

Relación constante entre las intensidades de la respuesta en IgG no específica a los hematíes de buey y la específica a los de cordero

T. Tilló y J. Gras

Instituto Municipal de Investigación Médica. Barcelona.

Constant relationship between the intensity of the non-specific IgG response against ox red blood cells and the specific one against sheep red blood cells

We have studied in this paper the non-specific secondary response to ox erythrocytes compared to the specific one to sheep erythrocytes.

Groups of swiss mice were inoculated on day 0, and boosted on day 30, with various doses (5×10^8 , 2.5×10^8 , 1×10^8 , 0.25×10^8 and 0.25×10^8) of sheep erythrocytes; other groups of mice were inoculated in parallel with the same doses of sheep erythrocytes but these mice received, immediately after the booster, $10 \mu\text{g}$ of LPS in order to achieve, due to the synergistic effect, a more intense secondary response.

Both responses were measured by the plaque-forming cell technique; sheep erythrocytes were used for the specific response and ox erythrocytes for the non-specific one.

The results show that the non-specific IgG secondary response (against ox red cells) is always lower than the specific one (against sheep red cells) and always proportional to the specific one, the non-specific response being from 11.5% to 17.6% of the specific one.

This constant relationship suggest the occurrence of a population of clones that recognizes both epitopes with different affinities, the affinity difference being constant.

INTRODUCCION

Se ha señalado varias veces la polifuncionalidad de las regiones anticuerpo que se combinan con el antígeno, sugiriendo los resultados de diversos autores (Haimovich y Du Pasquier¹; Williamson²; Eisen et al³; Rosenstein et al⁴; Jackson y Richards⁵, que una misma inmunoglobulina puede ser complementaria a varios antígenos disimilares estructuralmente.

El concepto de la especificidad de los anticuerpos se afianzó especialmente después de la formulación de la teoría de Ehrlich y de los trabajos de Landsteiner⁶ mediante la unión de grupos químicos (haptenos) a proteínas, aunque el propio Landsteiner señaló que esta especificidad no era absoluta sino que se presentaban diferencias de afinidad y reacciones cruzadas.

Más recientemente se han obtenido datos claros en favor de la polifuncionalidad de los lugares de combi-

En el presente trabajo hemos estudiado la respuesta secundaria no específica a los hematíes de buey en relación con la respuesta secundaria específica, a los hematíes de cordero.

Grupos de ratones Swiss se han inoculado el día 0 y el día 30 con distintas dosis de hematíes de cordero (5×10^8 , 2.5×10^8 , 1×10^8 , 0.25×10^8 , 0.025×10^8) y paralelamente se inocularon otros grupos de ratones con estas mismas dosis de hematíes de cordero; inmediatamente después de la dosis secundaria se les administró $10 \mu\text{g}$ de LPS a fin de inducir un mayor espectro de producción de anticuerpos en la respuesta secundaria (debido al efecto sinérgico).

Ambas respuestas se han valorado en células formadoras de placas por millón, frente a hematíes de cordero la específica y a hematíes de buey la inespecífica.

Los resultados indican que existe una respuesta secundaria en IgG inespecífica (hematíes de buey) inferior siempre a la específica (hematíes de cordero) y que guarda una proporcionalidad constante a la intensidad de la respuesta específica, oscilando de un 11,5 a un 17,6%. Se sugiere que esta constancia en la relación va en favor de la existencia de una población de clones polifuncionales, con la misma diferencia de afinidad para uno y otro epítipo.

nación de los anticuerpos. En proteínas de mieloma se han comprobado que muchas pueden combinarse con más de un hapteno en forma competitiva; p. ej., la proteína 460, que es una inmunoglobulina de un mieloma IgA₂ de ratón, fija competitivamente DNP-lisina y menadionatioglucolato (la menadiona es una metil-naftoquinona) Eisen et al³; Konigsberg y Richards⁴; Jackson y Richards⁵.

Curiosamente, la demostración de la existencia en los anticuerpos de reacciones cruzadas en sus sitios de combinación se ha obtenido con anticuerpos monoclonales. Un caso de este tipo ha sido comprobado por Lane et al⁷ con el antígeno T del virus 40 de los monos (SV40), al observar que un anticuerpo monoclonal frente al mismo reacciona cruzadamente con proteínas normales de células huésped. Observaciones similares se han registrado con otros anticuerpos monoclonales.

Castro y Gras⁸ han estudiado la cinética de aparición de anticuerpos de reacción cruzada frente a varios antígenos heterólogos, hematíes de buey y de caballo, después de la estimulación persistente con

Correspondencia y solicitud de separatas: J. Gras. Instituto Municipal de Investigación Médica. P. Marítimo, s/n. 08003 Barcelona.

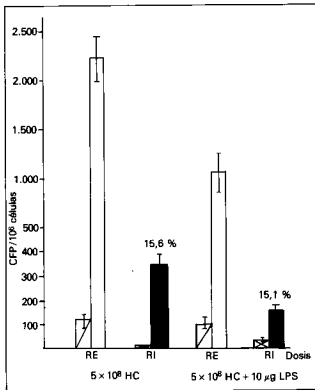


Fig. 1. Representación de las medias \pm DE de la respuesta secundaria a los 4 días, valorada en CFP/10⁶ directas (IgM = ◻) e indirectas (IgG = □) para la respuesta específica (RE) anti-HC, e (IgM = ◼) e (IgG = ◼) para la respuesta inespecífica (RI) anti-HB, en grupos de 20 ratones inoculados por vía intraperitoneal el día 0 y el día 30 con una dosis de 5 × 10⁸ hematies de cordero, comparativamente con el grupo de veinte ratones que han recibido 10 µg de LPS inmediatamente después de la segunda dosis de hematies. En la gráfica se expresa el porcentaje del título de IgG no específica anti-HB respecto al título de IgG específica anti-HC para los ratones inoculados únicamente con hematies de cordero, así como los que han recibido además LPS.

dosis óptimas de hematies de cordero en ratón; en sus resultados observaron que la reacción cruzada con hematies heterólogos alcanza niveles muy elevados en el momento de máxima respuesta a los hematies de cordero, tanto a nivel de CFP como a nivel de anticuerpos circulantes mercaptoetanol resistentes (IgG).

Dentro de este contexto hemos creído que puede ser interesante el estudio de la relación entre las respuestas no específicas y específicas frente a antígenos de reacción cruzada, estudiando la relación entre la respuesta secundaria a hematies de buey (HB) y hematies de cordero (HC), en ratones estimulados únicamente con dosis distintas de hematies de cordero, o que han recibido además LPS, inmediatamente después de la segunda estimulación antigénica, para sumar al estímulo antigénico el efecto sinérgico del LPS. Se ha observado una relación constante entre la intensidad de la respuesta específica y no específica.

Se sugiere que se debe a la existencia de una población de clonas polifuncionales con la misma diferencia de afinidad para uno y otro epítopo.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se han utilizado ratones Swiss albinos, machos y hembras indistintamente, de 2 a 3 meses de edad y cuyo peso oscilaba entre 30 y 40 g. Los animales fueron alimentados con una dieta sintética (Sanders, Tarragona) y se les suministró agua según necesidad.

Antígeno

Se utilizó como antígeno, hematies de cordero obtenidos por punción yugular semanal y procedentes del mismo cordero en todos los experimentos. La sangre se desfibrinó mediante agitación con perlas de cristal, inmediatamente después de su extracción. Las células fueron lavadas, resuspendidas en solución salina y se inyectaron por vía intraperitoneal 0,1 ml a una concentración de 5 × 10⁸, 2,5 × 10⁸, 1 × 10⁸, 0,25 × 10⁸ y 0,025 × 10⁸ hematies de cordero.

Lipopolisacárido W-E. Coli

El lipopolisacárido W-E. Coli 055:B5, desecado (presentado en frascos de 100 mg, n.º control 630903 de DIFCO laboratorios), se resuspendió en suero fisiológico y se administró a los ratones por vía intraperitoneal en una dosis única de 10 µg por ratón, inmediatamente después de suministrar los hematies en diferentes dosis, según la experiencia a realizar, a fin de compararlo con los grupos de ratones inoculados con hematies de cordero únicamente.

Valoración de la formación de anticuerpos

La técnica utilizada para la producción de anticuerpos es la de Jerne y Nordin⁹ de células formadoras de placas (CFP) por millón, según la modificación de Mishell y Dutton¹⁰ realizada sobre portaobjetos en un medio de agar al 1 %. Las células formadoras de placas (IgM) son leídas después de una hora y media de incubación a 37 °C a las que se le ha adicionado complemento de suero de cobayo a una dilución 1/10 en solución de Hanks al cabo de una hora. Para determinar las células formadoras de placas (IgG), después de una hora de incubación se adiciona antisuero de conejo anti-IgG de ratón (SIGMA M9637) a una dilución 1/100 en Hanks y una hora más tarde el complemento de cobayo, realizándose la lectura 2 horas y media después de iniciada la incubación.

Las respuestas se han valorado frente a hematies de cordero (HC) la específica y a hematies de buey (HB) la inespecífica.

RESULTADOS

1. Estudio de la respuesta secundaria específica y no específica para una dosis de 5 × 10⁸ hematies de cordero. Un grupo de 40 ratones fueron inoculados el día 0 con una dosis de 5 × 10⁸ hematies de cordero por vía intraperitoneal, administrándoles el día 30, a la mitad de ellos, una segunda dosis igual de hematies de cordero, por la misma vía y a la otra mitad, igualmente una dosis de 5 × 10⁸ hematies de cordero y acto seguido, 10 µg de LPS.

La respuesta secundaria, 4 días después de la administración de la segunda dosis de antígeno, se evaluó frente a hematies de cordero (respuesta específica) y hematies de buey (respuesta inespecífica).

Los resultados obtenidos se han visualizado en la figura 1, siendo los valores de IgM e IgG en el grupo de ratones tratados únicamente con hematies de 121,3 y 2218,5 CFP/10⁶ células respectivamente, para la respuesta específica, y de 14 y 347 CFP/10⁶ células para la respuesta inespecífica. El porcentaje del título de IgG anti-HB respecto al título de IgG anti-HC es de un 15,6 %.

En la serie de ratones inmunizados con hematies y que han recibido además LPS, los valores alcanzados fueron IgM: 102 e IgG: 1054 CFP/10⁶ células, en el caso de la respuesta específica, y de IgM: 32 e IgG: 159 CFP/10⁶ células en la respuesta inespecífica (fig. 1).

El porcentaje del título de anti-HB respecto al título de IgG anti-HC es del 15,1 %.

Es interesante destacar que la respuesta secundaria específica en los ratones inoculados con hematies de cordero y LPS es inferior a la del grupo inoculado sólo con hematies, observación que comentaremos en la discusión.

2. Estudio de la respuesta secundaria específica y no específica para una dosis de $2,5 \times 10^8$ hematies de cordero.

Dos series de 20 ratones cada una, fueron inoculadas el día 0 con $2,5 \times 10^8$ hematies de cordero y el día 30 una de las series recibió una segunda dosis igual de hematies, y la otra recibió inmediatamente después de la segunda dosis de $2,5 \times 10^8$ hematies de cordero, 10 µg de LPS.

Los resultados de la respuesta en IgM e IgG en el lote de animales únicamente tratados con hematies de cordero fueron de 56 y 1.376 CFP/10⁶ células respectivamente, en la respuesta específica y de 10,3 y 209,7 CFP/10⁶ células en la respuesta inespecífica, siendo el porcentaje del título de IgG anti-HB respecto al de IgG anti-HC un 15,2 %.

En el grupo de ratones tratados con la misma dosis de hematies pero con 10 µg de LPS, las respuestas en IgM e IgG son más elevadas que en el caso anterior; IgM: 262 e IgG: 2.911 CFP/10⁶ células, en la respuesta específica, e IgM: 33,2 e IgG: 490,5 CFP/10⁶ células en la respuesta no específica, siendo en este caso el porcentaje del título de IgG anti-HB respecto a la IgG anti-HC de un 16,8 % (fig. 2).

En el grupo de ratones a los que se les ha administrado LPS, la respuesta secundaria en IgG es mucho mayor que en los ratones a los que únicamente se les ha administrado hematies de cordero, debido a un efecto sinérgico del LPS ($p < 0,001$).

3. Estudio de la respuesta secundaria específica y no específica para una dosis de 1×10^8 hematies de cordero.

Hemos inoculado el día 0, dos grupos de ratones con 1×10^8 hematies de cordero por vía intraperitoneal a cada animal, y el día 30 les hemos administra-

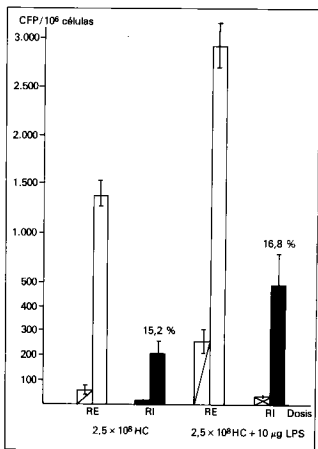


Fig. 2. Representación de las medias \pm DE de la respuesta secundaria a los 4 días, valorada en CFP/10⁶ directas (IgM = \blacksquare) e indirectas (IgG = \square) para la respuesta específica (RE) anti-HC, e (IgM = \blacksquare) e (IgG = \square) para la respuesta inespecífica (RI) anti-HB en grupos de 20 ratones inoculados por vía intraperitoneal el día 0 y el día 30 con una dosis de $2,5 \times 10^8$ hematies de cordero, comparativamente con el grupo de 20 ratones que han recibido 10 µg de LPS inmediatamente después de la segunda dosis de hematies. En la gráfica se expresa el porcentaje del título de IgG no específica anti-HB respecto al título de IgG específica anti-HC para los ratones inoculados únicamente con hematies de cordero, así como los que han recibido además LPS.

do una segunda dosis igual de hematies a uno de los grupos y al otro lote les hemos administrado 10 µg de LPS por vía intraperitoneal inmediatamente después de la segunda dosis de hematies.

Las valoraciones de IgM e IgG en la respuesta específica en los ratones tratados únicamente con las dos dosis de hematies son de 23,3 y 421,8 CFP/10⁶ células y en la respuesta no específica son de 5,6 y 62,0 CFP/10⁶ células respectivamente. El porcentaje del título de IgG anti-HB por IgG anti-HC es de 14,6 %.

En los ratones tratados con 1×10^8 hematies de cordero y a los que se les ha administrado LPS, la valoración de la respuesta específica de IgM e IgG es de 50 y 874 CFP/10⁶ células y la no específica es de

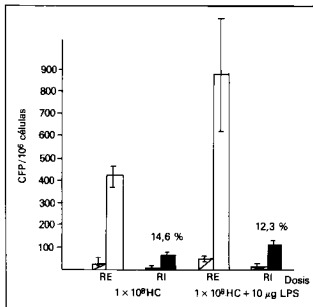


Fig. 3. Representación de las medias \pm DE de la respuesta secundaria a los 4 días, valorada en CFP/10⁶ directas (IgM - \square) e indirectas (IgG - \square) para la respuesta específica (RE) anti-HC, e (IgM - \boxtimes) e (IgG - \blacksquare) para la respuesta inespecífica (RI) anti-HB en grupos de 20 ratones inoculados por vía intraperitoneal el día 0 y el día 30 con una dosis de 1 × 10⁸ hematías de cordero, comparativamente con el grupo de 20 ratones que han recibido 10 µg de LPS inmediatamente después de la segunda dosis de hematías. En la gráfica se expresa el porcentaje del título de IgG no específica anti-HB respecto al título de IgG específica anti-HC para los ratones inoculados únicamente con hematías de cordero, así como los que han recibido además LPS.

8,7 y 108,2 CFP/10⁶ células respectivamente. El porcentaje del título de IgG anti-HB respecto a la IgG anti-HC es de 12,3 % (fig. 3).

De forma análoga al caso anterior, en el que utilizamos la dosis de 2,5 × 10⁸ hematías de cordero se observa un efecto sinérgico en la producción de IgG en la respuesta secundaria en los animales tratados con hematías de cordero y LPS (0,02 > p > 0,01).

4. Estudio de la respuesta secundaria específica y no específica para una dosis de 0,25 × 10⁸ hematías de cordero.

Hemos inoculado dos series de ratones con 0,25 × 10⁸ hematías de cordero cada una el día 0; el día 30 a un grupo le hemos administrado hematías de cordero en una dosis igual, y al segundo grupo 0,25 × 10⁸ hematías de cordero y 10 µg de LPS intraperitonealmente.

Los resultados de la serie de ratones inoculados únicamente con hematías de cordero, para la respuesta específica en IgM e IgG es de 6,1 y 25,0 CFP/10⁶ células respectivamente y para la no específica 2,0 y 4,4 CFP/10⁶ células, siendo el título de IgG anti-HB respecto a la IgG anti-HC de un 17,6 %.

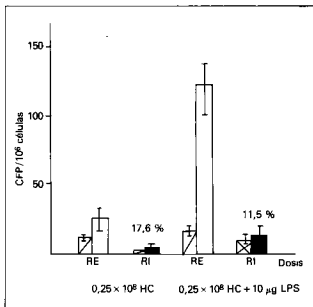


Fig. 4. Representación de las medias \pm DE de la respuesta secundaria a los 4 días, valorada en CFP/10⁶ directas (IgM - \square) e indirectas (IgG - \square) para la respuesta específica (RE) anti-HC, e (IgM - \boxtimes) e (IgG - \blacksquare) para la respuesta inespecífica (RI) anti-HB, en grupos de 20 ratones inoculados por vía intraperitoneal el día 0 y el día 30 con una dosis de 0,25 × 10⁸ hematías de cordero, comparativamente con el grupo de 20 ratones que han recibido 10 µg de LPS inmediatamente después de la segunda dosis de hematías. En la gráfica se expresa el porcentaje del título de IgG no específica anti-HB respecto al título de IgG específica anti-HC para los ratones inoculados únicamente con hematías de cordero, así como los que han recibido además LPS.

En el grupo de ratones inoculados con hematías de cordero y LPS, la valoración de la respuesta secundaria es de 16,6 y 122,7 CFP/10⁶ células de IgM e IgG respectivamente y 9,7 y 14,2 CFP/10⁶ células en la respuesta no específica. El porcentaje del título de IgG anti-HB respecto a la IgG anti-HC es del 11,5 % (fig. 4).

Observamos también para esta dosis una mayor producción de IgG en la respuesta secundaria específica en los animales tratados con LPS respecto a los no tratados (p < 0,001).

5. Estudio de la respuesta secundaria específica y no específica para una dosis de 0,025 × 10⁸ hematías de cordero.

De forma análoga a los casos anteriores hemos realizado un estudio comparativo entre ratones inoculados intraperitonealmente sólo con hematías de cordero a una dosis pequeña de 0,025 × 10⁸ células el día 0 y el día 30, y ratones inoculados con esta misma dosis ambos días pero a los que se les administró, además, 10 µg de LPS por vía intraperitoneal, inmediatamente después de la segunda dosis de hematías; la respuesta secundaria se ha valorado 4 días después de la segunda inoculación.

Los resultados obtenidos en la respuesta secundaria, en los animales tratados únicamente con HC son, para la respuesta específica, de 2,6 y 2,07 CFP/10⁶ células en IgM e IgG respectivamente, y de 1,5 y 1,1 CFP/10⁶ células para la inespecífica. La diferencia entre ambas respuestas no es significativa ($p > 0,90$), por lo que el que la inespecífica corresponda a un 53% de la específica no es valorable.

En el grupo de ratones tratados con las mismas dosis de HC y además con LPS, los resultados de la respuesta secundaria en IgM e IgG corresponden a 16,0 y 5,4 CFP/10⁶ células, respectivamente, en la específica y a 6,5 y 3,7 en la inespecífica. La diferencia entre el título de específica e inespecífica tampoco es significativa en este caso ($0,50 > p > 0,40$), por lo que el que la respuesta no específica corresponda a un 68% de la específica, tampoco es valorable. La respuesta en este grupo de ratones a los que se les inyectó LPS, además de los HC, es ligeramente superior a la del grupo anterior sólo inyectando con HC, pero la diferencia no es estadísticamente significativa ($0,20 > p > 0,01$), lo que implica que en este caso no se ha observado efecto sinérgico del LPS.

DISCUSION

En un trabajo anterior¹¹ estudiamos la respuesta primaria y secundaria en IgM e IgG en ratones inoculados el día 0 y el día 30 con hematíes de cordero (HC), comprobando que el máximo de respuesta secundaria en IgG se presenta al cuarto día de la segunda inyección. Por ello, en este trabajo estudiamos la relación entre la respuesta secundaria en IgG no específica anti-HB y la respuesta secundaria específica anti-HC, valoradas al cuarto día del segundo estímulo en HC.

Con las dosis de 5×10^8 , $2,5 \times 10^8$, 1×10^8 y $0,25 \times 10^8$, hemos comprobado que la respuesta en IgG no específica (anti-HB) guarda una relación constante con la respuesta en IgG específica (anti-HC), ya que el porcentaje del título de IgG no específica en relación al título de IgG específica, es constante, correspondiente a un 15,6, 15,2, 14,5 y 17,6% respectivamente (figs. 1-4a).

En el grupo de animales inoculados con las mismas dosis de HC (5×10^8 , $2,5 \times 10^8$, 1×10^8 y $0,25 \times 10^8$) pero que han recibido además 10 μ g de LPS después de la segunda dosis, hemos observado también esta relación constante entre una y otra respuesta, ya que el porcentaje del título de IgG no específica, en relación al título de IgG específica, es asimismo constante, correspondiente a un 15,1, 16,8, 12,3 y 11,5% respectivamente (figs. 1-4b).

Esta relación constante entre respuesta específica y no específica no se observa en el grupo de animales tratados con la mínima dosis de HC ($0,025 \times 10^8$ HC), ni en los inyectados además con LPS. No obstante, en estos dos grupos de animales el título de la respuesta secundaria en IgG es ligeramente inferior al de la respuesta secundaria en IgM, lo que implica que

TABLA I La proporcionalidad de la respuesta no específica anti-HB en relación a la específica anti-HC, es constante*

Título anti-HC	Título anti-HB	% de HB
2.911,2	490,5	16,8
2.218,5	347,1	15,6
1.376,0	209,7	15,2
1.054,2	159,6	15,1
874,0	108,2	12,3
421,8	62,6	14,6
122,7	14,2	11,5
25,0	4,4	17,6

* Los títulos corresponden a los valores promedio de cada grupo, independientemente de si corresponden al estímulo por HC solos o, HC + LPS, ordenados de máxima a mínima respuesta. Los títulos están expresados en CFP/10⁶ células.

en realidad no se ha producido una respuesta secundaria en IgG en ninguno de los dos grupos. Además, como ya hemos señalado, las diferencias entre la respuesta específica y no específica no son significativas, por lo que las relaciones entre ambas no son valorables.

Para que se observe mejor esta proporcionalidad constante entre respuesta específica y no específica, hemos reunido en la tabla I todos los títulos específicos y no específicos de los grupos en los que las respuestas son valorables estadísticamente, de forma independiente a que sean resultado de un estímulo con HC solos o de HC + LPS ordenados en columna de máximo a mínimo y al lado, el porcentaje de no específica en relación a la específica. De su observación creemos que no ofrece dudas que dicha relación presenta una proporcionalidad constante, tanto para la respuesta inducida por los hematíes solos como en la respuesta amplificada a los mismos por la acción del efecto sinérgico del LPS.

En relación a dicho efecto sinérgico, los resultados expuestos en este trabajo coinciden con los observados en otro trabajo, en el que señalábamos que dicho efecto es inverso a la intensidad de la respuesta obtenida con el estímulo antigénico solo¹². Si el estímulo antigénico da una respuesta intensa, el efecto sinérgico no se presenta o no es valorable, mientras que si dicho estímulo antigénico induce una respuesta pequeña, el efecto sinérgico es grande.

En este trabajo hemos visto, efectivamente, como con la dosis de 5×10^8 HC que induce una respuesta intensa, el efecto sinérgico no se presenta, sino que la respuesta es inferior. Por el contrario, en los grupos que han recibido dosis menores ($2,5$, $1,0$ o $0,25 \times 10^8$ HC), en los que las respuestas son menores, el efecto sinérgico es evidente y claramente significativo. En el último grupo, inyectado con una dosis muy pequeña ($0,025 \times 10^8$ HC) en el que no se observa reacción secundaria significativa, tampoco se observa efecto sinérgico. Este efecto sinérgico comprobado por nosotros es muy conocido, y así Sjöberg et al¹³ observan que el efecto sinérgico es

inverso al de la dosis de antígeno y que a dosis grandes de éste, puede tener un efecto inhibitorio.

En la actualidad, como hemos señalado al principio, se tienen bastantes datos de la posible polifuncionalidad de las regiones de combinación de los anticuerpos^{1,5, 14, 15}, incluso en anticuerpos monoclonales¹⁶; a esta polifuncionalidad de las regiones de combinación de los anticuerpos, se le denomina también "multiespecificidad"¹⁵ y más recientemente "degeneración" de la especificidad anticuerpo¹⁶.

Estos datos demuestran claramente que una *misma inmunoglobulina-anticuerpo* puede poseer una región de combinación capaz de fijarse a *dos o más haptenos o determinantes antigénicos, con distinta afinidad*. Lo que no se sabe con exactitud es si, dentro de la misma región, es el mismo sitio, son sitios separados pero próximos o bien se fija en un mismo sitio pero en diferentes zonas del mismo. En el caso de la proteína 460 de mieloma IgA de ratón capaz de fijar DNP y menadiona (metilnaftoquinona) puede inhibirse químicamente la fijación de uno y otro de ellos, por lo que los dos sitios están separados (unos 24 Å)¹⁷; estos dos haptenos, en apariencia tan distintos, poseen una estructura en el anillo benzénico que puede sobreponerse¹⁷. La globulina 315 de un mieloma IgA de ratón¹⁷ que también puede fijar DNP y menadiona, parece que los fija en un sitio que se sobrepone de la región de combinación. También han comprobado que la inmunización con 2,4-DNP o 2,4,6-TNP induce anticuerpos capaces de fijarse con la menadiona¹⁷.

La posibilidad de esta "extraña" (e.d., no esperada) reacción cruzada como la califican Michaelides y Eisen¹⁷ puede explicarnos por lo menos algunas de las reacciones cruzadas clásicamente conocidas, como las de los isómeros del ácido bencensulfónico, comprobadas por Landsteiner⁶. De esta polifuncionalidad o multiespecificidad de la región de combinación de una inmunoglobulina se deduce, como señalan Richards et al¹⁵, que la especificidad de un antisuero habitual es consecuencia de un *fenómeno de población*. La reacción cruzada entre los hematíes de certero y los de buey es conocida de tiempo. En este trabajo comprobamos que la relación entre el título específico antihematíes de certero y el no específico antihematíes de buey es constante. Esta reacción cruzada del antisuero obtenido inmunizado con los hematíes de certero, puede explicarse con las dos posibilidades siguientes: a) que tengan un antígeno común o dos antígenos distintos, pero con un determinante antigénico común, o sea igual. En ambos casos cabe pensar que el anticuerpo o la familia de anticuerpos que se inducen, tienen el mismo sitio de combinación (paratopo) o la misma familia de sitios de combinación (paratopos), tanto si se inducen por el estímulo de unos u otros hematíes. Si ello fuese así, la diferencia de título valorada con HC o HB, correspondería a la diferencia de sensibilidad al valorar los mismos anticuerpos frente a una distinta densidad o situación del correspondiente determinante antigéni-

co (epitope) en uno u otro hematíe. Esto explicaría fácilmente la constancia en la proporcionalidad de las intensidades entre ambas respuestas, pero parece difícil de explicar la diferencia tan grande entre los títulos valorados con HC o con HB; es difícil de explicar aunque la densidad del antígeno común o del determinante antigénico común, sea distinto en uno u otro hematíe, ya que los valoramos a nivel de CFP y no por aglutinación, reacción en la que la diferencia de densidades tiene una influencia muy superior.

La segunda posibilidad, b) es la de que tengan antígenos distintos, con determinantes antigénicos distintos pero con similitudes estructurales, capaces de inducir anticuerpos polifuncionales. En estas circunstancias, el anticuerpo o la población de anticuerpos inducidos frente a uno de ellos, en este trabajo los HC, tendrían sitios de combinación (paratopos) capaces de unirse con ambos determinantes antigénicos (epitopes), es decir serían polifuncionales o poliespecíficos, pero con distinta afinidad para uno u otro, en este caso muy superior para los hematíes de certero. Creemos que esto explica muy bien la neta diferencia entre los títulos, valorados con unos u otros hematíes. La comprobación de una relación constante entre las intensidades de ambas respuestas sugiere que esta polifuncionalidad es a nivel de cada clona de los que integran la población de células B estimuladas por el correspondiente determinante antigénico. Si la población de células B estuviese integrada por clones, capaces cada uno de ellas de combinarse con afinidades distintas para una u otra variante del determinante antigénico, parece difícil aceptar que al modificarse la intensidad de la respuesta se mantuviese la constancia de la relación entre una y otra, incluso cuando la diferencia de intensidad es debida al efecto sinérgico.

Estamos comprobando en la actualidad lo que ocurre si absorbemos los sueros de la respuesta secundaria de ratones inoculados con hematíes de certero, con la misma pauta descrita en este trabajo, con hematíes de certero o de buey. La absorción con hematíes de certero elimina totalmente el título para unos y otros hematíes. La absorción con hematíes de buey, elimina totalmente la reacción con los mismos, pero reduce muy poco el título a los hematíes de certero; ampliaremos estos datos, pero en principio parecen estar de acuerdo con la interpretación que acabamos de exponer, de que se trata de una misma población de anticuerpos con distinta afinidad para unos u otros hematíes.

Esta polifuncionalidad o multiespecificidad tiene un elevado valor biológico pues multiplica extraordinariamente la posibilidad que tiene un organismo de responder a cualquier estímulo, por artificial que sea, con una población de linfocitos relativamente limitada, como señala Williamson²; p. ej. frente al hapteno NIP. Tiene también un gran valor en la ontogenia de la respuesta inmunológica, pues facilita mucho su maduración y explica la paradoja de que entre los primeros anticuerpos que aparecen se encuentran los

antihaptenos artificiales como el DNP y el TNP, que tienen una reacción cruzada con el 5-acetouracilo¹⁸.

Bibliografía

- Haimovich J, Du Pasquier L. Specificity of antibodies in amphibian larvae possessing a small number of lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:1.898-1.902.
- Williamson AR. Extent and control of antibody diversity. *Biochem J* 1973; 130:325-333.
- Eisen HN, Michaelides MC, Underdown BJ, Schulenburg EP, Simms ES. Myeloma proteins with anti-hapten antibody activity. *Fed Proc* 1970; 29:78-84.
- Rosenstein RW, Musson RA, Armstrong MYK, Konigsberg WH, Richards FF. Contact regions for dinitrophenyl and menadione haptens in an immunoglobulin binding more than one antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:877-881.
- Jackson P, Richards FF. The hapten-binding region of protein 460: Sequence of a sulphhydryl containing peptide which effects menadione binding. *J Immunol* 1974; 112:96-100.
- Landsteiner K. The specificity of serological reactions. Harvard University Press, Massachusetts, 1946.
- Lane DA, Koprowski H. Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies. *Nature* 1982; 296: 200-202.
- Castro MR, Gras J. Cinética de la respuesta no específica en ratones estimulados con una dosis única o con dosis persistentemente repetidas de hematias de carnero. *Inmunología* 1982; 3:111-117.
- Jerne NK, Nordin AA. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. *Science* 1963; 140:405-406.
- Mishell RI, Dutton RW. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J Exp Med* 1967; 126:423-442.
- Gras J, Tillo T. Temporal relationship between primary injection and cyclophosphamide administration necessary for the inhibition of the priming for a secondary response. *Ann Immunol (I. Pasteur)* 1981; 132c:145-155.
- Tillo T, Gras J. Estudio *in vivo* de la acción sinérgica del LPS en la respuesta secundaria, administrado conjuntamente con el antígeno, en el modelo de hematias de cordero en el ratón. *Inmunología* 1983; 1:18-24.
- Sjöberg O, Andersson J, Moller G. Lipopolysaccharide can substitute for helper cells in the antibody response *in vitro*. *Eur J Immunol* 1972; 2:326-331.
- Richards FF, Konigsberg WH, Rosenstein RW, Varga JM. On the specificity of antibodies. *Science* 1975; 187:130-137.
- Richards FF, Rosenstein RW, Varga JM, Konigsberg WH. Antibody combining regions. En: Good RA, Fay SB eds. *Comprehensive Immunology*. vol. 5. Immunoglobulins. Nueva York, Plenum Medical Book Company, 1978; 117-154.
- Sperling R, Francus T, Sisking GW. Degeneracy of antibody specificity. *J Immunol* 1983; 131:882-885.
- Michaelides MC, Eisen HN. The strange cross-reaction of menadione (vitamin K₃) and 2,4 Dinitrophenyl ligands with a myeloma protein and some conventional antibodies. *J Exp Med* 1974, 140:687-702.
- Underdown BJ, Eisen HN. Cross reactions between 4,4-dinitrophenyl and 5 acetouracil groups. *J Immunol* 1971; 106:1.431-1.441.