el comportament dels basòfils dels teixits sigui bastant semblant.

Per a aquesta medicació s'ha emprat la tècnica de la fixació i transferència de Cl posada a punt per RAPP i BORSOS, la qual permet quantificar pràcticament molècula per molècula. En una sèrie d'individus trobarem de 10.000 a 40.000 molècules per cèl·lula.

Per veure la importància que pot tenir el nombre de molècules específiques per cèl·lula pel que fa al desencadenament de l'alliberament d'histamina, es va mesurar aquest fenomen utilitzant com a desencadenant anti-IgE. D'aquests estudis es va deduir que existeix una relació interna entre el nombre de molècules d'IgE per cèl·lula i la quantitat d'anti-IgE necessària per a desencadenar una màxima descàrrega d'histamina.

Encara que el model no sigui estrictament comparable al de l'alliberament d'histamina per l'antigen, sembla raonable suposar que la dinàmica ha de ser la mateixa. D'això es podria deduir, temptativament, que com més gran sigui el nombre de molècules d'anticòs IgE específic per a determinat antigen fixades sobre la membrana cel·lular, menor serà la concentració d'antigen capaç de desencadenar una reacció màxima.

Probablement, l'afinitat d'aquest anticòs també tingui importància.

NOMBRE MÀXIM DE MOLÈCULES D'IgE

Una altra pregunta que hom es feia és el nombre màxim de molècules d'IgE que es pot combinar amb la membrana d'un basòfil quan tots els receptors estan saturats.

Per a escatir això, els autors varen exposar els granulòcits basòfils a una concentració força elevada de molècules d'IgE procedents d'un mieloma.

El nombre fixat sobre la membrana es va calcular mitjançant la prova de fixació i transferiment de Cl. En tots els casos es va poder augmentar substancialment el nombre de molècules fixades amb un resultat final que oscil·la entre 30.000 i 80.000. Per tant, resulta que, en condicions normals, només d'un 30 % a un 50 % dels receptors estan ocupats per molècules d'IgE. Això fa pensar també que l'associació sigui reversible i que, per tant, normalment hi ha una situació d'equilibri entre tots els anticòs IgE presents al sèrum i els representats a la figura 1 (pàg. 36) sobre la membrana de cada basòfil.

CONSTANT D'ASSOCIACIÓ

L'equilibri existent entre l'IgE lliure i la fixada sobre la membrana cel·lular permet calcular la constant d'associació dels receptors amb les molècules d'IgE utilitzant la fórmula:

$$K = \frac{(\text{receptors ocupats})}{(\text{IgE}) (\text{receptors lliures})}$$

que es pot expressar també per:

$$K = \frac{r}{(\text{IgE}) (i-r)}$$

en la que r significa la proporció de receptors ocupats per IgE. En els casos en què s'ha determinat, la constant d'associació oscilla al voltant de 10^8 mol. És a dir, els receptors tenen una gran avidesa d'IgE, cosa que explica la llarga permanència de la sensibilització passiva.

En sotmetre les cèl·lules a un pH de 4 es dissocien totes les molècules d'IgE, però els receptors queden intactes i admeten novament les molècules d'IgE en restablir-se les condicions normals.

DISTRIBUCIÓ DELS RECEPTORS DE MEMBRANA

També tenia interès saber la forma com estan distribuïts els receptors sobre la membrana. Això ha estat estudiat mitjançant tècniques d'immunofluorescència i de marcat amb isòtops. Normalment els receptors estan distribuïts uniformement per la membrana cel·lular, però resulta que quan l'IgE que contenen reacciona amb anti-IgE es produeix una migració d'aquests receptors cap a un extrem de la cèl·lula (el fenomen de *capping*). S'ha pogut demostrar que els receptors no ocupats per IgE també migren, s'ha de pensar, doncs, que, o bé en realitat cada receptor és polivalent o bé que estan associats en «clusters» o grumolls que migren com un tot.

BIOSÍNTESI D'ANTICOSSOS IgE

És ben conegut que perquè les cèl·lules B inclinïn la producció d'anticossos de classe IgG o IgE cal, generalment, la cooperació de cèl·lules T. És conegut també el fet que les cèl·lules T «reconeixen» determinades característiques de la partícula antigènica, de naturalesa més àmplia, i que vénen a coincidir amb el que s'anomena *carrier* o suport i que les B, en canvi, reconeixen detalls més específics que vénen a coincidir amb el concepte d'hapté o de determinant antigènic. Queden, no obstant, una sèrie de preguntes per respondre, per exemple, si existeixen diferents grups de cèl·lules B ja destinats a produir IgE, IgG, IgM, etc. Si és necessari el contacte entre cèl·lula T i cèl·lula B perquè es produeixi l'efecte *helper*; si el *carrier* té alguna acció en el sentit de decantar la resposta cap a una classe o altra d'anticòs; i encara d'altres.

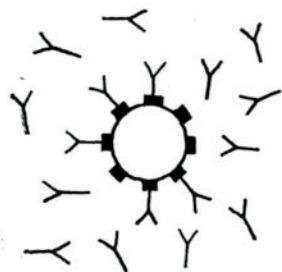


FIG. 1

FIG. 2

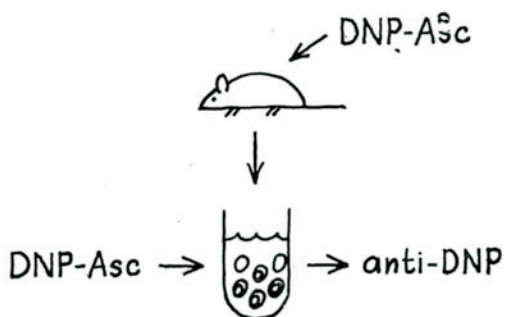
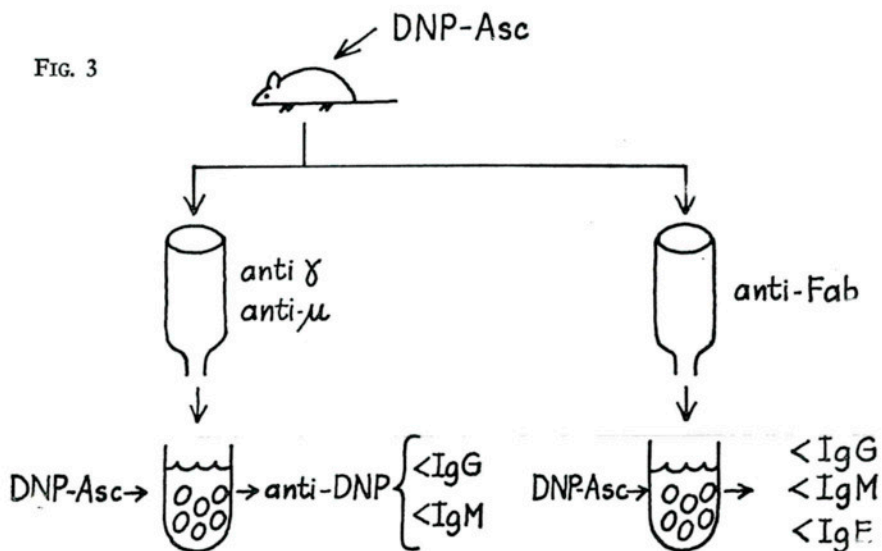


FIG. 3



ISHIZAKA i col·laboradors van emprendre una sèrie d'experiments que han contribuït a aclarir algunes d'aquestes qüestions. Per a això van posar a punt un disseny experimental bàsic, sobre el qual aplicaren diverses variants, que és el següent (figura 2):

1. Preparen un animal tot immunitzant-lo a determinat antigen (*carrier* + hapté) amb ajuda d'un adjuvant.
2. Sacrifiquen l'animal i obtenen cèl·lules dels ganglis mesentèrics.
3. Cultiven aquestes cèl·lules en presència del mateix antigen (o un altre en determinats experiments) i mesuren la producció *in vitro* d'anticòs específic antihapté pertanyent a una o altra classe.

EXISTÈNCIA DE CÈL·LULES PRECURSORES DIFERENTS PER IGG I IGE

Utilitzant el mateix esquema bàsic (figura 3) es fan passar les cèl·lules per una columna preparada amb anticòs antiglobulines humanes específic per a IgM i IgG en un cas i per a IgE en un altre amb la idea de retenir a la columna les cèl·lules que presenten les immunoglobulines corresponents a la seva superfície. Les cèl·lules que passen la columna sense ser retingudes són estimulades *in vitro* i es mesura la producció d'anticòs de les diverses classes.

D'aquests experiments es dedueix que les cèl·lules precursors d'anticòs de classe IgE no són les mateixes que les destinades a produir IgG o IgM.

NECESSITAT DE L'EFECTE HELPER I INDEPENDÈNCIA DE L'ACCIÓ «CARRIER» I HAPTÈ

Utilitzant el mateix esquema bàsic (figura 4) es prepara l'animal amb diverses combinacions de *carrier* i haptè i s'estimula les cèl·lules *in vitro* amb la mateixa o altres combinacions de *carrier* i haptè. Com a haptè s'empra en tots els casos dinitrofenil (DNP) i com a *carrier* extracte d'*Ascaris* (Asc), extracte de la composta anomenada *Rag-Weed* (Rag) o hemocianina de la pegellida anomenada *Key Hole Limpet* (KHL), de vegades sols i d'altres vegades combinats amb DNP.

Resulta d'aquests experiments que:

- a) Les cèl·lules de l'animal immunitzat amb DNP-Asc poden ser estimulades a produir anticòs amb DNP-Asc, però no amb DNP-Rag.
- b) Les cèl·lules de l'animal immunitzat amb DNP-Asc i a més amb Rag (sense DNP) poden ser estimulades *in vitro* tant per DNP-Asc com per DNP-Rag.
- c) Les cèl·lules de l'animal immunitzat amb DNP-Asc poden ser estimulades *in vitro* per DNP-Rag, a condició que al mateix temps s'afegeixi Asc (sense DNP) al medi.

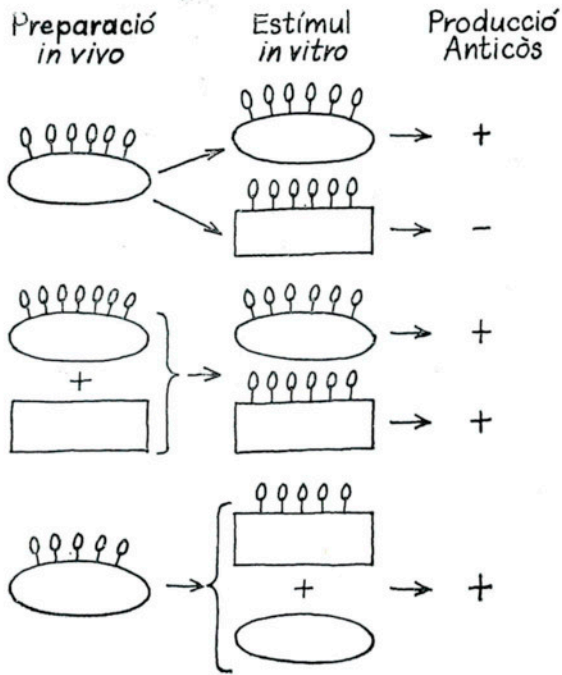


FIG. 4

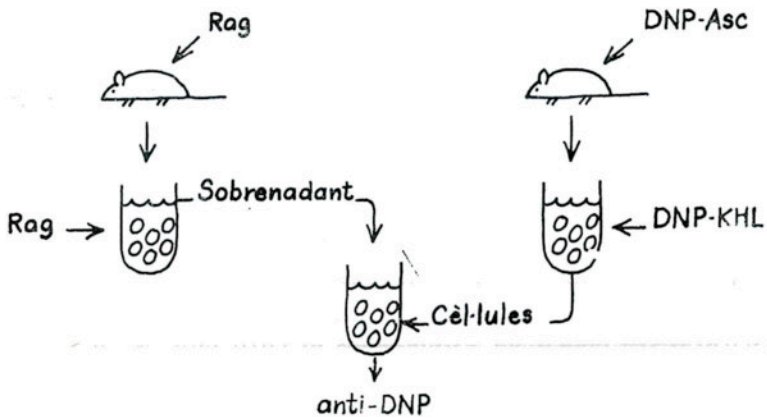


FIG. 5

D'aquí es pot deduir que, per a produir la transformació de les cèl·lules B en productores d'anticòs no és necessari que l'haptè que estimula la cèl·lula B estigui a la mateixa molècula *carrier* que estimula la cèl·lula T *helper*. Semblava lògic, per tant, pensar que l'efecte *helper* es podia produir a «distància» mitjançant un factor soluble. Per a provar la veracitat d'aquesta idea realitzaren l'experiment que es descriu a continuació (fig. 5).

DEMOSTRACIÓ DE FACTOR «HELPER» SOLUBLE

Emprant l'esquema experimental descrit abans prepararen dos animals: l'un immunitzat amb Rag (sol) i l'altre amb DNP-Asc. N'obtingueren les cèl·lules com sempre i cultivaren les del primer amb Rag i les del segon amb DNP-KHL. És evident que a aquestes últimes, el DNP pot interaccionar amb les cèl·lules B específiques, però que en manca l'efecte *helper*, que solament Asc seria capaç de produir, no podran iniciar la producció d'anticòsos.

Però, si a les cèl·lules del segon animal, estimulades per DNP, se'ls afegeix el sobrenedant de les del primer (estimulades amb Rag), inicien una resposta. Amb això es demostra la producció d'un factor *helper* soluble.

FACTOR «HELPER» ESPECÍFIC PER A IGE, IGG

Alguns experiments van posar en evidència que les cèl·lules d'animals preimmunitzats amb *carrier* i adjuvant de Freund no servien per a facilitar la producció d'IgE i, en canvi, les obtingudes d'animals estimulats amb *carrier* i alum eren capaces d'estimular la producció d'IgG i d'IgE.

Repetint el mateix experiment anterior, però emprant animals immunitzats de diverses maneres com a font de preparació de factor *helper* i assajat aquest amb una mateixa preparació de cèl·lules B estimulades per DNP-KHL, s'obtenen uns resultats que indiquen que les cèl·lules *helper* IgET i les IgGT probablement fabriquen diferents factors *helper* específics per a les cèl·lules B IgE i B IgG respectivament.

De tot això se'n poden deduir més interpretacions que, si bé cal considerar-les provisionals, considero que són versemblants i molt ben fonamentades i que poden tenir una gran transcendència tant per a la comprensió del mecanisme íntim de l'aparició d'una al·lèrgia reagínica com per a comprendre la mecànica de la resposta humoral en general.

Les conclusions provisionals que podríem extreure de tot l'exposat són les següents:

- a) El *carrier* i l'haptè no cal que estiguin a la mateixa molècula per a poder induir una resposta de tipus humoral al segon.
- b) L'efecte *helper* es pot produir a distància perquè està vehiculat per factors solubles produïts per cèl·lules T.

c) El factor *helper* per a la producció d'IgE és diferent del necessari per a la producció d'IgG.

d) Existeixen grups separats de cèl·lules precursoras de producció d'IgE i d'IgG, i segurament diferents cèl·lules T *helper* específiques per a IgE i per a IgG.

e) Segons la forma d'immunització (adjuvant) s'estimulen preferentment unes cèl·lules T *helper* o unes altres i aquest fet orienta la classe d'anticòs produït. És possible que aquests diferents jocs de cèl·lules T no siguin estimulables per igual per als diferents *carriers*. En aquest cas, el *carrier* tindria un paper decisiu a la resposta humoral i per tal com orientaria la classe d'anticòs produït. L'haptè, en canvi, no tindria importància en aquest sentit, però seria decisiu per a l'especificitat.

REPERCUSSIONS SOBRE LA RECERCA EN EL CAMP DE L'AL·LÈRGIA REAGÍNICA

Aquests treballs permeten reenfocar la recerca en el camp de l'al·lèrgia de tipus reagínic a diferents nivells.

- a) Proporció relativa d'anticòs IgE i afinitat.
 — La proporció marcarà el nombre de molècules específiques combinades amb el basòfil.
 — Juntament amb l'afinitat modularà la sensibilitat de la reacció de l'allergè.
- b) Proporció entre anticòs IgE i d'altres classes d'anticòs que poden competir amb l'antigen.
- c) Proporció de limfòcits T *helper* per IgE. Determinarà la tendència inherent de l'individu a respondre amb anticòs IgE.
 — ¿Possibilitat, tal vegada, de modificar aquest terreny per exposició a *carriers* determinats o per efectes d'algun adjuvant?
- d) Possibilitat de minvar la capacitat de producció de factor *helper* IgE.
 1. Estímul *in vitro* amb mitògens?
 2. ¿Minva del FH (factor *helper*) produït sobre limfòcits T adequadament preparats.
 3. És el factor *helper* espècie-específic?
- e) Possibilitat de trobar substàncies neutralitzadores del FH-IgE, o del receptor als limfòcits B.
- f) Possibilitat de modificar el *carrier* o l'adjuvant de manera que estimuli preferentment l'efecte «supressor» (cosa que ja s'ha iniciat amb un antigen de *rag-weed*) o d'estimular la producció d'IgE «no específica».
- g) Mesura del nombre de limfòcits B precursoras de cèl·lules productores d'IgE.