

R. 6.756



I  
T.D.  
D/10

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE  
DE ANIMALES SOMETIDOS A DOSIS SUBLIMINARES  
DE IRRADIACION

ESTUDIO EXPERIMENTAL CON LA AYUDA DE  
ANTIGENOS CRISTALINIANOS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
POR LA FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA  
DE  
FRANCISCO DE PAULA DOÑA GONZALEZ  
Licenciado en Medicina y Cirugía



D. JUAN RAMON ZARAGOZA RUBIRA y D. FRANCISCO MALAGON COBOS, Catedrático de Terapéutica Física General y Profesor Agregado de Anatomía Descriptiva y Topográfica.

C E R T I F I C A N :

Que han dirigido conjuntamente el trabajo de D. Francisco de Paula Doña Gonzalez titulado: CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE ANIMALES SOMETIDOS A DOSIS SUBLIMINARES DE IRRADIACION 7 UN ESTUDIO EXPERIMENTAL CON LA AYUDA DE ANTIGENOS CRISTALINIANOS, realizados en ambos Departamentos y que reúne las condiciones legales precisas para su presentación y lectura como Tesis Doctoral.

En Sevilla

Mayo

Francisco Malagón

DEDICATORIA

A mis padres

FRANCISCO Y CRISTINA

A G R A D E C I M I E N T O

La realización de cualquier objetivo, supone siempre dedicación, trabajo, dificultades y obstáculos. Cuando la culminación de los esfuerzos pasados, nos hacen ver próximo sus frutos, y - más, cuando la coronación de ello es la TESIS - DOCTORAL, meta de una vida, nos asaltan dos alegres vivencias: Una, el haber culminado una etapa formativa y otra las perspectivas de nuevos horizontes que se vislumbran al final de esta etapa.

Ello dá paso, no obstante, al agradecimiento y al reconocimiento a todos y cada uno de los - que con sus estímulos y claras orientaciones hicieron posible esta tesis.

Pecaría de ingrato y de descortés si en este momento no recordara con respeto y cariño a mis primeros Maestros; en los viejos tiempos de mis

balbuceos radiológicos: los Profs. Gil y Gil, Salvador Gallardo y como nó, a mi actual amigo y maestro que con sus sugerencias oportunas, sus indicaciones precisas y gran dosis de paciencia y afecto ha dirigido esta Tesis; mi actual Catedrático el Prof. Zaragoza Rubira.

Asímismo queremos patentizar nuestro reconocimiento y gratitud al Prof. Genis Galvez. Gracias también y a la eficacísima y tenáz labor de orientación del Dr. Malagón Cobos, sin cuya ayuda hubiera sido imposible este trabajo. A los Drs. Vega y Morales que en el Departamento de Pediatría y Puericultura procesaron todos los datos hemáticos de esta Tesis.

Al Sr. Fernandez, veterinario y Director del Animalario de la Facultad de Medicina. Y a todos aquellos, laborantes y auxiliares de clínica, que me ofrecieran una leal y desinteresada colaboración. También deseo dar mis gracias a todos los compañeros de la Cátedra que ofrecieron su apoyo moral. Y finalmente si en una sola palabra pudiera encerrar amor, agradecimiento, veneración, recuerdo y gratitud, a quien día a día compartió

conmigo todas las penas y alegrías de mi vida, no vacilaría en dedicársela a ELLA, a quien desde lo más profundo de mi corazón vá dedicada esta TESIS: a mi MADRE.

## I N D I C E

Capítulo I

DESARROLLO HISTORICO DE LAS TEORIAS INMUNITARIAS

Desarrollo de la idea de inmunidad

Inmunidad humoral y celular

Concepto de inmunidad

La respuesta inmune primaria

Capítulo II

INMUNIZACION: CONCEPTO Y TEORIAS

Antigenicidad

Mecanismos de inducción inmunológica

Características generales de la respuesta inmune  
específica

Concepto de inmunogenicidad

Teorias sobre la formación de anticuerpos: ideas  
generales

a) Teorias de instrucción

b) Teoria de selección clonal

c) Teoria de la línea germinativa

### Capítulo III

#### ACCION BIOLÓGICA DE LAS RADIACIONES IONIZANTES

Naturalez de la radiación

Absorción de la radiación

Producción de ionizaciones

Lesión bioquímica

Lesión celular

Lesión tisular

Radiosensibilidad celular y tisular

Radiosensibilidad de los órganos

Radiosensibilidad general del organismo

Afectación del organismo por irradiación total

### Capítulo IV

#### ACCION DE LA RADIACION SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA.

Efecto de las grandes dosis de radiación

a) Acción sobre la inmunidad natural

b) Acción sobre la inmunidad adquirida. Respuesta primaria.

c) Acción sobre la inmunidad adquirida: respuesta secundaria.

Efectos de la radiación sobre células del sistema inmunitario

## Capítulo V

### MATERIAL Y METODOS

Propósito de la experimentación

Condiciones de la experimentación

Animales de experimentación

Antígeno empleado

Técnica de irradiación

Sistemática de la experimentación

Esquema de trabajo

Control de los resultados: estudios hemáticos

Control de los resultados: técnicas de electroforesis.

Control de los resultados: método de hemaglutinación.

## Capítulo VI

Gráficos y fotografías

## Capítulo VII

Comportamiento y discusión de los resultados

Comportamiento hemático celular de los lotes de animales controles y experimentales.

Comportamiento y discusión de los resultados bio  
químicos

Capítulo VIII

Conclusiones

Bibliografía

C A P I T U L O - I

DESARROLLO HISTORICO DE LAS  
TEORIAS INMUNITARIAS

### Desarrollo de la idea de inmunidad.

El origen de la inmunología surge del conocimiento común de que las personas que han sobrevivido a una enfermedad infecciosa raramente vuelven a contraerla durante su vida. Así, Tucídides nos relata que cuando la peste hizo estragos en Atenas, los enfermos y los moribundos no hubieran recibido ninguna clase de cuidados, a no ser, por la dedicación de aquellos que ya habían sufrido la enfermedad y habían sanado, ya que era sabido que nadie la padecía por segunda vez.

En la medicina occidental la inmunización comienza con la introducción de la variolización y .

y de la vacunación. En 1733 Voltaire en su obra Cartas filosóficas escribía con elogio sobre la costumbre china practicada desde el siglo XI de la inducción profiláctica de la viruela, aspirando por la nariz "del mismo modo que nosotros tomamos rapé", polvos secos procedentes de costras de viruela.

El concepto empírico de inmunidad es muy antiguo, y se le puede definir propiamente como el estudio de la resistencia a las infecciones. Varios siglos antes del descubrimiento de la teoría microbiana de las enfermedades infecciosas, ya se sabía que la convalecencia de una enfermedad se acompañaba de una resistencia especial contra la reinfección. Por lo tanto los conocimientos básicos de la inmunología clásica precedieron a la bacteriología y contribuyeron a su desarrollo. Posteriormente contribuyeron a su desarrollo. Posteriormente contribuyeron al desarrollo de la inmunología los microbiólogos, fisiólogos, biólogos, patólogos bioquímicos y quedaron a su vez enriquecidos por la aplicación de los conocimientos inmunológicos.

En la figura 1 se presenta un resumen de los descubrimientos de mayor importancia en inmunología.

En cuanto a la aplicación intradérmica de costras en polvo, según Voltaire, los turcos habían adoptado la costumbre de la inoculación de los habitantes de Caucasia, de los cuales dice: "Son pobres y sus hijas son hermosas y en verdad ellas son el objeto principal de su comercio, pues proveen de belleza los serallos de los sultanes de Turquía y Persia. Pero cuando la viruela se vuelve epidérmica, aquel comercio se suspendía durante varios años. Con el fin de preservar la vida y belleza de sus hijas no había más recurso que provocarles la viruela en su primera niñez, lo cual se hacía inoculando en el cuerpo de la pequeña una píntula escogida entre las más corrientes y del tipo de viruela más favorable.

Esta inmunización primitiva fué llevada a Inglaterra en el siglo XVIII por PILARINI y TIMONI y difundida más tarde por Lady MONTAGNE, el inicio del reinado de Jorge I, Lady Worthey Montague residió en el Imperio Otomano donde su marido era emba

jador de Inglaterra, y, conocedora de las prácticas de variolización, las aplicó a su propia hija. Animada por el éxito obtenido, a su regreso de Inglaterra comunicó el feliz resultado de su experiencia a la Princesa de Gales (luego esposa de Jorge II).

Sin embargo, las grandes divergencias entre los diversos métodos de variolización que pronto aparecieron, llegaron a producir algunas muertes, por lo cual el sistema no se podía considerar completamente seguro. Un nuevo enfoque del problema fué considerar el dato por el inglés Edward Jenner médico rural, quien descubrió que la inoculación de las costras de la vacuna, enfermedad sufrida por las vacas sobre todo en las ubres y transmitida a los ordeñadores, protegía a los inoculados del contagio de la viruela.

El desarrollo ulterior de las inmunizaciones preventivas, se debió a Louis PASTEUR que acuñó la palabra "vacuna" en honor al trabajo de JENNER. Las investigaciones de PASTEUR se llevaron al establecimiento de la teoría microbiana de las enfermedades infecciosas, y al desarrollo de técnicas para

el cultivo "in vitro" de microorganismos. Se obtuvo así un nuevo método de vacunación con el empleo de microorganismos vivos (atenuados por el calor) o muertos.

Durante sus investigaciones PASTEUR observó que los cultivos antiguos (atenuados) de microorganismos de colera aviario inoculados a gallinas sanas no producían enfermedad. Sorprendentemente estas gallinas se volvían resistentes a una infección ulterior, por el microorganismo normal; y su inmunidad era duradera. Este método de cultivos vivos atenuados, para inmunización activa, sigue siendo nuestra terapéutica de elección, para la profilaxis de muchas enfermedades infecciosas.

Más tarde ROBERT KOCH al estudiar la etiología bacteriana de las enfermedades infecciosas - descubrió el bacilo de la tuberculosis. Al intentar crear una vacuna contra la TBC observó KOCH el fenómeno conocido hoy como hipersensibilidad tardía o inmunidad debida a células.

Después del aislamiento del bacilo de la difteria, ROUX y YERSIN demostraron que este microorganismo producía una exotoxina soluble muy po-

tente. Esta toxina fué utilizada por VON BERING y KITASATO para inocular animales, que produjeron en su suero una sustancia neutralizante de la toxina, llamada anti-toxina. Esta capacidad neutralizante pudo ser tranferida a animales no inoculados, mediante la inyección del suero, método - que se llamó inmunización pasiva. Este trabajo - fué el modelo de las técnicas modernas de preven- ción de enfermedades por inmunización pasiva (in- munoterapia).

Las investigaciones de PFEIFFER y BORDET, per- mitieron diferenciar en el suero, una sustancia - distinta de los anticuerpos que se llamó complemen- to y que también intervenía en la destrucción de las bacterias.

INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR

Hasta principios de siglo, las escuelas francesa y alemana dominaron el campo de la investigación inmunológica. En esta época existían dos puntos de vista divergentes, a partir de los cuales siguió desarrollándose más tarde esta ciencia:

1 - El humoral, que se ocupaba del estudio de los productos químicos (anticuerpos) producidos por el organismo, y

2 - El celular, más preocupado de los efectos biológicos de células completas que intervenían en la respuesta del huésped frente a sustancias extrañas (Fig. 1-1).

PAUL ERLICH creó la teoría humoral de formación de anticuerpos. METCHNIKOFF desarrolló casi al mismo tiempo la teoría celular de la inmunidad. Ambas teorías eran correctas, pues en el individuo los factores humorales y celulares presentan estrechas relaciones y dependencias.

La teoría de EHRlich de la cadena lateral sugería que sobre la superficie de las células vivas existían previamente receptores específicos, capaces de reaccionar con toxinas. El exceso de receptores se podía más tarde liberar a la circulación, como anticuerpos.

Después de publicada esta teoría, los principales esfuerzos inmunológicos se dedicaron a la identificación, estudio y función biológica de los factores humorales.

La teoría de METNICHKOFF, acerca de la inmunidad celular suponía que las células de limpieza - del organismo, los fagocitos, identificaban inicialmente las sustancias extrañas, y constituían también el sistema de defensa primario. Las ideas del investigador ruso fueron ignoradas durante varias décadas, pero en la actualidad constituyen un cam

po de intensa investigación inmunológica.

En realidad, para comprender los fundamentos de los fenómenos inmunológicos que tienen como resultado la lesión tisular, es preciso hacer intervenir factores tanto celulares como humorales. Por ello, hoy día siguen existiendo dos escuelas de investigación inmunológica: la humoral y la celular. La humoral alcanzó su apogeo con el descu**br**imiento y la caracterización de las moléculas de proteínas provistas de actividad de anticuerpos: las inmunoglobulinas. Este trabajo culminó con la dilucidación de la serie total de ácidos aminados de algunas moléculas de anticuerpos. Por otra parte, el campo de la inmunidad celular explora activamente desde el punto de vista de la protección contra agentes extraños al organismo, el rechazo de injertos y la inmunidad tumoral en el hombre. La dicotomía entre lo celular y lo humoral puede ilustrarse también por las observaciones clínicas de mayor sensibilidad a las afecciones de individuos con defectos congénitos del sistema inmunológico. Algunos de ellos carecen de la función protectora humoral, pero conservan-

la celular con una actividad humoral normal; otros sufren las deficiencias simultáneas de ambos sistemas. Evidentemente, los dos campos son de primordial importancia para el hombre. Aunque insistimos en uno u otro aspecto, son inseparables los factores de inmunidad celular y humoral.

C O N C E P T O   D E   I N M U N I D A D

En 1905 el biólogo ruso LIE METCHNIKOFF publicó su famoso tratado, La inmunidad en las enfermedades infecciosas. Aunque las ideas presentadas en el libro no fueron bien recibidas por sus contemporáneos, METCHNIKOFF presentó los fundamentos de la inmunidad celular, que en la actualidad son aceptados por la inmunología moderna. En esta obra se encuentran las descripciones y definiciones clásicas de la inmunidad. METCHNIKOFF reconoció también con claridad, la importancia del factor huésped en la patogenia de las enfermedades infecciosas. Así es como por ejemplo en los diabéticos aparecen forúnculos, por desarrollo de

staphylococos piógenos, microorganismo en general abundante sobre la piel y las mucosas del hombre. En estos casos la diabetes suprime la inmunidad que caracteriza al individuo sano. Los individuos que albergan neumococos en sus mucosas pueden pasar mucho tiempo sin sufrir neumonia fibrinosa, o ninguna de las demás enfermedades debidas a este microorganismo. Pero en ocasiones, a consecuencia de alguna circunstancia especial, por ejemplo un resfriado común, el estado refractario se transforma en una sensibilidad más o menos pronunciada.

Vemos pues, que METCHNIKOFF a principio de si glo había establecido claramente que "además de las causas de enfermedad que provienen del mundo exter no y que son representada por los microbios, exis ten otras causas dentro del propio organismo".

Históricamente la palabra inmunidad proviene del latín inmunis (libre de impuestos o cargos). En sentido clásico designaba, como vimos anteriormente, la resistencia relativa del huesped a la in fección por un microbio dado. En la actualidad es evidente que las respuestas inmunes no son siempre beneficiosas, y que no siempre se relacionan con .

la resistencia a la enfermedad o a la infección. Por el contrario, pueden tener consecuencias desagradables o lesivas para el huésped. Estos efectos lesivos le llamaron hipersensibilidad o alergia. Además, el sistema inmunológico es capaz no sólo de desempeñar un papel de defensa contra agentes infecciosos, sino de cumplir funciones biológicas diversas en el campo de la homeostasia y de la vigilancia.

A principios de siglo VON PIRKET emitió una hipótesis para explicar las múltiples facetas de la respuesta inmunitaria. Acuñó la palabra "alergia" (de "allos-ergos", reacción extraña) para designar una "reactividad alterada" del huésped: uno de los tipos de reacción se consideraba inmunidad, el otro hipersensibilidad. VON PIRKET no distinguía entre el mecanismo de las respuestas beneficiosas y el de las lesivas, y pensaba que todas ellas eran manifestaciones de un fenómeno biológico común de sensibilización al que se aplicaba el término alergia. Con ello, restringía el término de inmunidad a la protección contra agentes infecciosos y el término alergia a una reactividad más general del.

huesped frente a sustancias extrañas.

Al pasar los años, las palabras alergia e inmunidad fueron cambiando de significado; inmunidad significa ahora, lo que VON PIRKET definía inicialmente como alergia, mientras que lo que la palabra alergia se ha vuelto sinónimo de hipersensibilidad. Sin embargo se acepta hoy día en inmunología las ideas de VON PIRKET acerca del gran alcance de la respuesta inmune.

Actualmente la palabra inmunidad debería comprender "todos los mecanismos fisiológicos que permiten al ser vivo, reconocer algunas sustancias como extrañas a su ser, y neutralizarlas, eliminarlas o metabolizarlas, con o sin lesión de los tejidos propios".

Las respuestas inmunológicas pueden dividirse en inespecíficas y específicas. Las específicas dependen de la exposición previa a una configuración extraña con identificación ulterior y reacción subsiguiente. En cambio las inespecíficas se presentan de la misma manera tanto después de la exposición inicial como de exposiciones ulteriores a una configuración extraña; pues, aunque sean selecti-

vas respecto a diferenciar lo "propio" de lo "ajeno", no requieren una identificación específica.

F U N C I O N E S   D E   L A S

R E S P U E S T A S   I N M U N O L O G I C A S

Desde el punto de vista moderno, las respuestas inmunológicas cumplen tres funciones principales de defensa, de homeostasia, y de vigilancia - (cuadro 2-1). La primera se relaciona con resistencia a la infección por microorganismos; la segunda, con la eliminación de componentes "propios" gastados (antiguos); la tercera con la identificación y destrucción de células mutantes.

La primera función (defensa contra la invasión por microorganismos) fué el centro del trabajo inmunológico durante más de un siglo. Si tienen éxito los elementos celulares de defensa, el huésped triunfa en su lucha contra los microorganismos. Pe

ro si los elementos resultan hiperactivos, pueden observarse fenómenos indeseables como alergia o hipersensibilidad. Inversamente si estos elementos resultan "hipoactivos", puede haber una mayor sensibilidad del huésped a las infecciones repetidas, como en los trastornos por deficiencia inmunológica.

La segunda función (homeostasia) corresponde a la necesidad universal de todos los organismos pluricelulares, de conservar la uniformidad de un tipo celular dado. Esta función se ocupa del desdoblamiento o catabolismo normales del organismo destinado a eliminar elementos celulares dañados durante su vida normal, o a consecuencia de alguna lesión. Como errores de la homeostasia, pueden citarse las enfermedades autoinmunes en las cuales los mecanismos en cuestión intervienen de manera exagerada.

La tercera función del sistema inmune, de descubrimiento más recientes, es la "vigilancia". Tiene a su cargo la identificación de tipos celulares anormales que se producen constantemente en el organismo. Estos mutantes pueden ser espontá-

neosis o ser inducidos por ciertos virus o sustancias químicas. El sistema inmune se encarga de identificar y eliminar estas nuevas configuraciones, casi todas identificadas a nivel de superficies celulares. Recientemente se ha atribuido la insuficiencia de este mecanismo un papel causal en el desarrollo de los tumores malignos.

LA RESPUESTA INMUNE PRIMARIA

Cuando una sustancia extraña tal como un microorganismo o una sustancia química de determininadas características se introduce por primera vez en el organismo, es transportada al tejido linfoide más próximo. El material es entonces ingerido por los macrófagos (pinocitosis), donde, atacado por los lisosomas (digestión enzimática) es destruido. Antes o durante la digestión se transfiere algún mensaje - posiblemente una molécula simple, un fragmento de molécula o una sustancia extraña de los micrófagos a los linfocitos. Estos linfocitos comienzan a agrandarse y se transforman en células plasmáticas, tomando sus núcleos

y citoplasmas, apariencia indicativa de división celular.

Las células que comunmente se consideran como precursoras de anticuerpos son las del SRE, - los linfocitos y las células plasmáticas. Estas son los principales productores de anticuerpos y de gammaglobulinas, pero todavía no está completamente claro si la célula plasmática es una etapa funcional del SRE o si deriva del desarrollo del linfocito.

Los estudios ultraestructurales indican que la célula plasmática aparece, en contraste con las células del SRE o del linfocito, como una célula en estado de activa síntesis de proteínas, ya que tiene un contenido rico en RNA y abundantes estructuras ribosómicas. Por ello parece existir una heterogeneidad entre cada etapa de la evolución de los linfocitos por lo que los linfocitos pequeños, las formas intermedias y las células plasmáticas pueden representar, más que estados morfológicos diversos, estados funcionales secuenciales.

C A P I T U L O    I I

INMUNIZACIÓN: CONCEPTO Y TEORIAS

### Antigenicidad

Se denomina antígeno a toda sustancia capaz de originar una respuesta inmunitaria en los seres vivos, es decir, toda sustancia capaz de provocar un estado de hipersensibilidad cuya característica esencial es la de reaccionar específicamente con el antígeno. Esta interacción específica del antígeno y el anticuerpo homólogo, ha conducido a los inmunólogos a desarrollar el concepto de "grupos determinantes antigénicos", presentes en la molécula del antígeno, y el de una estructura complementaria, presente en las moléculas de anticuerpos denominadas "sitios de com

binación".

Las propiedades, las estructuras y la naturaleza de los determinantes antigénicos, y la de los sitios de combinación homólogos, han sido objeto de notables estudios por KABAT (1966) y GOODMAN, (1969).

Los parámetros estructurales de una molécula que le confiere aptitud a inducir una respuesta inmunitaria en un animal, están muy lejos de estar completamente resueltas, sobre todo el determinismo molecular de la antigenicidad.

Los cinco aspectos de la respuesta inmunitaria en los que el antígeno juega un papel especial son:

- 1º - El "reconocimiento" de un material dado como antígeno por un animal receptor.
- 2º - El tipo de respuesta inmunitaria inducida, es decir la aparición de un estado de hipersensibilidad retardada y o de anticuerpos. Se sabe que existen diferencias importantes en las condiciones de reacción de estos dos estados que dependen de la naturaleza y de la forma física del antígeno, de su modo de

administración, de la especie animal y de diversos otros factores.

3º - La especificidad de los anticuerpos formados.

4º - La cantidad de anticuerpos formados y su naturaleza, así como la intensidad de la reacción de hipersensibilidad restada.

5º - Papel del animal (particularmente el genoma; factores de especie y factores individuales) en la respuesta inmunitaria a un antígeno determinado.

la estructura molecular de los antígenos, debido a complejidad química de las moléculas antigénicas, ha hecho difíciles la resolución de estos problemas. Hasta hace una decena de años, sólo se conocían sustancias macromoleculares naturales, procedentes de organismos vivos. En 1945 - LANDSTEINER consigue describir los aptenos, que juegan un importante papel en el desarrollo de la inmunología.

En 1969 SELA propone la terminología "antígenos artificiales" para una nueva clase de antígenos "sintéticos" descubiertos en los laborato-

rios de DOTY, MAURES y SELA, los cuales consiguen preparar un considerable número de copolímeros variados de antígenos aminados, formados por dos o tres ácidos aminados diferentes en proporciones variables, modificados a voluntad.

Estos polímeros ha sido de utilidad preciosa para el estudio de los aspectos moleculares y genéticos de la antigenicidad y han permitido desarrollar un gran número de reglas generales concernientes a sus propiedades.

### Mecanismos de inducción inmunológica.

Las teorías actuales sobre el mecanismo de inducción de formación de anticuerpos en la respuesta inmune, sugieren lo siguiente:

En la inducción inmunológica, el antígeno se asocia al de los tejidos linfáticos, según dos posibilidades:

1 - Los macrófaos, predominantemente en la médula de nodulos linfáticos, ingieren el antígeno, que es rápidamente digerido por la acción de sus enzimas lisosomales.

2 - El antígeno es también atrapado en los folículos linfáticos corticales, pero por otro

mecanismo: Parece que se adscribe a la superficie de amplias prolongaciones ramificadas de las células reticulares, donde puede contactar con los linfocitos circundantes.

Puede ser que el primer proceso sea el más importante en la inducción de respuesta primaria, donde el mecanismo central germinal produce células para la reacción secundaria, que es, linfocito con memoria inmunológica.

Hay también evidencia, de que el antígeno a asociado al SRE puede ser el mecanismo de inmunidad celular y el mecanismo de antígeno-linfocito de asociada superficie puede dar lugar a tolerancia inmunológica.

La célula central en toda respuesta inmune es el linfocito pequeño circulante de larga vida. Los linfocitos pequeños, que no producen anticuerpos, pueden originar, después de una estimulación antigénica apropiada, una línea proliferante productora de anticuerpos. Así, el linfocito pequeño sensible al antígeno en el sistema linfoide periférico interacciona con las moléculas del antígeno transformándose en células destruidas (blast),

realizando una proliferación celular controlada y por una diferenciación pueden dar lugar a diversos tipos de linfocitos, en especial los linfocitos mo dificados y las células plasmáticas, las células de memoria de vida larga y las células efectoras.

Características generales de la respuesta inmune específica.

Se llama respuesta inmune específica a la reacción ulterior del huésped a una sustancia extraña; comprende una serie de interacciones celulares que se manifiestan por síntesis de productos celulares específicos. La respuesta inmunoespecífica se distingue de las inespecíficas por tres características:

- 1 - Su especificidad
- 2 - Su heterogeneidad y
- 3 - Su memoria

Por especificidad, se entiende una gran selec

tividad discriminatoria: los productos de la respuesta inmune reaccionan unicamente con una configuración idéntica o semejante a la que inició la respuesta.

En cambio, las respuestas inespecíficas corresponden al contacto con el cuerpo extraño; pero en los contactos ulteriores se repite el mismo tipo de respuesta general. Vemos pues que hay una carencia de especificidad. La especificidad fué demostrada por LANDSTEINER que pudo distinguir los anticuerpos de animales inmunizados con ácido tartarico de los anticuerpos producidos por animales inmunizados con otros isómeros del mismo ácido (cuadro 2-5).

La especificidad es la propiedad de la respuesta inmune que permite distinguir un antígeno de otro. En la práctica, esta identificación de antígenos permite reconocer una especie de otra (especificidad de especie), un individuo de otro (especificidad de individuo) y un órgano de otro (especificidad de órgano).

La segunda característica de la respuesta inmune específica es la heterogeneidad, lo que signi

fica la capacidad de reaccionar a una gran diversidad de tipos o sustancias celulares, observándose una diversidad de respuestas tan amplia como la propia variedad de tipos celulares.

A diferencia de las respuestas inespecíficas de la fagocitosis, en las cuales interviene un número limitado de tipos celulares preexistentes, - las respuestas específicas se caracterizan por aparición e interacción de varios tipos celulares nuevos específicos del antígeno inductor. La heterogeneidad de los tipos celulares significa también la de un grupo heterogéneo de productos celulares (anticuerpos). Esta heterogeneidad de los anticuerpos permite lograr una regulación homeostática muy fina, que permite al huésped responder en una forma muy variable y específica a las estructuras extrañas.

El tercer punto importante de la respuesta inmune específica es la memoria. En el fenómeno por el cual la respuesta aumenta por proliferación y diferenciación de células en ocasión de nuevos contactos con un inmunógeno. Así aumenta la síntesis de productos celulares. La respuesta inmune inespecífica no presenta la propiedad de la memoria.

### Concepto de inmunogenicidad

Poder antigénico de una sustancia es la aptitud para dar nacimiento a una reacción inmunitaria. El término antigenicidad expresa dos conceptos bien distintos:

- 1 - La capacidad para dar origen al anticuerpo.
- 2 - La capacidad de reaccionar con los anticuerpos.

Para evitar confusiones SELA en 1969 propone:

- 1 - La inmunogenicidad es la capacidad de una sustancia para inducir la formación de anticuerpos, independientemente de su espe-

cificidad.

- 2 - La especificidad antigénica es la capacidad de un antígeno a reaccionar específicamente con un anticuerpo homólogo; propiedad que se traduce por la presencia sobre los anticuerpos de "sitios de combinación" específica con el antígeno.

Hay que recalcar que no se ha propuesto un término que exprese el estado de la hipersensibilidad retardada. S. ALDUF propone "actividad retardigénica".

HUMPHREY y DE WECK llaman actividad "tolerogénica" a la capacidad de inducir un estado de tolerancia inmunológica.

Ante todo es esencial precisar bien la terminología que vamos a adoptar, para evitar confusiones.

Teorías sobre la formación de anticuerpos: Ideas generales.

Desde el descubrimiento de los anticuerpos, se han propuesto muchas teorías para explicar el mecanismo de su formación. Los conocimientos sobre la estructura de las inmunoglobulinas, sobre la síntesis protéica celular, y sobre la cinética y el desarrollo evolutivo de la formación de anticuerpos exigen la crítica y revisión frecuente de las teorías propuestas.

Cualquier teoría acerca de la formación de anticuerpos debe explicar o ser compatible con las siguientes observaciones:

- 1 - El anticuerpo es específico para el antígeno que suscita su formación.
- 2 - Un animal puede responder a gran número de antígenos administrados simultáneamente.
- 3 - Una célula, por lo regular forma anticuerpos estructuralmente homogéneos de especificidad única.
- 4 - La formación de anticuerpos consta de dos partes: una fase de inducción y una fase de producción.
- 5 - La "información específica" para la respuesta anamnésica se almacena en las células linfoides.
- 6 - La tolerancia a "antígenos propios" accesibles, persiste toda la vida.
- 7 - Pueden provocarse artificialmente estados de tolerancia a antígenos extraños.
- 8 - La capacidad de los animales para elaborar anticuerpos contra algunos antígenos está controlada genéticamente.
- 9 - La administración de algunos antígenos puede bloquear por competencia la respuesta de anticuerpo a otros antígenos.

- 10 - A una estimulación duradera con antígeno sigue una mayor avidéz de un tipo dado de anticuerpos específicos.
- 11 - Los sitios de reacción de los anticuerpos se rigen por la sucesión de aminoácidos en las porciones variables de las cadenas peptídicas pesadas y ligeras.
- 12 - No se ha descubierto antígeno en las células que producen anticuerpos.
- 13 - Pueden formarse autoanticuerpos contra antígenos inaccesibles.
- 14 - El número de células estimuladas en la etapa inicial por un antígeno es pequeño. Las teorías acerca de los mecanismos de formación de anticuerpos que se han propuesto para explicar los datos observados pueden clasificarse en tres grupos generales, a saber: Teorías de "INSTRUCCION" (instructiva, directriz, plantilla directa), teorías de "SELECCION" (Electiva, selectiva y de inducción electiva) y teorías de LINEA GERMINATIVA.

Las teorías de INSTRUCCION exigen que partici

pe el antígeno como plantilla para dirigir la for-  
mación de anticuerpo; las teorías de selección pos-  
tulan que el antígeno estimula selectivamente las  
células particulares en una población fortuitamente  
capaz de elaborar anticuerpos específicos para  
el antígeno. La teoría de la línea germinativa e-  
nuncia que el genoma de la célula productora de  
anticuerpos posee toda la información necesaria pa-  
ra codificar todas las especificidades de anticuerpo  
po. Ello significa que las células inducibles son  
totipotenciales y únicamente necesitan ser inducida  
das para "conectar" los cordones apropiados para -  
sintetizar anticuerpos específicos. Los datos dis-  
ponibles no permiten aceptar por completo ninguna  
de las hipótesis enumeradas.

Algunas presuposiciones, fundamentales para  
cualquier teoría, no tienen apoyo sólido. Por ej.:  
se ha afirmado que una célula puede formar anticuerpo  
pos con varias especificidades; sin embargo los da-  
tos experimentales, no descartan la posibilidad de  
que las pocas células de las cuales se ha informado  
do que poseen anticuerpos de dos especificidades,  
pueden haber atrapado anticuepo formado por otras  
células. La misma situación se aplica a las sub -

clases de anticuerpos, y a las hipótesis de que unas células que producen anticuerpos Igm pueden pasar a producir anticuerpos IgG. En tanto que estas afirmaciones, y otras más, no se investiguen más a fondo, lo más prudente es suponer que en un momento dado una célula elabora anticuerpos que consiste en cadenas ligeras idénticas y cadenas pesadas idénticas. En consecuencia, los anticuerpos resultantes serían homogéneos respecto a subclase, especificidad y avidéz.

a) Teorías de instrucción

Estas teorías se enunciaron con el propósito de explicar el hecho de que el número de antígenos a los cuales puede reaccionar un animal es enorme (posiblemente centenas de millares). Se consideró que cada célula productora de anticuerpo no podía incluir información genética suficiente que permitiera codificar la síntesis de anticuerpos de tantas especificidades. La alternativa patente era que el antígeno, de alguna manera entraba y "enseñaba" o "instruía" a la célula productora de anticuerpos.

Se propuso que los determinantes antigénicos,

actuaban como "plantilla" o molde para dirigir la formación de anticuerpos de configuración semejante. Es patente que las teorías de instrucción exigen que cualquier célula dada productora de anticuerpos tenga la capacidad potencial de formar anticuerpos específicos para cualquier antígeno al cual puede responder el animal.

PAULING sugirió que el antígeno "instruye" al dirigir el plegamiento de las cadenas peptídicas en la formación de la molécula de anticuerpo. Sin embargo, investigaciones ulteriores han comprobado que los anticuerpos de distinta especificidad varían en cuanto a la composición y en la sucesión de aminoácidos en las porciones variables de las cadenas peptídicas. También está comprobado que las moléculas de anticuerpos desplegadas por medios químicos o físicos, vuelven a plegarse sin que participe el antígeno y así reconstruyen los sitios específicos de reacción de anticuerpo. Estas observaciones, y otras semejantes dan una discreta certeza al hecho de que la sucesión de aminoácidos en las porciones variables de las cadenas peptídicas de inmunoglobulinas rige la configuración

específica de los sitios de reacción de los anticuerpos, sin que ello guarde relación con instrucción por parte del antígeno. En consecuencia en la actualidad no resultan defendibles las teorías de instrucción en la formación de anticuerpos.

b) Teoría de la selección clonal

Es interesante que la primera teoría propuesta para explicar la formación de anticuerpos, enunciada por Ehrlich en 1.900 estuviera basada en la selección. Ehrlich postuló que todas las células de la economía poseen configuraciones de su superficie, las llamadas "cadenas laterales", que les permiten reaccionar selectivamente con varias sustancias. En el caso de las células que forman anticuerpos, sugirió que son estimuladas por antígenos, para formar y desprender un exceso de cadenas laterales (anticuerpos).

La teoría de la cadena lateral permaneció invariable unos 30 años, hasta las investigaciones

de Landsteiner con haptenos.

Al observar que un animal podía responder con anticuerpos específicos a gran número de haptenos de síntesis conjugados a portadores, Landsteiner se vió obligado a dudar de la teoría de la selección. Según mencionamos, le resultó difícil concebir que una célula linfoide pudiera estar dotada con un número suficiente de moléculas de anticuerpo con distintos sitios de reacción de anticuerpo, para acomodar el gran número de determinantes antigénicos, probablemente, centenas de millares a los cuales un animal puede responder. En consecuencia se propusieron y aceptaron para la formación de anticuerpos las teorías de instrucción o enseñanza que acabamos de describir, y que perduraron, en general hasta 1955 cuando JERNE enunció la teoría de selección natural. La hipótesis de la selección natural postula que de manera natural se producen anticuerpos con gran variedad de sitios de reacción, sin estímulo antigénico previo, y que cada uno puede reaccionar con un determinante antigénico de configuración semejante, para estimular a las células productoras de anti -

cuerpos, que harían reproducciones, o réplicas del anticuerpo específico. En la actualidad, la teoría de la selección clonal modificada enunciada por Burner se considera, en general, la más útil, porque explica muchos de los hechos conocidos acerca de la formación de anticuerpos y permite utilizar enfoques experimentales para precisar su validez.

La teoría de la selección clonal modificada de BURNET sobre la producción de anticuerpos se funda en los siguientes principios:

- 1 - En el animal adulto hay abundantes clones distintos de células inducibles, cada una de las cuales es portadora de moléculas semejantes a anticuerpos (posiblemente en la superficie) que tienen la facultad de reaccionar específicamente con determinados de antígeno de una configuración determinada.
- 2 - El resultado de una reacción de esta índole es la inhibición o formación de anticuerpos.
- 3 - Cada célula inducible puede reaccionar con

una gama bastante amplia de determinantes antigénicos íntimamente relacionados, si bien, más debilmente con unos que con otros. Pero por debil que sea la reacción del antígeno al estimular por vez primera la célula, cuando esta célula prolifera y aparecen mutaciones somáticas el antígeno estimula de preferencia a aquellas células, nuevas mutantes, que producen anticuerpo y poseen sitios de reacción, con la configuración más adecuada para el antígeno. En consecuencia, con la estimulación antigénica ininterrumpida, la avidéz de los anticuerpos producidos aumentará hasta que grandes clonas de células, que producen anticuerpos de gran avidéz, predominen en la población de elementos que elaboran anticuerpos.

- 4 - La tolerancia se produce más facilmente, en la vida embrionaria que en la etapa ulterior, posiblemente porque las células inducibles en el embrión son inhibidas más facilmente por el antígeno, o porque

son menos abundantes que en animales de edad más avanzada.

El número de células inducibles con diferentes configuraciones semejantes al anticuerpo necesario para abarcar la gama de determinantes antigénicos "básicos" (determinante de grupo) a los cuales puede teóricamente el animal responder se ha calculado aproximadamente entre  $10^4$  y  $10^5$ . Dado que una célula inducible determinada puede responder, desde el punto de vista teórico, a cierto número de determinantes antigénicos íntimamente relacionados, este número de células inducibles, permitiría al animal reaccionar a gran número de antígenos específicos. Cuando a un animal se le administran simultáneamente dos antígenos o más, en la etapa inicial surgen poblaciones pequeñas de células diferentes, de modo que, cada una de ellas elabora anticuerpos específicos para uno de los antígenos. Es de interés que las poblaciones que responden específicamente incluyan células que forman anticuerpos de distintas subclases.

Uno de los caracteres más interesantes de la teoría de la selección clonal es que puede ex

plicar la formación de autoanticuerpos. Según es ta hipótesis en la vida adulta surgen clonas de "células mutantes" que de alguna manera escapan a la inhibición específica o a la destrucción por autoantígenos. Estas clonas hipotéticas se llaman clonas prohibidas". No se ha especificado si las mutaciones que aparecen para proporcionar la población heterogénea de células inducibles, se observa solamente entre las células inducibles y sus descendientes o entre las células madres pro genitoras de las inducibles. Pudiera ser que la célula madre lleve la información genética y que la capacidad de mutación sea, principalmente, propiedad de células inducibles. En caso, de que como parece lógico suponer, continúe toda la vida la mutación somática entre las células inducibles la gama de antígeno a los cuales puede responder un animal de manera mensurable se ampliaría con el tiempo, así como, el grado al cual el animal esté sujeto a estimulación por antígeno. Es patente que poco después del nacimiento aparecería una ampliación brusca del espectro de antígenos a los cuales puede responder el animal poco después del

nacimiento, cuando el individuo se expone por primera vez a gran número de antígenos. Pero para aceptar estas ideas se precisa una prueba adecuada de esta hipótesis.

Se acepta, en general, que en un momento dado una célula que produce anticuerpos elabora moléculas de anticuerpos homogéneas respecto a subclase, especificidad y avidéz. Ello se apoya en la observación de que las células malignas del mieloma monoclonal forman inmunoglobulinas estructuralmente homogéneas, lo cual es compatible con la teoría de la selección clonal.

c) Teoría de la línea germinativa

A diferencia de las teorías de selección, que postulan que las células germinativas, sólo necesitan transmitir a las células somáticas una cantidad limitada de información genética para la producción de anticuerpos, la teoría de la línea germinativa exige que todos los genes estructurales que regulan la formación de anticuerpos se transmitan de las células germinativas a las somáticas, incluidas las células linfoides y sus progenitores. Así, pues se supone que todas y cada una de las células inducibles, llevan toda la información genética que posee el animal para pro

ducir moléculas de anticuerpo. En consecuencia, una célula inducible debería ser capaz de responder a cualquier antígeno que llegue por primera vez a ella y cause inducción. Además, sería lógico suponer que cada célula inducible pudiera responder a dos o más antígenos o determinantes antigénicos que pudieran llegar a ella simultáneamente, lo cual ocurre excepcionalmente o nunca.

El cifrado o codificación para la producción de anticuerpos contra todos los antígenos a los cuales puede responder un animal exigiría probablemente del 15 al 20% del DNA de la célula, cantidad que es desde luego, excesiva. En consecuencia, cabe suponer que la hipótesis de la línea germinativa "directa" necesita modificarse para tomar en cuenta el gran número de determinantes antigénicos a los cuales puede responder un animal y para explicar la avidéz creciente del anticuerpo producida después de la antigenización. Entre las modificaciones de la teoría de línea germinativa propuestas en fecha reciente para explicar la diversidad entre sitios de reacción de

anticuerpos de una célula cifrados por herencia, se cuentan la teoría de medios gen de DREYER y BENNET y la teoría de variación semática de línea germinativa enunciada por LENNOX y COHN. Según esta última hipótesis, la línea germinativa lleva tres genes, parte de los cuales, puede variar somáticamente.

C A P I T U L O    I I I

ACCION BIOLOGICA DE LAS  
RADIACIONES IONIZANTES

En el capítulo anterior hemos estudiado el mecanismo de la inmunización y las teorías que lo explican. En este resumiremos las ideas fundamentales sobre naturaleza, absorción y efectos biológicos de las radiaciones ionizantes para, en el próximo, dar cuenta de los conocimientos hasta ahora existentes de cómo la radiación interfiere -excitando o deprimiendo- los fenómenos inmunitarios.

#### Naturaleza de la radiación

Las radiaciones son oscilaciones electromagnéticas cuya energía viene dada por la fórmula

la  $E=h.v$ . donde  $h$  es la constante de Plank y  $v$  la frecuencia de la radiación. Como a su vez la frecuencia viene dada por la relación  $v=\frac{c}{\lambda}$  donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío y  $\lambda$  la longitud de onda correspondiente, la fórmula de la energía de la radiación puede adoptar también la forma

$$E = h.v = h.\frac{c}{\lambda}$$

De esta forma, y según la longitud de onda decreciente de las radiaciones electromagnéticas (o según su frecuencia creciente) distinguiremos sucesivamente las ondas de radio, el radar, las radiaciones infrarrojas, las luminosas, las ultra violeta, las radiaciones X y las radiaciones gamma.

#### Absorción de la radiación

Según expresa eficazmente la Ley de Grotthus-Draper, "sólo es eficaz la radiación absorbida". Cuando la radiación electromagnética interacciona con un absorbente, parte de ella se transforma en otro tipo de energía (calor, excitaciones, fluorescencia, ionizaciones, reacciones químicas) y

parte continúa sin absorberse. De la fracción de energía de la radiación que se transforma en otra energía distinta decimos que se ha absorbido.

Según la energía de la radiación incidente, su absorción podrá determinar uno u otros fenómenos. Hasta la radiación infrarroja, la energía vehiculada por la radiación sólo es capaz de aumentar la movilidad de las moléculas del absorbente lo que en esencia significa que se aumenta su temperatura. La radiación ultravioleta tiene ya tal energía que puede hacer algo más: actuar sobre los electrones de las capas externas de los átomos modificando sus enlaces, y por tanto, aumentando su reaccionabilidad química. Efecto conocido por la radiación ultravioleta es la producción de oxígeno atómico al actuar sobre el oxígeno molecular, y la rápida reunión de estos átomos de oxígeno así liberados bien en moléculas biatómicas ( $O_2$ ), o bien en moléculas triatómicas ( $O_3$ ), con formación de ozono.

Pero a partir de cierta frecuencia la radiación tiene ya tal energía que su absorción vá a

dar origen a un fenómeno que hasta entonces no tenía capacidad de producir: la aparición de ionizaciones en el absorbente.

### Producción de ionizaciones

En efecto, en radiaciones de energía superior a 34 eV (energía que se considera necesaria para producir un par de iones), su absorción conducirá, por diversos mecanismos, a la expulsión de un electrón del átomo incidente. De esta forma, este átomo que previamente era neutro, es decir, con un número de electrones corticales igual al número de protones que contiene al núcleo, queda ahora con una carga negativa de menos, o, lo que es igual, con una carga positiva de más, esto es, transformado en un ión positivo. Por su parte, el electrón expulsado de este átomo, después de un recorrido más o menos largo en el medio según la energía que se le haya comunicado, quedará atrapado por otro átomo al que le adicionará, por tanto, una carga negativa, transformándolo de átomo neutro en ión positivo. Como siempre se forma un ión positivo y un ión negativo, se dice

que la absorción de la radiación X o gamma provoca la aparición de pares de iones.

### Lesión bioquímica

Si estudiamos el efecto de los pares de iones provocados por la irradiación, a los que hay que añadir otros efectos provocados por la absorción de la energía radiante, como son aparición de excitaciones moleculares, veremos que en conjunto se pueden resumir como la aparición brusca, dentro de ciertos átomos componentes de moléculas, de una gran capacidad de reaccionabilidad química. Tal capacidad es singularmente notable cuando la radiación incide en el agua (y el hombre está compuesto por agua en sus tres cuartas partes) en la que aparecen los llamados "radicales libres" que extienden, en el tiempo y en el espacio, la capacidad reaccional más allá del punto que ha soportado el impacto directo (o sea, la aparición de los pares de iones) de la radiación.

La reaccionabilidad incontrolada de estos átomos ionizados o excitados o de los radicales,

libres producidos en el agua conduce siempre a una perturbación de las moléculas iniciales, en muy diversos sentidos. Como consecuencia general se puede indicar que dichas moléculas no cumplirán su papel metabólico original, por lo que se puede hablar con propiedad de la existencia de una "lesión bioquímica".

### Lesión celular

Si del nivel bioquímico pasamos al nivel celular veremos que para que la afectación de la célula por la radiación dependerá de qué moléculas o estructuras ha lesionado la radiación. Dado que la célula es de un enorme tamaño en relación a la zona afectada por un impacto de radiación, la "lesión bioquímica" mencionada puede tener muy diversas repercusiones en la vida de la célula. Podemos decir, naturalmente muy a grandes rasgos, que en orden a la vida de la célula las moléculas o blancos biológicos que van a tener mas importancia frente a la radiación van a ser sucesivamente el DNA, el RNA y las proteínas.

. La afectación del DNA tiene importancia cuando la radiación fragmenta la doble hélice, pues

Se ha comprobado que la ruptura de uno solo de los filamentos permite la reparación de la lesión con base al molde que representa el filamento que aún queda intacto de la doble hélice. La ruptura de los dos filamentos, sin embargo, se sigue habitualmente de la separación de los fragmentos, con lo que la reparación es ya imposible. Tanto la lesión del DNA especialmente, como en menor medida la del RNA, impiden la transmisión del mensaje genético y la síntesis de las proteínas, terminando por originar una muerte reproductiva o una muerte biológica de la célula. A efectos prácticos importa mucho considerar la muerte reproductiva celular, esto es, su incapacidad de división ulterior, que se consigue a menos dosis que la muerte biológica, pero que supone la alteración de las funciones tisulares que esta célula debe cumplir, en especial en tejidos en los que actúa como célula clonogénica.

### Lesión tisular

El resultado final de la acción de la radiación sobre la célula es su muerte reproductiva o biológica. Si consideramos ahora un tejido en su conjunto, como los efectos de la radiación se distribuyen al azar, lo mismo ocurrirá con la distribución de las células muertas por irradiación, por lo que podremos decir que morirán más o menos células del tejido según se aplique una dosis mayor o menor de radiación. Los fenómenos subsiguientes dependerán de la naturaleza del tejido. Existen, por una parte, tejidos constituidos solamente por células diferenciadas, incapaces de multiplicación como el tejido nervioso. En él, la célula muerta por la radiación será una célula irrecuperable e insustituible, y el efecto de la radiación sobre el tejido será grande por no existir mecanismos de reparación celular. En otros tejidos, en cambio, existe una fracción de células que están en constante multiplicación, y a las que denominamos células madres o clonogénicas. Estas células están constantemente produciendo células hijas utilizables por el organismo, pero sin capacidad repro-

ductiva. A la fracción de células que están en constante multiplicación dentro de un tejido la denominamos "fracción de crecimiento". Pues bien, la actuación de la radiación sobre uno de estos tejidos matará en principio, cierta cantidad de células, entre ellas algunas de la fracción de crecimiento, produciendo una depopulación general del mismo. Pero al poseer este tejido una capacidad reproductora constante, tras la irradiación se pondrán en marcha los mecanismos de recuperación consistentes en el aumento de la proporción de células que van a actuar como "células clonogénicas" o "células madres", o sea, en el aumento de la fracción de crecimiento, durante el tiempo necesario para compensar la pérdida celular experimentada por la irradiación, hasta que, por mecanismos de feed-back, conseguida la suplencia de las células perdidas vuelva la fracción de crecimiento a su estado previo a la irradiación.

#### Radiosensibilidad celular y tisular

En esta breve exposición de la acción de la radiación sobre la célula y sobre los tejidos los

hemos considerado como homogéneos. Sin embargo la realidad demuestra que por muy diversas causas unas células se afectan más que otras ante la acción de la radiación, por lo que decimos que estas células son más radiosensibles que las otras. La radiosensibilidad celular sería, según ello, la susceptibilidad de la célula a lesionarse por la acción de las radiaciones.

Si el blanco biológico primario de mayor importancia vital para la célula, es el DNA, muchos estados de mayor o menor radiosensibilidad pueden relacionarse con la mayor o menor afectación del DNA por las radiaciones, dependiendo de su situación en relación con el ciclo mitótico (en reposo en fase de síntesis, en fase premitótica) o a la forma de exposición del DNA (normal o en grupos, como ocurre en el periodo premitótico), a la posibilidad de reparar enzimáticamente el daño causado, o a factores aún no bien conocidos. Las leyes de la sensibilidad celular, que establecieron Bergonie y Tribandeu postulaban que una célula es tanto más radiosensible,

- a) cuanto mayor sea su capacidad reproductora

- b) cuanto más largo sea su porvenir carioquinético
- c) cuando menos definida estén su morfología y sus funciones.

Si pasamos de la célula al tejido, su radiosensibilidad dependerá por supuesto de la radiosensibilidad de las células que lo componen, pero además, para valorar el daño final producido por la radiación, introduciremos un nuevo factor: la capacidad de reparación o no del daño celular causado. De este modo, si bien el tejido nervioso es muy poco radiosensible - al ser sus células muy diferenciadas-, en cambio su afectación es de peores consecuencias que la de la piel o la de la médula ósea, puesto que en el tejido nervioso adulto no hay capacidad de regeneración de las células muertas que en la piel o en la médula ósea, más radiosensibles, hay una gran capacidad de reposición de las células lesionadas por la radiación.

#### Radiosensibilidad de los órganos

La radiosensibilidad de un órgano determinado va a venir marcada por la radiosensibilidad de los

tejidos que lo integran y por su valor funcional respectivo. Así, por ejemplo, las células parenquimatosas que están funcionalmente diferenciadas suelen tener escasa radiosensibilidad. En cambio, reviste gran importancia el comportamiento del endotelio vascular, puesto que las células que lo integran, ante dosis de radiación menores que las precisas para afectar las células parenquimatosas, se edematizan obstruyendo el vaso y motivando, la repetición de estas obstrucciones, la aparición de zonas de isquemia que por este mecanismo sí que dañan las células parenquimatosas. De aquí la disparidad que se puede encontrar ante el hecho de que órganos de células resistentes, como el sistema nervioso, se afecten por la radiación, no por mecanismo directo (acción de la radiación sobre las neuronas), sino por mecanismo indirecto, especialmente de tipo vascular.

#### Radiosensibilidad general del organismo

Al considerar los efectos de la irradiación del organismo se deben separar los producidos por una irradiación parcial y los originados por su irradiación total. En el primer caso la lesión

De uno o varios organos por radiación producirá trastornos generales que dependerán del papel funcional de dichos organos en la economía. Por lo general se trata de la irradiación de zonas corporales con fin terapéutico y en las que no se puede excluir la irradiación de organos sanos o bien irradiaciones accidentales que abarcan una cierta zona orgánica, pero no su totalidad.

Desde el punto de vista de nuestro estudio nos interesa más considerar la acción de la radiación sobre el organismo en su conjunto. Lo cual implica, ante todo, el hecho de que la irradiación total tiene unos efectos nocivos mucho mayores que las irradiaciones localizadas, con gran diferencia de dosis. Así, en el hombre la dosis total media  $DL_{50/30}$  (es decir, que la produce la muerte a mitad de la población expuesta a los treinta días de la irradiación total) es de 500 rads, en irradiación total, dosis que, en irradiación parcial, se puede administrar a cualquier zona corporal sin que se presenten efectos orgánicos importantes. Este hecho se explica porque en la irradiación parcial siempre hay zonas no le

sionadas que sirven de base para la repoblación celular de las zonas afectadas, mientras que en la irradiación total no dejamos ninguna posibilidad de repoblación por no existir zonas indemnes a la acción de la radiación.

### Afectación del organismo por irradiación total

Al igual que la radiosensibilidad de los organismos depende de la de sus tejidos constitutivos, la radiosensibilidad del organismo en conjunto depende de la de sus diversos órganos y de la importancia funcional de los mismos. Si consideramos el efecto de la irradiación en cuanto a la vida del sujeto, veremos que la importancia funcional de los órganos radiosensibles es muy diversa. Por un lado el tejido hematopoyético es muy sensible y de gran importancia funcional. Por otro, el testículo es muy radiosensible, pero su afectación no supone peligro grave para la vida del sujeto. Por eso, no basta considerar solamente los órganos más radiosensibles, sino su importancia biológica en cuanto al mantenimiento de

la vida.

Ciñendonos a estos supuestos, la afectación orgánica del síndrome general de irradiación lesiona, a dosis crecientes de radiación, los siguientes aparatos o sistemas: hematopoyético, digestivo y nervioso. Las dosis menores capaces de producir la muerte lo hacen por la afectación del sistema hematopoyético con su correlato de leucopenia (en especial linfopenia), trombopenia y anemia, disminuyendo por tanto los mecanismos de defensa a las infecciones, y sobreviviendo la muerte por esta causa. A dosis mayores se afecta especialmente el aparato digestivo, en especial el intestino, originando un cuadro de diarreas incoarcibles, náuseas y vómitos, que evolucionan a la aparición de úlceras necróticas en intestino, lo cual, unido a la afectación hemática antes indicada, acaba produciendo una sepsis sanguínea mortal. Finalmente, dosis elevadas de radiación pueden producir una muerte súbita por afectación del sistema nervioso central.

Si la irradiación se realiza a dosis submorales, los efectos orgánicos van a verse, sobre

todo a nivel del sistema hematopoyético y del aparato digestivo, y sus efectos van a trascender a todas las funciones ligadas a ellos. En el capítulo anterior hemos visto la estrecha relación de los mecanismos inmunitarios con los linfocitos, con los ganglios y con las proteínas específicas del fenómeno inmune. En la irradiación total del organismo, la inmunidad como función generalizada, queda también afectada en mayor o menor grado, y estas variaciones, de enorme importancia para el mantenimiento de los mecanismos que aseguran la identidad bioquímica del propio yo, son los que estudiaremos en el próximo capítulo.

C A P I T U L O    I V

ACCION DE LA RADIACION SOBRE  
LA RESPUESTA INMUNITARIA

En los capítulos anteriores hemos intentado exponer, en primer lugar, lo esencial del mecanismo inmunitario que conviene conocer para nuestro trabajo. Luego la naturaleza y mecanismo de acción general de las radiaciones ionizantes. En este capítulo queremos plantear lo hasta ahora conocido de cómo la irradiación interfiere el mecanismo inmunitario general.

Para ello trataremos, primero, de la influencia de las grandes dosis de radiación, y luego, de la influencia de dosis mínimas, tanto en lo referente a la respuesta primaria como en la secundaria.

### Efecto de las grandes dosis de radiación

El efecto general de las grandes dosis de radiación es la depresión del sistema inmunitario y de su respuesta a una agresión. Sin embargo esta depresión varía tanto según los momentos y circunstancias en que se realice la inmunización, que debemos distinguir el efecto obtenido sobre la inmunidad innata y el efecto inhibidor de la formación de anticuerpos.

#### a) Acción sobre la Inmunidad natural

De muy diversas formas influye la irradiación disminuyendo las defensas naturales del organismo. En unos casos, por su acción directa sobre la piel, la mucosa intestinal y el pulmón, dificulta el papel de estos órganos como barrera defensiva ante la entrada de gérmenes en el organismo. En otras ocasiones, la radiación actúa sobre el sistema retículo-endotelial disminuyendo su actuación, pero al parecer más que ejercer una acción directa a su nivel lo que ocurre es que por efecto indirecto, al disminuir los mecanismos de protección de piel, pulmón y digestivo, existe .

como una saturación de fagocitosis bacteriana por parte de los macrófagos, que condiciona la disminución general del mecanismo de defensa que representan.

También se ha supuesto la acción de la radiación sobre otros mecanismos de la inmunidad natural, como serian la destrucción de la actividad bactericida sérica (comprobada en el suero de conejo especialmente) o la afectación de la producción de properdina, con su destacada influencia en la defensa natural frente a la infección.

b) Acción sobre la inmunidad adquirida. Respuesta primaria.

En cuanto a la inmunidad adquirida, veamos cómo las grandes dosis de radiación pueden influir en la respuesta primaria y en la secundaria.

En cuanto a la respuesta primaria, la irradiación en general rebaja la formación de anticuerpos. Los factores que intervienen en este fenómeno son las dosis de radiación aplicada, la naturaleza del estímulo antigénico y el momento de la irradiación en relación a la inmunización. Por lo general los

experimentadores utilizan un tipo de antígeno bien definido, y varían las dosis de irradiación y el momento de la misma.

Las experiencias de Taliaferro y cols. son muy demostrativas. Estos autores estudiaron el efecto de diversas dosis de radiación sobre la respuesta inmune primaria en conejos. Para ello se les irradió con dosis de 25 a 750 R en irradiación de cuerpo entero, y dos días más tarde se les antígenizó con hematíes de oveja, examinando posteriormente la hemólisis producida. Se vio que con dosis de 100 R o menos no existía ninguna supresión en la formación de anticuerpos. Hacia 250 R, la cantidad de hemólisis disminuía en un 50% aproximadamente, para 400 R esta disminución llegaba hasta el 95%, y para 500 R, se alcanzaba casi el 100%. La duración del periodo de inducción se prolongaba con el aumento de la dosis. Normalmente este periodo era de unos tres días, pero con dosis de 500 R se llegaba a alcanzar los 14 días.

Tal como se había visto en experiencias anteriores, tiene una gran importancia el momento de la irradiación en relación al de la antígeniza-

ción. Así, en la experiencia que mencionamos cuando la irradiación de 500 R a cuerpo entero se realizaba de uno a cuatro días después de la inyección del antígeno, las cantidades de hemolisina obtenidas no fueron muy diferentes de los valores normales. Cuando la irradiación se realizó dos horas después de la irradiación, los títulos de hemolisina hallados fueron significativamente mayores que en los controles. Sin embargo, la producción de anticuerpos quedó notablemente disminuida cuando la irradiación se realizó de 12 a 24 horas antes de la antigenización.

Estas experiencias se podían interpretar en el sentido de que el mantenimiento de la respuesta de anticuerpos indicaba que el estadio inicial de la inducción de la formación de anticuerpos no se afectaba por acción de la radiación. En cambio en aquellos casos en que aparecía una notable reducción en la respuesta antigénica se podía deducir que la radiación había inhibido algún estadio inicial en la respuesta antigénica que por eso mismo debía ser radiosensible. Por ello resultaba de interés ver cómo se conseguía la recuperación de.

la curva de antigenización. El periodo de inducción crecía a medida que eran más cercanos el momento de la irradiación y el de la inmunización, de modo que de unos periodos de cuatro días se podía llegar a alcanzar un periodo de inducción de diez y nueve días cuando la irradiación se efectuaba dos días antes de la antigenización.

Las experiencias de Stoner y Hale, realizadas con ratones a los que antigenizaban con toxoide tetánico, demostraron que, con irradiación total a 200 R, la depresión máxima de la respuesta primaria se conseguía cuando se irradiaba uno o dos días antes de la inmunización, y, para la respuesta secundaria, cuando se irradiaba 12 horas antes de la nueva antigenización. La depresión producida por la radiación era de mucha más intensidad y duración para la respuesta primaria que para la secundaria. Comparando ambas respuestas, cuando se irradiaba una hora antes de la antigenización se precisaba para obtener la misma depresión de la respuesta antigénica, una dosis de 50 rads en la respuesta primaria, y una dosis de 400 rads para la secundaria. En general la afectación de la respuesta primaria

se comprobaba como unas tres veces más radiosensible que la respuesta secundaria.

Los mismos resultados se obtuvieron de las experiencias de Genozian y Makinodan, que estudiaron los efectos de la irradiación sobre la resupuesta primaria y secundaria a la antigenización del ratón con hemaglutinina. La máxima depresión en la respuesta inmune, en términos de disminución de la titulación conseguida y de prolongación del periodo de latencia se obtenía cuando se irradiaba (con 710 rads) una a dos horas antes de la inumunización.

El mecanismo de actuación de la radiación soubre la inmunidad tiene lugar sobre todo por el efecuto de la radiación a nivel de médula ósea y células linfoides. Son importantes a este respecto las experiencias de irradiación con protección de orgunos linfoides, o las de recuperación del efecto de la irradiación mediante sustancias químicas. La protección de zonas corporales de la irradiación tiene efecto protector de la inmunidad incluso aunuque la zona linfoide protegida no tenga un gran paupel en la producción de antígenos. Así, la protecución del apéndice - zona linfoide que normalmente

no se encuentra comprometida en la respuesta inmunitaria - mejora la respuesta inmunitaria de los animales así protegidos en relación a los irradiados con las mismas dosis de radiación y que no tienen esta protección. Lo mismo ocurre con la preservación del bazo y de otros órganos linfoides. Algunos autores, para explicar este hecho, suponen que la protección obtenida no proviene tanto de la protección de los órganos linfoides, sino de la protección de células móviles capaces de repoblar la pérdida celular.

Por otra parte, si al inyectar el antígeno en el momento de máxima depresión de la respuesta inmunitaria - que es, en el conejo, las 12-14 horas de la irradiación total - se inyectan conjuntamente productos de degradación de los ácidos nucleicos, o bien agentes citotóxicos, tales como endotoxina o colchicina, que actuarán de un modo semejante al liberar estos productos de las células lesionadas, la respuesta inmunitaria no decae tan fuertemente como en la inyección simple del antígeno después de la irradiación. Como estas sustancias protectoras del mecanismo inmunitaria son estimulantes de la síntesis de DNA, mientras que las depresio

rás de la reacción antigénica son inhibidoras de la síntesis del DNA, tal hecho sugiere de la inducción de la síntesis de anticuerpos guarda una estrecha relación con la síntesis del DNA.

c) Acción de la radiación sobre la inmunidad adquirida. Respuesta secundaria.

Aunque el número de trabajos realizados sobre la acción de la irradiación sobre la respuesta inmune secundaria es menor que el de los realizados sobre la respuesta primaria - ya hemos comentado algunos de ellos en el aparato precedente - se puede señalar que, en general, la respuesta secundaria se comporta frente a la radiación como menos sensible que la primaria. Sin embargo algunos resultados parecen sugerir que cuando se irradia después de la antigenización secundaria, los parámetros no varían o incluso se estimulan, mientras que cuando se irradia antes de la inmunización todos los parámetros de la respuesta antigénica se deprimen

Efectos de la radiación sobre las células  
del sistema inmunitario.

El mecanismo de acción de la irradiación sobre el sistema inmunitario puede explicarse aplicando los conceptos del capítulo anterior sobre la acción de la radiación sobre las células y tejidos. La radiación destruye en principio las células más activas, tanto en la respuesta primaria como en la secundaria, e impide o retrasa su regeneración. Como consecuencia, si se irradia antes de la antigenización, se impedirá o retrasará la inducción de la respuesta antigénica puesto que habrán muerto bastantes células, y las restantes quedarán en paro proliferático durante algún tiempo. Sin embargo, si la irradiación se realiza una vez comenzado el proceso proliferativo y de diferenciación, el mecanismo de producción de anticuerpos es radioresistente, puesto que tanto las células del Sistema Retículo endotelial como las células plasmáticas lo son. Con este dato, como también sabemos que el linfocito es una célula extraordinariamente radiosensible, que muere a las pocas horas de exposición a las radiaciones, podemos intentar explicar la acción de la radiación sobre el proceso

inmunitario desde una base celular admitiendo que la supresión de la respuesta inmunitaria cuando se irradia uno o dos días antes de la antigenización, y su normalidad cuando se irradia, en cambio, en el momento de la antigenización, se podría explicar mediante las dos fases del mecanismo de la antigenización. En la primera, deben existir en el organismo linfocitos funcionales mientras que en el segundo, desarrollado sobre todo por las células plasmáticas, no importa que exista una destrucción linfocitaria. Parece que basta poco tiempo de exposición del linfocito inmaduro al antígeno para realizar su conversión en célula plasmática, lo que explicaría también el breve periodo que supone la depresión o la insensibilidad del proceso inmunitario por acción de la radiación.

Se ha comprobado que con dosis bajas de irradiación, de 10 a 25 rads a todo el cuerpo, aumenta la respuesta antigénica. Al iniciarse la radioterapia era clásico indicar que "pequeñas dosis de radiación existan, grandes dosis deprimen" intentando explicar de este modo numerosos fenómenos biológicos observados por entonces. Hoy en día ya no se puede admitir esta afirmación de modo exclusi

Vo, pues, mejor conocidos los efectos de la radiación, se puede indicar que, a escala celular, esta siempre tiene un efecto lesivo. Será la respuesta del tejido u órgano a la muerte de un número mayor o menor de sus células - según la dosis de radiación administrada - la que condicionará, finalmente, la aparición de un efecto orgánico estimulante o supresor.

Aplicado este principio a las células linfoides podemos suponer que la irradiación a dosis bajas producirá un porcentaje no muy elevado de muertes celulares, muertes que el tejido linfoide podrá, desde luego, superar, para lo cual pone en marcha sus mecanismos de multiplicación celular. Si en este momento se realiza la inmunización, y ya normalmente van a ser las células estimuladas por el antígeno las que van a tener el impulso hacia la división, serán estas células a su vez las que recibirán mayores estímulos por parte del tejido para su repoblación. De esta forma se puede comprender el efecto estimulante en la producción de antígenos de dosis bajas de irradiación, a pesar de que el efecto primario sea siempre de tipo lesivo para una mayor o menor cantidad de células.

## CAPITULO V

## MATERIAL y METODOS

Propósitos de la experimentación.

El propósito general de nuestra experimentación ha sido el estudio de las variaciones del estado inmunitario producidas por la irradiación. Hemos pretendido, en concreto, observar las variaciones que producen dosis bajas y dosis elevadas de radiación, administradas a diferentes intervalos de tiempo, antes y después de la inmunización, sobre la respuesta antigénica medidas en términos cuantitativos.

### Condiciones de la experimentación

Toda experimentación inmunitaria se debe caracterizar por tres condicionamientos: la existencia de un sistema reticuloendotelial competente en un animal apropiado y al que se administre un antígeno adecuado para las comprobaciones posteriores del estado inmunitario.

En primer lugar se precisa un sistema reticuloendotelial competente, que, para nosotros, debe ser virgen frente al antígeno a probar. Esta condición se basa en que nosotros deseamos medir como patrón es la respuesta primaria, no la secundaria, porque, como sabemos, cuando el animal ya está antigenizado, aunque sea en cantidad mínima la respuesta ya está potenciada.

Las condiciones referentes al animal de experimentación las hemos resuelto escogiendo para nuestro trabajo el conejo gigante de raza española y de tres meses y medio a seis meses de edad, de modo, que no está en época de vejez ni de prematuridad, para evitar que su sistema reticuloendote-lial se encuentre, sino en plena madurez de res-puestas, lo que se debe confirmar mediante las prue

bas basales antes de la antigenización específica.

Necesitamos, finalmente, un antígeno adecuado. En nuestro caso ha consistido en un panel protéico total de extracto de cristalino de gallina doméstica raza Ross I, extraído según las condiciones que luego indicaremos. Este antígeno cumple, en cuanto a peso molecular, secuencia de aminoácidos, etc., todas las condiciones requeridas para su estudio en las experiencias de antigenización bajo irradiación. Estas condiciones serán, fundamentalmente, a) la inducción de un fenómeno inmunitario de respuesta mediante la producción de anticuerpos específicos, o sea, en nuestro caso, la aparición de inmunoglobulinas específicas frente al panel de extracto total de cristalino, b) el antígeno no sólo debe inducir la respuesta específica, sino que además debe ser capaz de reaccionar de modo específico frente a los anticuerpos que produce.

Estas dos condiciones básicas, inducción de respuesta y reacción específica con los anticuerpos formados, son las que hemos procurado cumplir en nuestra experimentación y las que nos han servido de base para la cuantificación del fenómeno .

inmunitario por influencia de la radiación.

### Animales de experimentación

Hemos utilizado conejos de raza típica standard, blanca, leonada española gigante, de las siguientes características.

#### a) Crianza y cuidados

Estos animales se han estabulado y criado en el animalario de la Facultad de Medicina de Sevilla. Durante todo el tiempo que ha durado la experimentación se han mantenido en idénticas condiciones ambientales de temperatura, humedad e iluminación. Se les alimentó con pienso granulado Catyd nº 12 especial para conejos. La temperatura se mantuvo constante mediante cinco lámparas de rayos infrarrojos. No se les administró ningún fármaco a excepción de penicilina (penivel) para prevenir la aparición de infecciones intercurrentes que pudiera enmascarar los resultados y alterar las conclusiones.

Durante la experimentación dos de los animales manifestaron síntomas de asfixia por compresión en las jaulas donde se introdujeron para la

preparación a la irradiación. Fueron sustituidos por otros de las mismas condiciones y camada.

b) Edad

Ha sido heterogénea oscilando entre los tres meses y medio y los ciento cincuenta días a partir del destete, periodo en el que se considere que el sistema reticuloendotelial del conejo tiene las condiciones de madurez precisas para realizar las experiencias.

c) Sexo

Los animales fueron preferentemente machos, si bien en algunos lotes también se utilizaron hembras, manteniendo siempre las mismas características biológicas de edad, raza y peso. No hay evidencia de que el sexo modifique notablemente la respuesta antigénica del individuo.

Antígeno empleado

El antígeno empleado y la forma de proceder a la antigenización han respondido a las siguientes características:

a) Panel antigénico

Como panel antigénico hemos utilizado proteina alfa cristalina de extracción de cristalino total de la gallina común (especie gallus gallus) de

raza Ross I, y de edad de entre tres meses y cincuenta y un días, que es la que los veterinarios estiman óptima para realizar el sacrificio con mayor peso y menos costo. Se adquirieron en un matadero comercial las cabezas de los animales sacrificados para la venta, de los que se extrajo el cristalino a partir del cual se obtuvo el panel antigénico.

El extracto se realizó mediante macerado mecánico seguido de una fricción celular en macerador de vidrio esmerilado lorite-glass CO Vineland XI J. Se calculó un cincuenta por ciento de P.B.S. (solución salina tamponada con fósforo del extracto fué de 70 a 120 mg/ml.

Al extracto se le añade un centímetro cúbico de coadyuvante de Freud (completo) cuya mezcla original consiste en aceite mineral, ceras y bacilos tuberculosos muertos. Añadimos, además, doscientas mil unidades de penicilina (penival) para evitar infecciones.

El volumen total de cada antigenización fué de 2,5 c.c. por animal. El extracto total se ajustó a una proporción de 100 mg. de proteína por ml.

b) Forma de administración

La administración del antígeno se realizó por inyección subcutánea, según la siguiente técnica: Se coloca al animal en cúbito supino y, cogiéndoles ambas orejas, se estira de ellas hacia atrás para colocar la cabeza en hiperextensión. La inyección se realiza de la forma que a continuación describimos:

Las extracciones de sangre se realizaron colocando al conejo en cúbito prono y extrayendo sangre de una de las venas dorsales de la oreja, con un equipo pediátrico Braun 70 y adaptador Record, aguja de bisel corta 20 x 7, esteril y apirógena, con aguja siliconizada 22G de Palex. Se toman en cada extracción 3 c.c. que se dividen en dos tubos añadiendo la cantidad de heparina necesaria para evitar la coagulación. Uno de los tubos nos servirá para investigar el suero (proteínas totales, globulinas, etc.) y el otro para practicar la fórmula y el recuento.

c) Antigenización

La antigenización se realizó mediante cuatro inyecciones subcutáneas de unos dos centímetros,

cúbicos del panel antigénico utilizado mezclado con penicilina en los pliegues de la piel de las axilas y en los pliegues inguinales. Se tuvo especial cuidado en la asepsia de las agujas hipodérmicas, pero no se pinceló la piel con ninguna sustancia antiséptica o desinfectante.

### Técnica de irradiación

Para irradiar a los animales se les colocó en decúbito supino, sujetos a una tabla e inmovilizados mediante atadura de las extremidades a cuatro cáncamos. La irradiación fué en una sola dosis, y abarcando la totalidad del organismo del animal. La distancia empleada fué de 120 cm. fuente-piel, que permitía obtener un campo de 30 x 45 cm. suficiente para cubrir el objetivo propuesto. El aparato utilizado fué el Theratron II, de la Energía Atómica del Canadá, existente en la Facultad de Medicina de Sevilla.

Las dosis de radiación administradas han sido de 10, 20 y 300 rads, con arreglo a la sistemática general de irradiación que ahora indicamos.

### Sistemática de la experimentación

Se agruparon los animales en ocho grupos de seis conejos cada uno, designados como T (testigo) A, B, C, D, E, F, G. Como se trataba de comprobar la influencia de la irradiación sobre la respuesta inmunitaria, se estudió previamente en todos los grupos las globulinas basales, las proteínas y la fórmula leucocitaria y recuento de hematíes y leucocitos. Los conejos se agruparon de dos en dos para cada grupo. Se irradiaron a dosis de 300, 20 y 10 rads para los grupos A al D, de manera que los del A se irradiaran de esta forma cinco días antes de la inmunización, los del B, cuatro días antes, los del C tres días antes, los del D dos días antes. De esta forma se deseaba analizar las diferencias de comportamiento frente a dosis altas (300 rads) y bajas (20 y 10 rads) aplicadas antes de la inmunización.

Los restantes grupos se irradiaron con las mismas dosis (10, 20 y 300 rads) para estudiar el efecto de la irradiación inmediatamente antes y después de la antigenización. Así, el grupo E se irradió de esta forma un día antes de la antigenización, el F un día después y el G dos días des

pués de la misma.

Para facilitar el estudio de los resultados, exponemos el esquema general de la experimentación en un cuadro adjunto.

Control de los resultados: Estudios hemáticos.

El material estudiado estaba constituido por sangre de conejo que contenía como anticoagulante EDTA-dik (sal dipotásica del ácido etilendiamino tetraacético) en proporción de 1 mg/ml de sangre completa.

El hemograma efectuado estaba compuesto por:

Recuento de hematíes

Para el recuento de hematíes se ha utilizado el hemocitómetro de NEUBAUER, cuyo cuadrado central tiene 1 mm de lado ( $1 \text{ mm}^2$ ) y está dividido en 400 más pequeños ( $1/400 \text{ mm}^2$ ).

La altura del hemocitómetro es 0,1 mm. La dilución empleada para el recuento es 1:200 y para diluir se empleó suero fisiológico salino (solución del NaCl 0,9%). Se contaría según el método habitual los hematíes contenidos en 40 cuadrados pequeños ( $1/400 \text{ mm}^2$ ) y el cálculo se hizo con arreglo a la siguiente fórmula  $N^{\circ} \text{ Contado} \times 2 \times 10 \times 100 = H/\text{mm}^3$ .

Microhematocrito:

Por centrifugación en tubos capilares de 70 mm de longitud durante seis minutos a 12.000 r.p.m.

método basado en los trabajos originales de STRUMIA y cols. (1954). La lectura se efectuó en el lector de hematocrito de la casa Gri-cell.

#### Hemoglobinometría:

La técnica empleada es la recomendada por KAMPEN y ZIJLSTRA (1961) para determinación de cianmetahemoglobina.

La medida se ha efectuado en un espectofotómetro Spectronic 20 de la casa Bausch y Lomb a 545 mm de longitud de onda.

Las cifras de absorción se compararon con una curva previamente establecida con soluciones standard calibradas en cianmetahemoglobina.

#### Recuento de leucocitos:

Para el recuento de leucocitos se empleó el hemocitómetro de NEUBAUER cuyos retículos laterales miden 1mm de lado ( $1 \text{ mm}^2$ ), y están divididos en 16 más pequeños que miden  $1/16 \text{ mm}^2$ . La altura de la cámara es de 0,1 mm. La sangre se diluyó en proporción 1:20 en líquido de Türk (el acético diluido y violeta de gentiana).

Se contaron los leucocitos contenidos en todo el retículo. El cálculo para hallar la cifra por  $\text{mm}^3$  se hizo con arreglo a la fórmula siguiente:

$N^{\circ}$  Cántado  $\times 10 \times 10 = N^{\circ}$  Leucocitos /  $mm^3$ .

Las extensiones de sangre fueron teñidas según el método pancrómico de PAPPENHEIM (1911) que es una tinción combinada con los colorantes de MAY-GRUNWALD y de GIEMSA y en ellas se determinó la fórmula leucocitaria relativa por diferenciación de cien elementos nucleados, y la morfología eritrocitaria.

Para la diferenciación de los pseudoeosinófilos de la sangre de conejo de los eosinófilos verdaderos hemos empleado el método de VEGA y Cols. (1970) con verde de Guinea a ptc alcalino.

Los controles de calidad se han efectuado según las indicaciones de CARTWRIGHT (1973).

#### Control de los resultados: Técnicas de electroforesis.

Los sueros para sangrias de pruebas practicadas en región central de la oreja a nivel de la vena central o bien a nivel de la vena marginal, mediante lanceta de Frank y recogida la sangre en tubos capilares de microhematocritos sin heparinizar (longitud de 70 mm Gricel), fueron centrifugados a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos, pasados los cuales

mediante corte de capilar se recogieron los sueros correspondientes.

Con dichos sueros se practicó una inmunoelectroforesis, utilizando como substratos tiras de acetato de celulosa previamente conservadas en un ambiente de metanol al 40%.

Las placas fueron corridas con buffer de veronal sódico (dietil barbiturado sódico) a una concentración de 8,24 gramos por litro (lo que corresponde a una molaridad de 0,04).

El tiempo de corrido osciló dependiendo del voltaje y de la fuerza iónica; siendo finalmente aceptado el de una hora y el voltaje de 250 voltios. El paso de la corriente por las placas osciló de 5,5 a 6 mA.

Tras una microaplicación a nivel del borde catódico de 0,25 microlitros, la longitud total de la migración fué de 45 mm.

Se procedió después a la coloración de la placa, utilizando para ello el rojo PONCEAU en dilución con ácido acético y metanol, por un espacio de 10 minutos, tras los cuales se aplicaron tres baños de coloración, utilizando para ello una solución a la misma concentración, con el colorante, de

ábido acético y metanol en el buffer de corrido, en las cuales se practicaron tres o cuatro pases en dicho baño de colorante.

Una vez terminada la decoloración se trasplantó la placa al objeto de hacer más resolutiva su lectura en el fotodensitómetro, para lo cual, primero, se secó la placa entre dos hojas de papel secante y después se introdujeron las placas en un baño deshidratante, uno o dos minutos, tiempo que se redujo a treinta segundos cuando la tinción se practicó con verde Lisamina.

Después del baño de desecación se colocaron las placas en la solución transparentadora por un tiempo de unos tres minutos aproximadamente. A continuación se colocaron sobre placas de vidrio eliminando con un rodillo las burbujas de aire, colocándose dicha placa de vidrio, portando la tira ya transparentada de acetano de celulosa bajo una lámpara de rayos infrarrojos a unos cinco o diez cms. de distancia hasta conseguir una transparencia completa.

En nuestro caso en algunas ocasiones constatamos que el transparentado, utilizando el calor seco de una estufa fué igual cuando no superior al

conseguido por la luz de infrarrojos, si bien a veces tuvimos que aumentar la concentración de ciclohexanona en el baño transparentador.

La determinación de las proteínas totales se constató por el doble método mediante la técnica de Lowry y la refractometría, al objeto de ver cual de ambas era más resolutive.

La lectura de dicha electroforesis sérica arrojó los siguientes datos:

Control de los resultados: método de hemaglu-tinación.

La tasa de producción de anticuerpos, por parte de los grupos experimentales manejados (controles irradiados, y/o inmunizados) se detectó por el sistema de aglutinación pasiva, según el método de KABBAT y MAYER (1961).

Dado que la reacción de precipitación requiere cantidades importantes de antígenos y de anticuerpos, la reacción inmune puede ser altamente sensibilizada, mediante la fijación del antígeno a la superficie de partículas inertes.

Se transforma así la reacción de precipitación en una reacción de aglutinación y dada su mayor sensibilidad nos permite detectar cantidades mucho me-

nores de anticuerpos.

La dificultad de esta reacción reside en la preparación de una suspensión (que debe ser muy estable de dichas partículas inertes; partículas que a su vez deben tener una gran capacidad de conjugación con el antígeno frente al cual queremos detectar la cantidad de anticuerpos. Así pues, según la naturaleza del antígeno tendremos que buscar las partículas apropiadas.

En el caso que nos ocupa, por tratarse de antígenos protéicos, se utilizan hematíes, previamente tratados por un agente químico susceptible de asegurar una ligadura sólida entre proteínas globulares y los antígenos proteicos a fijar. (Bien sea la bencidina diazotada, el cloruro de cromo, el glutaraldehído, o como en nuestro caso el ácido tánico) procediendo del modo que a continuación describimos:

Se toma 0,1 milímetro de un sedimento globular lavado por tres veces en P.B.S. y repuesto hasta 1 mililitro de dicha solución fisiológica tampouada (Cl Na 8.19 grs.- PO<sub>4</sub> HK<sub>2</sub> 0.83 gms.- PO<sub>3</sub>HNa<sub>2</sub>-12H<sub>2</sub>O 2.67 gms a pH 7.3).

El antígeno a fijar a una concentración de 0,5 gms/mil que se añade a la suspensión globular agitándose los hematíes.

Se tratan previamente en una solución de ácido tánico al 0.25% o al 2.5/mil durante un cuarto de hora a la temperatura ambiente.

Los hematíes tratados puestos junto con la solución antigénica antes mencionada, se centrifugan a velocidad débil, eliminando el sobrenadante y lavando por tres veces consecutivas en P.B.S.

Después del último lavado, los hematíes se ponen en 5 mililitros de P.B.S. conteniendo un 2 por mil de albúmina.

Así tratados y para preservar la contaminación se le añade neomicina al 0.1 por mil.

Con esta técnica y mediante el proceder de titulación, de diluciones sucesivas se determinó el título de anticuerpos circulantes en el suero, de los animales de los diferentes grupos experimentales, tomando como dato fiable la titulación última a la que se encontró hemaglutinación con los hematíes tanizados y conjugados con proteínas cristalínicas.

C A P I T U L O VI

GRAFICOS y FOTOGRAFIAS

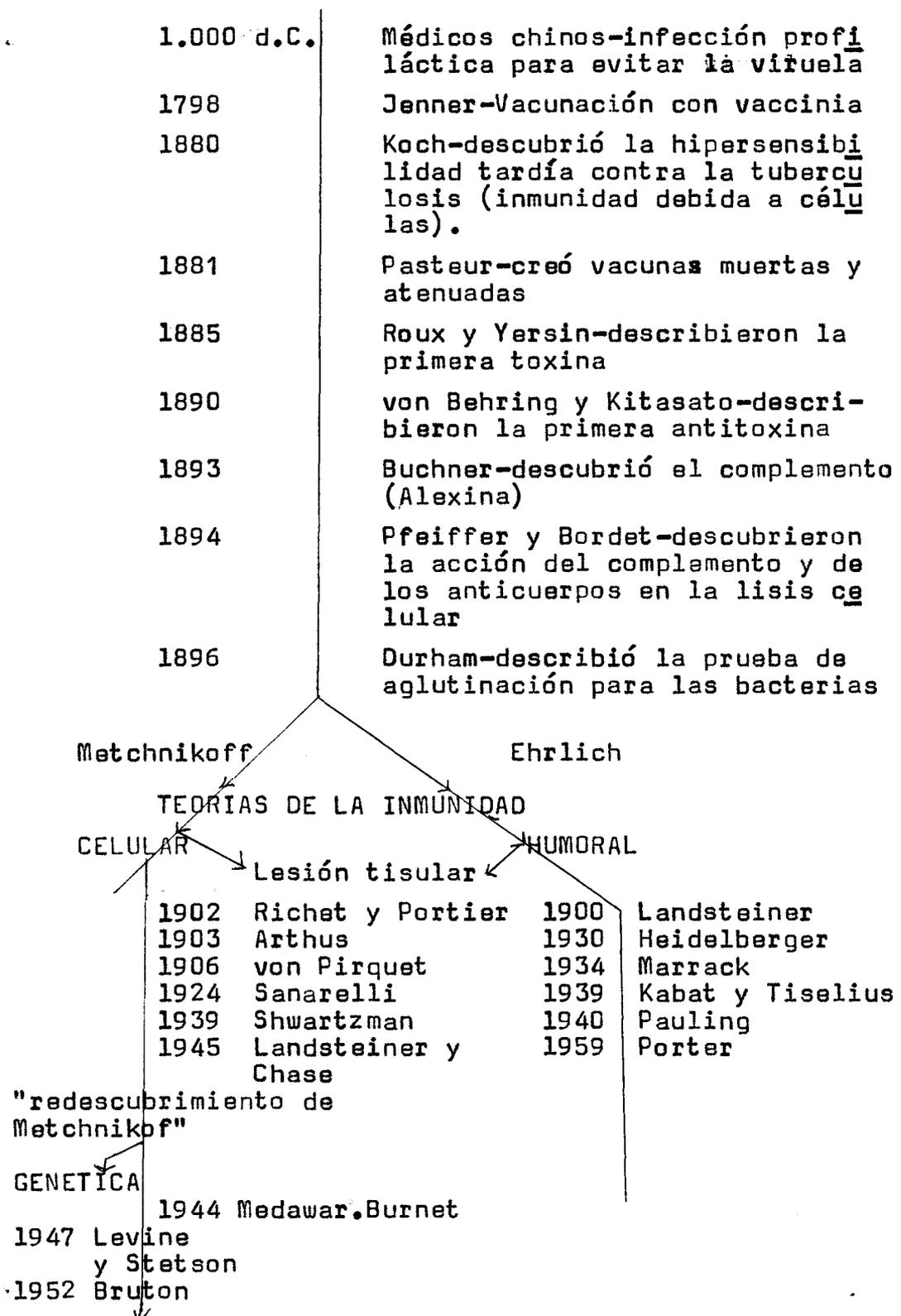


Fig. 1-1. Representación esquemática de algunos descubrimientos fundamentales en inmunología.

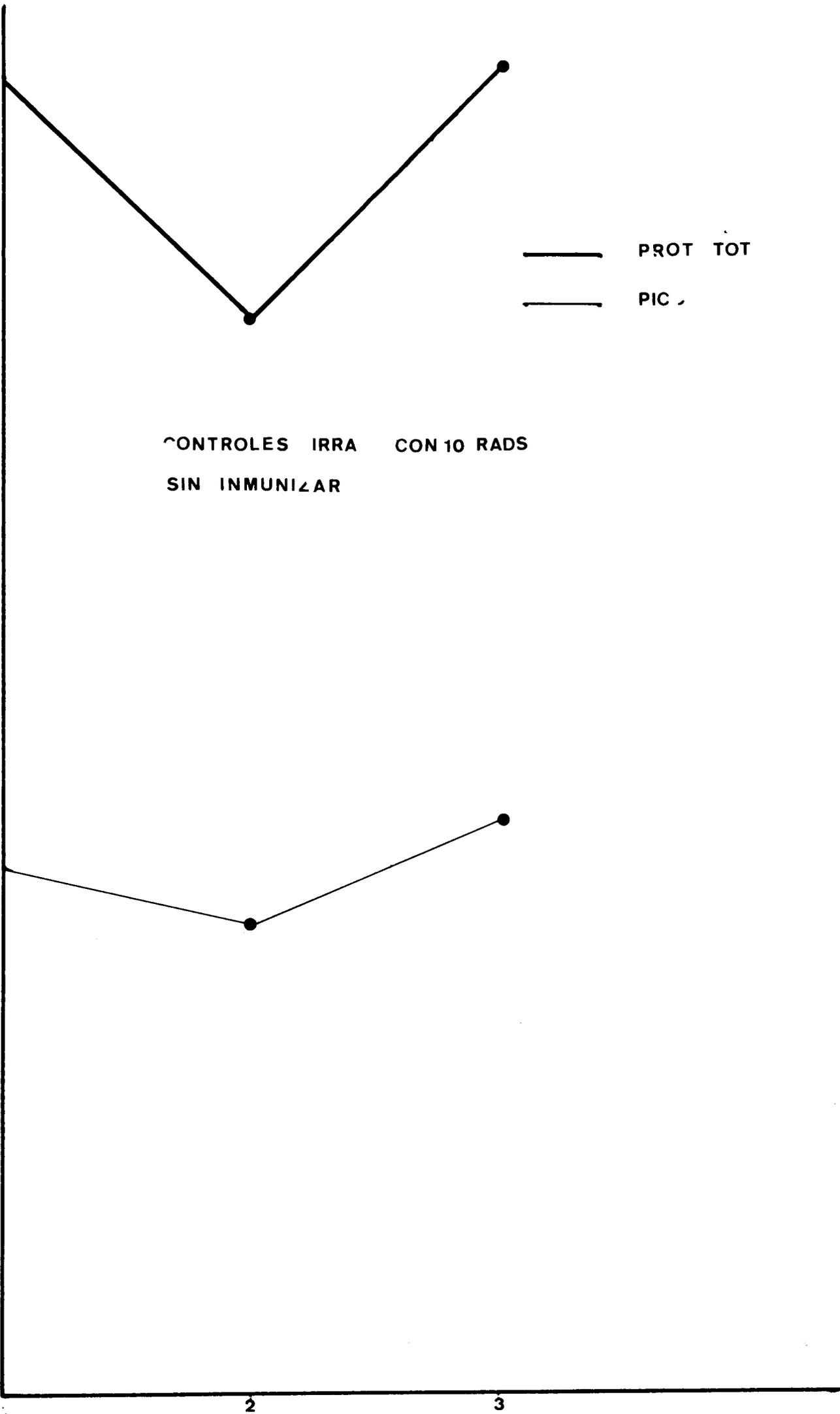
## LÉCTURA DE LA GRAFICA Nº 1

Comportamiento electroforético de los pico nº 1 y proteínas totales en los conejos irradiados con 10 rads y no inmunizados.

1ª y 3ª determinaciones

Proteínas Totales 

Pico nº 1 



PROT TOT

PIC

CONTROLES SIN INMUNIZAR  
IRRA CON 10 RADS

2

3

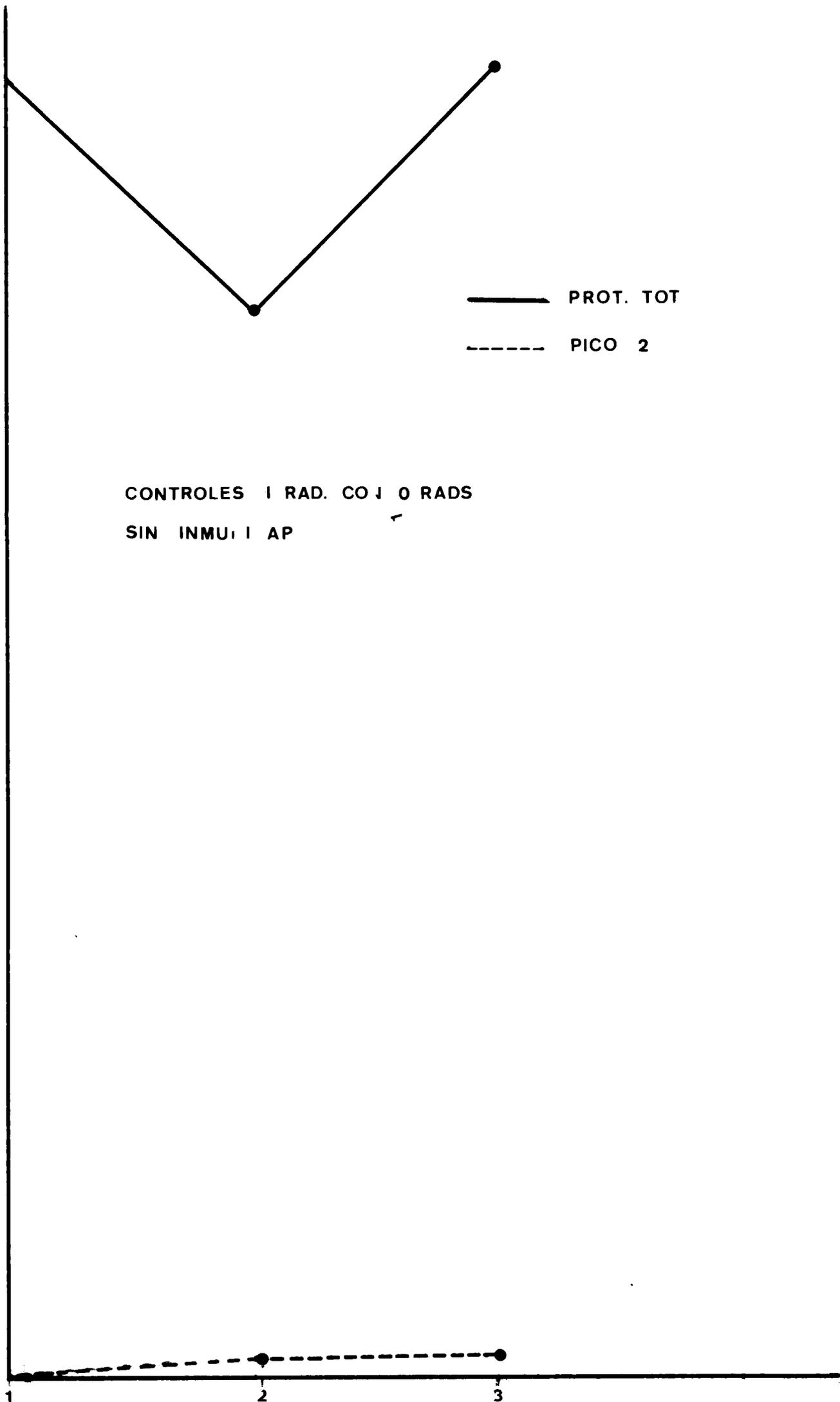
## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 2

Comportamiento electroforético de los pico nº 2 y proteínas totales en los conejos controles irradiados con 10 rads y no inmunizados.

1ª a 3ª Determinaciones

Proteínas totales 

Pico nº 2 



PROT. TOT

PICO 2

CONTROLES 1 RAD. CO J 0 RADS

SIN INMUI I AP

## LÉCTURA DE LA GRAFICA Nº 3

Comportamiento electroforético de los pico nº 3 y proteínas totales en los conejos controles irradiados con 10 rads y no inmunizados.

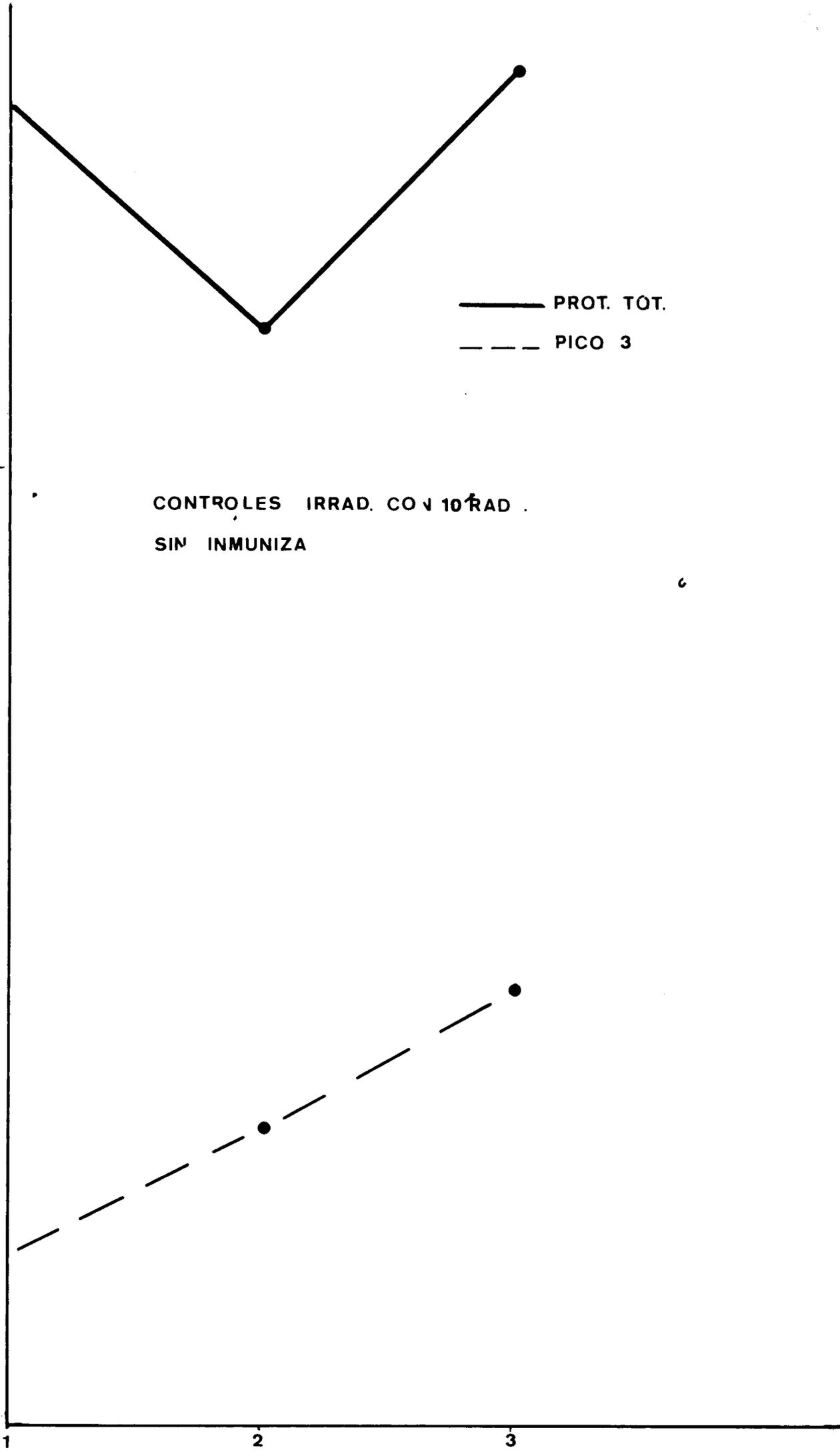
1ª a 3ª Determinaciones

Proteínas Totales 

Pico nº 3 

— PROT. TOT.  
- - - PICO 3

CONTROLES IRRAD. CO  $10^4$  RAD .  
SIN INMUNIZA



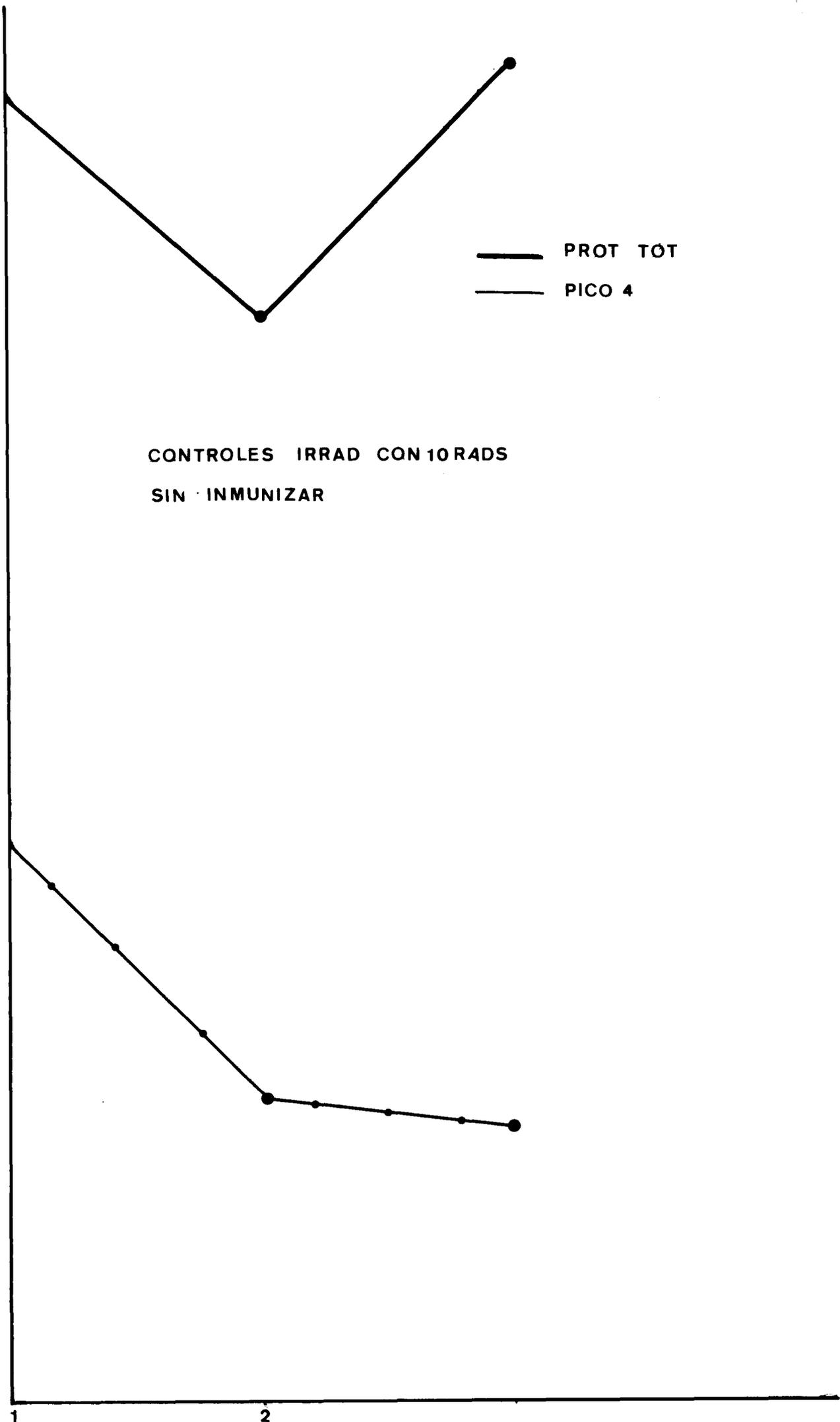
## LÈCTURA DE LA GRAFICA N° 4

Comportamiento electroforético de los picos  
n° 4 y proteínas totales en los conejos controles  
irradiados con 10 rads y no inmunizados.

1ª y 3ª determinaciones

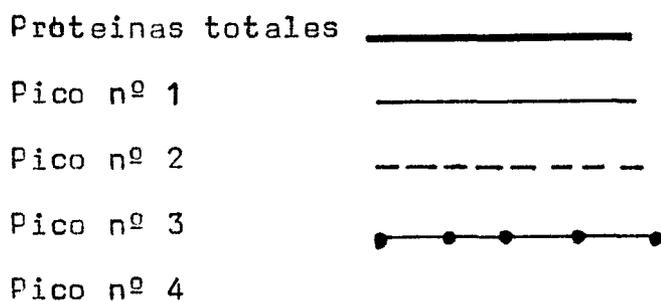
Proteínas totales 

Pico n° 4 

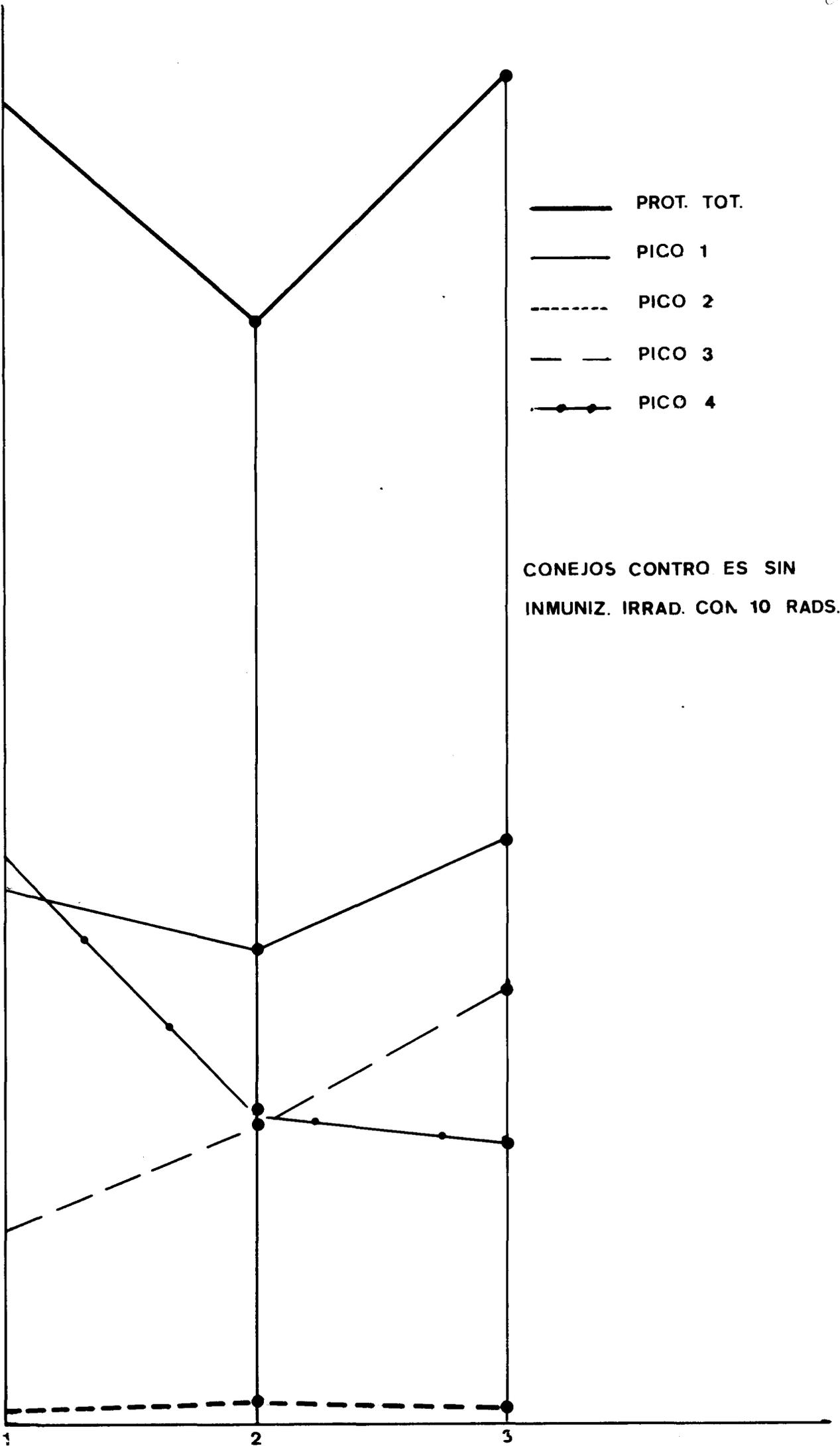


## LECTURA DE LA GRAFICA N° 5

Comportamiento electroforético de los conejos irradiados con 10 rads sin inmunizar.



Proteínas totales	6.87	5.72	7.03
Pico 1 	40.8	43.8	43.7
Pico 2 	0.53	1.35	0.72
Pico 3 	13.25	27.32	32.43
Pico 4 	42.73	28.35	21.32



## LÉCTURA DE LA GRAFICA Nº 6

Comportamiento electroforético de los pico  
nº 1 y proteínas totales en los conejos irradiados  
con 10 rads e inmunizados según la técnica  
expuesta en la pág. 94

1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales \_\_\_\_\_

Pico nº 1 \_\_\_\_\_



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 7

Comportamiento electroforético de los pico nº 2 y Proteínas totales de los conejos irradiados con 10 rads e inmunizados según la técnica expuesta en la pág. 94

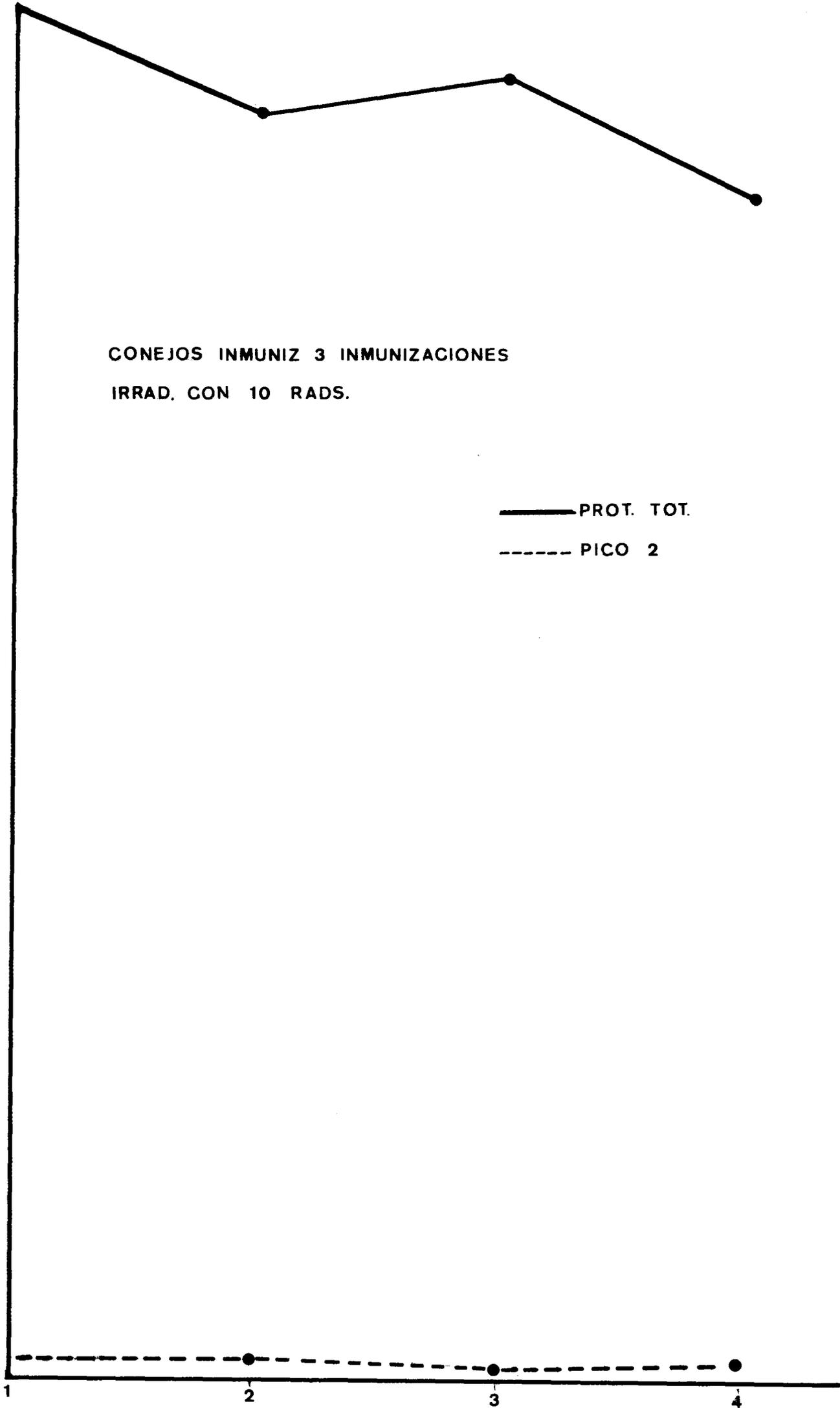
1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales 

Pico nº 2 

CONEJOS INMUNIZ 3 INMUNIZACIONES  
IRRAD. CON 10 RADS.

— PROT. TOT.  
- - - PICO 2



## LÉCTURA DE LA GRAFICA Nº 8

Comportamiento electroforético de los pico nº 3 y Proteínas totales en los conejos irradiados con 10 rads e inmunizados según la técnica expuesta en la pág. 94.

1ª a 4ª Determinaciones

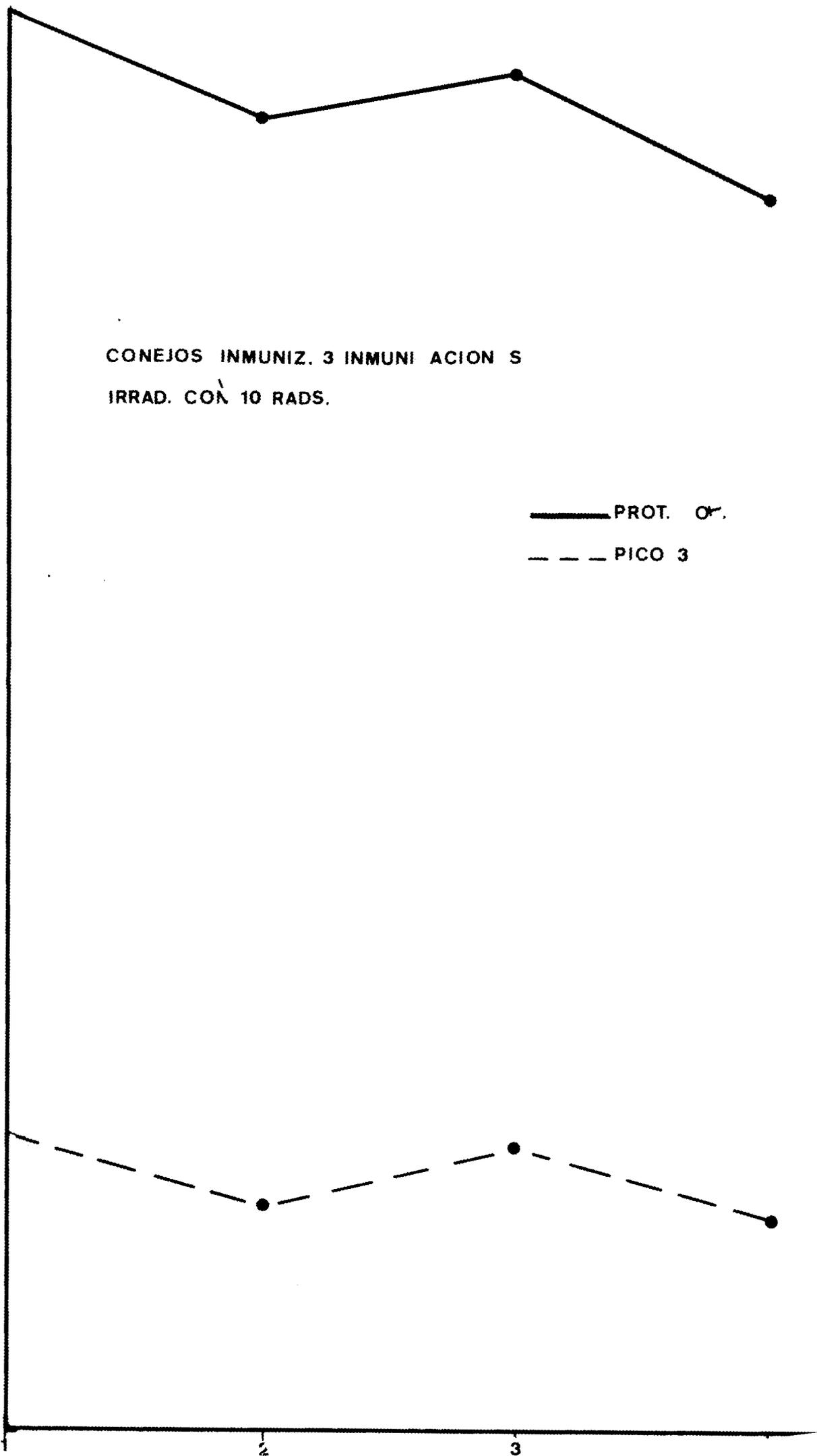
Proteínas Totales \_\_\_\_\_

Pico nº 3            \_\_\_\_\_

CONEJOS INMUNIZ. 3 INMUNIZACIONES  
IRRAD. CON 10 RADS.

— PROT. O.

- - - PICO 3



## LÉCTURA DE LA GRAFICA Nº 9

Comportamiento electroforético de los pico  
nº 4 y proteínas totales en los conejos irradiados con 18 rads e inmunizados según la técnica expuesta en la pág. 94.

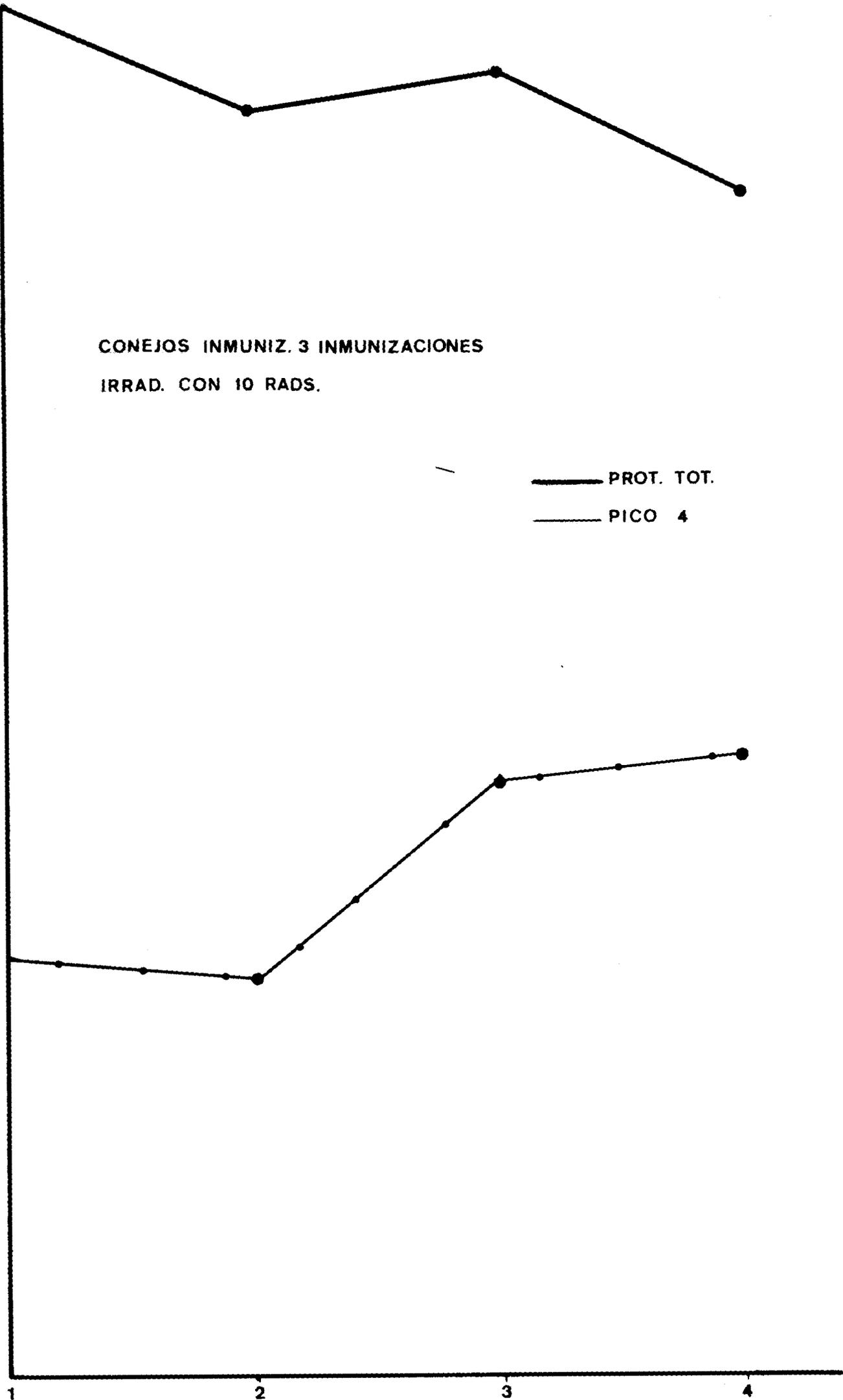
1ª a 3ª Determinaciones

Proteínas totales 

Pico nº 4 

CONEJOS INMUNIZ. 3 INMUNIZACIONES  
IRRAD. CON 10 RADS.

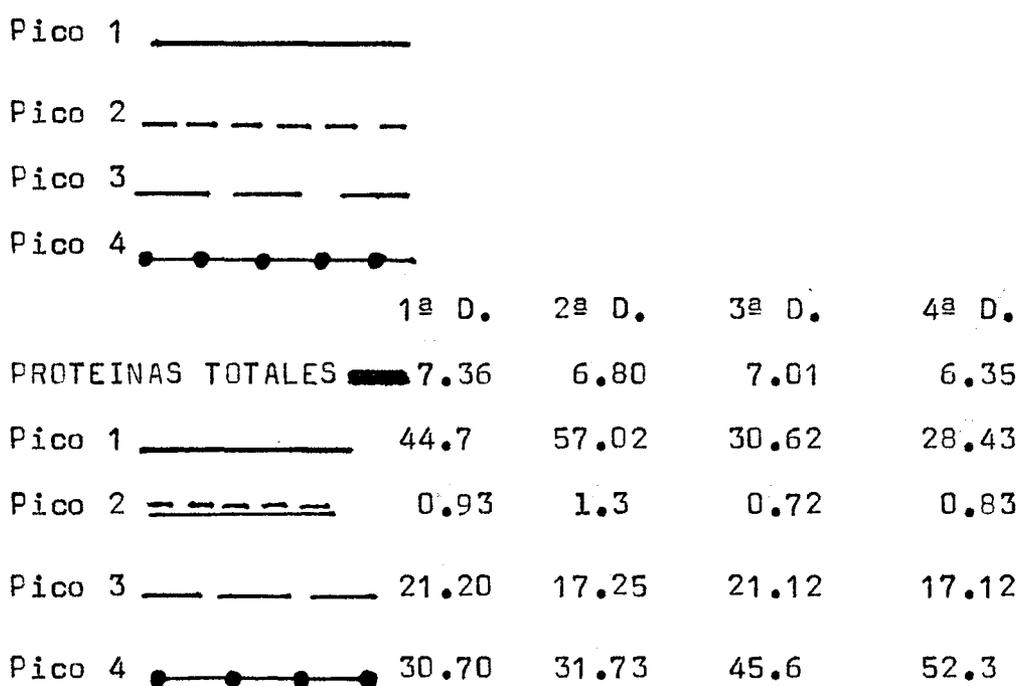
—●— PROT. TOT.  
—●— PICO 4



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 10

Comportamiento electroforético de los conejos irradiados con 10 rads e inmunizados según técnicas expuesta en la pág. 94.

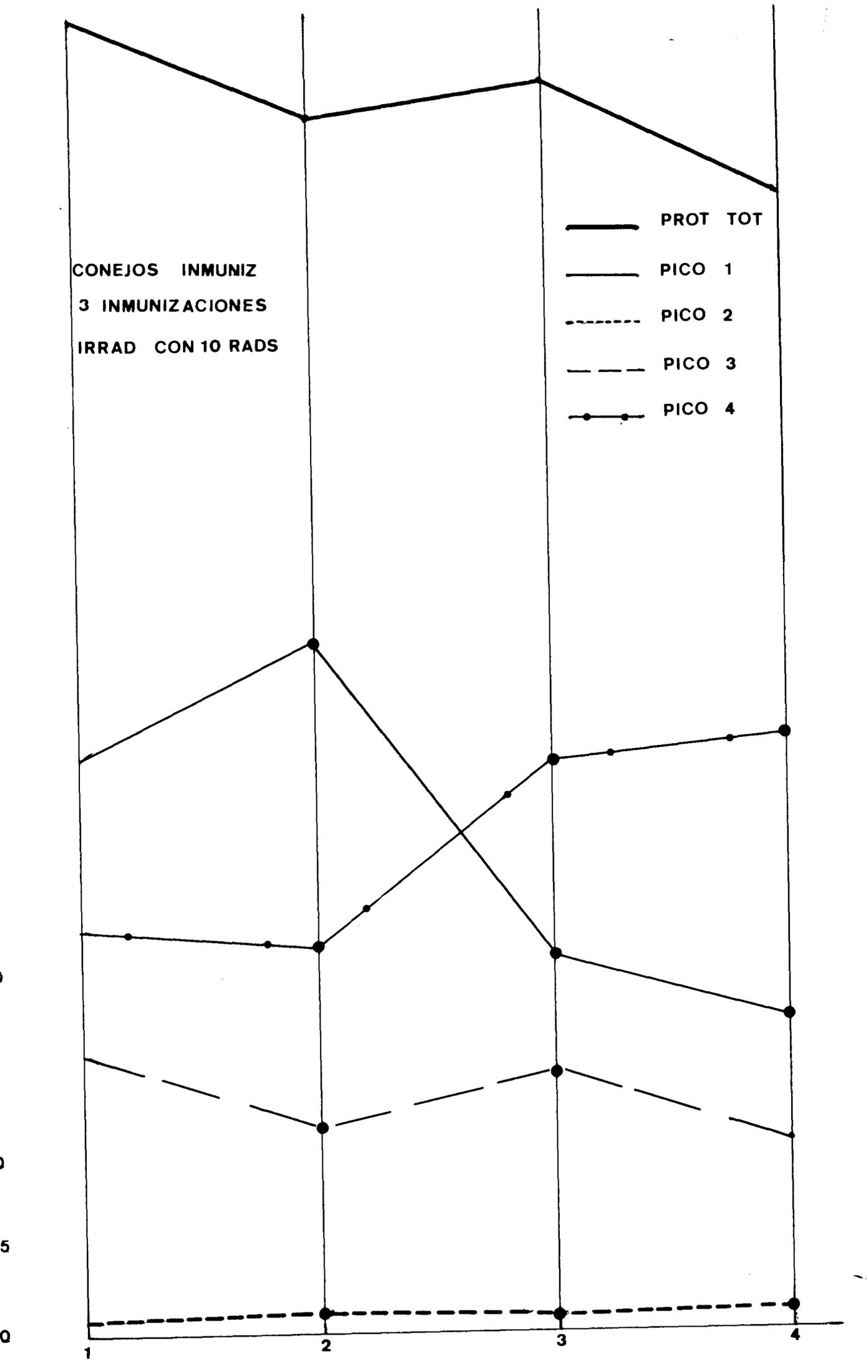
## PROTEINAS TOTALES



1ª Determinación . . . Pre-inmunización  
 2ª " . . . 1ª Pre-inmunización  
 3ª " . . . 2ª "  
 4ª " . . . 3ª "

CONEJOS INMUNIZ  
3 INMUNIZACIONES  
IRRAD CON 10 RADS

PROT TOT  
PICO 1  
PICO 2  
PICO 3  
PICO 4



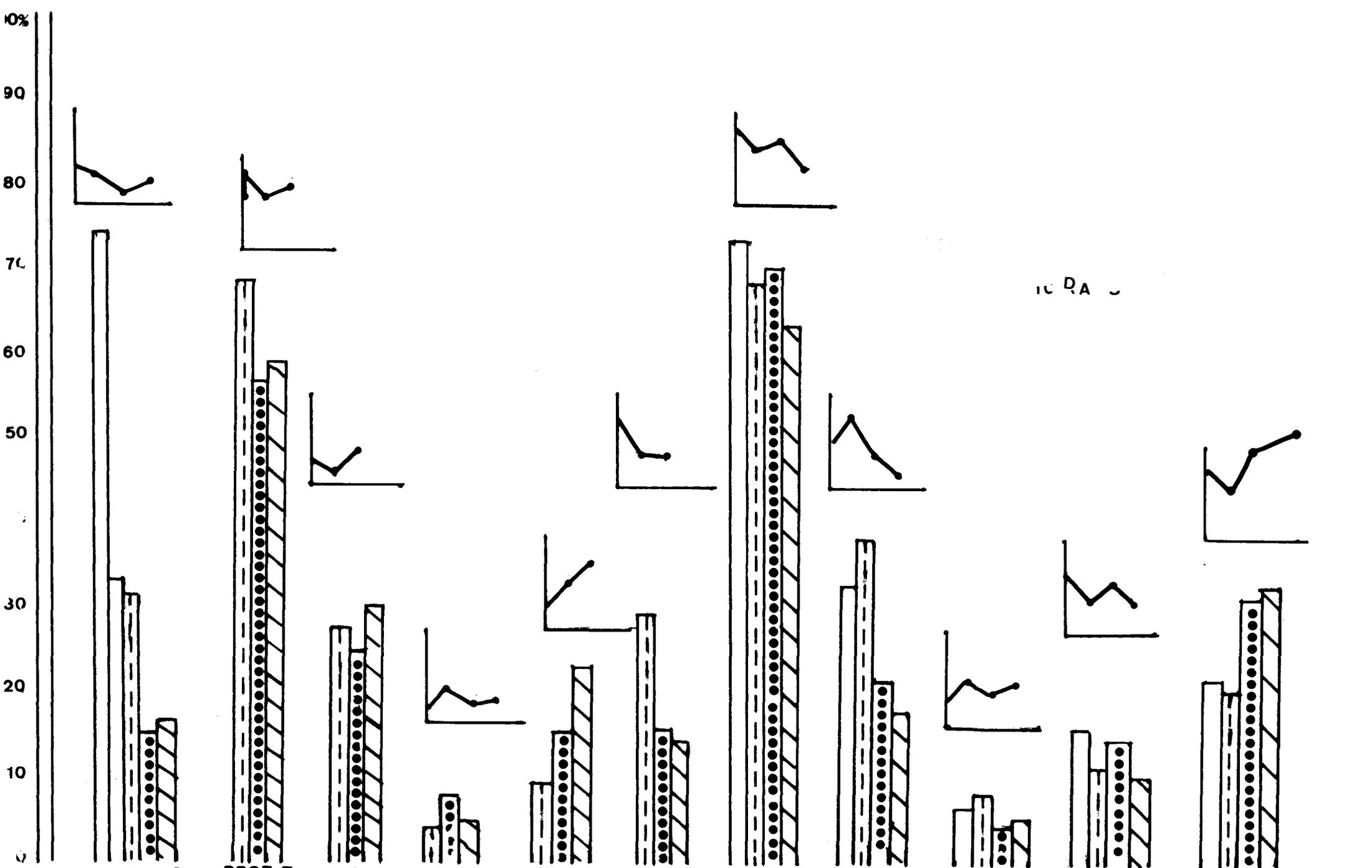
LECTURA DE LA GRAFICA Nº 11

Comportamiento electroforético de las proteinas totales, cuatro picos y cuatro determinaciones (3 inmunizaciones) en los conejos irradiados con 10 rads inmunizados y no inmunizados y su comparación con los controles.

Proteinas Totales

1ª Determinación  2ª Determinación \_ \_ \_ \_ \_

3ª Determinación ●●●●●● 4ª Determinación // // // //



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 12

Comportamiento electroforético de los pico nº 1 y proteínas totales en los conejos irradiados con 20 rads e inmunizados según la técnica expuesta en la pág. 94

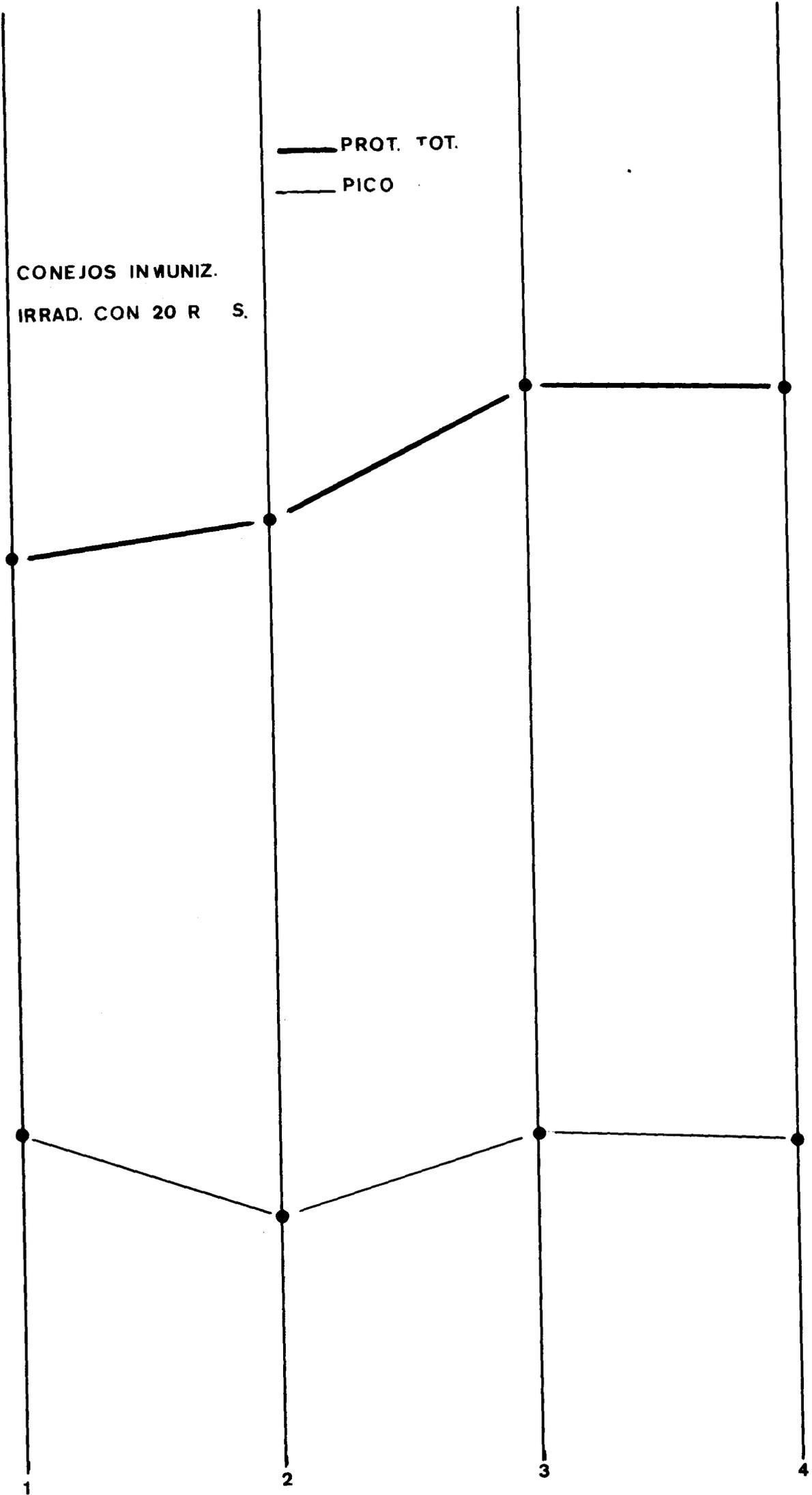
1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales \_\_\_\_\_

Pico nº 1 \_\_\_\_\_

— PROT. TOT.  
— PICO

CONEJOS INMUNIZ.  
IRRAD. CON 20 R S.



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 13

Comportamiento electroforético de los pico nº 2 y proteínas totales en los conejos irradiados con 20 rads e inmunizados según la técnica expuesta en la pág. 94

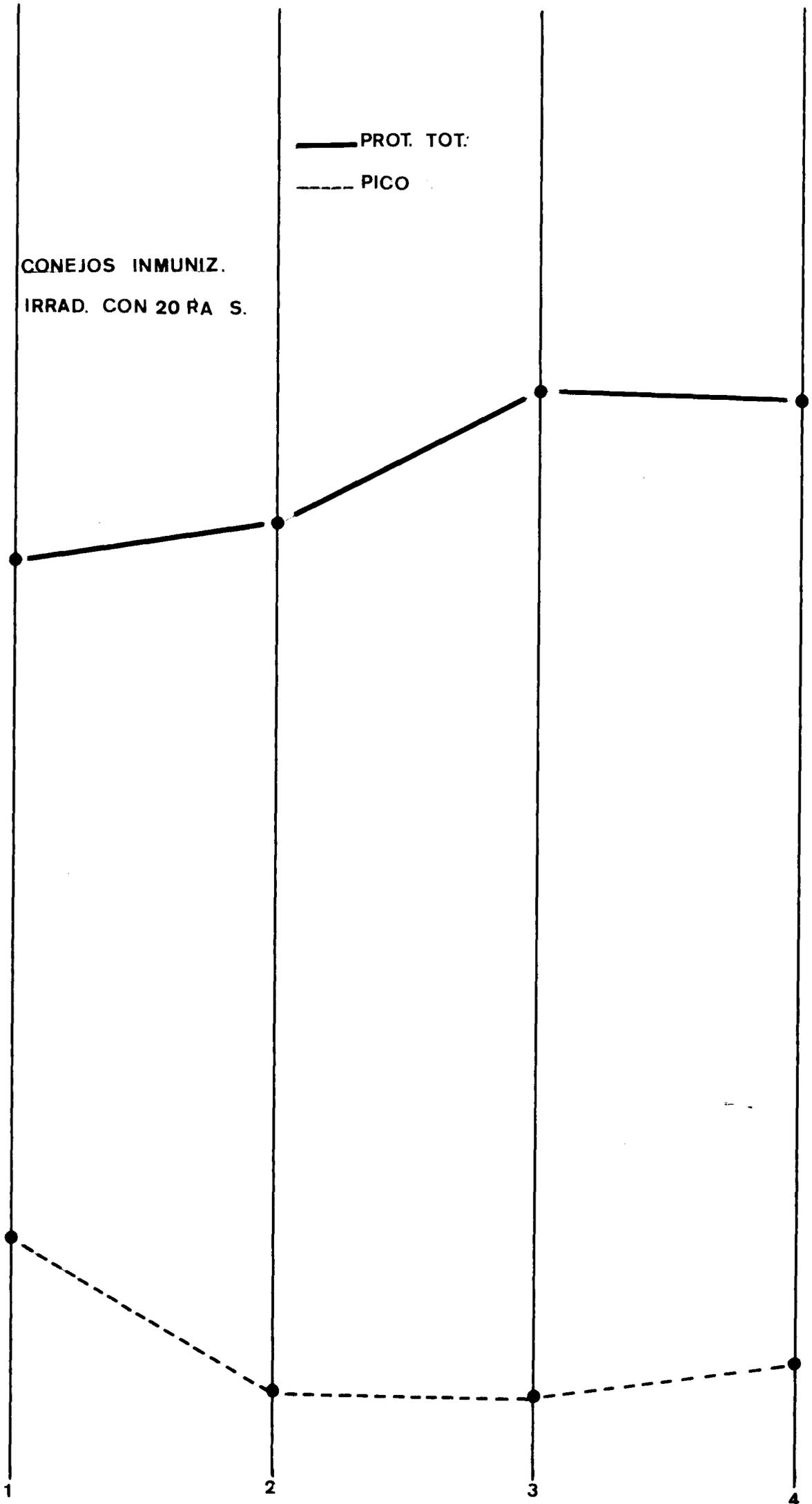
1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas Totales 

Pico nº 2 

CONEJOS INMUNIZ.  
IRRAD. CON 20 RA S.

— PROT. TOT:  
- - - PICO



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 14

Comportamiento electroforético de los pico nº 3 y proteínas totales en los conejos irradiados con 20 rads e inmunizados según la técnica expuesta en la pág. 94

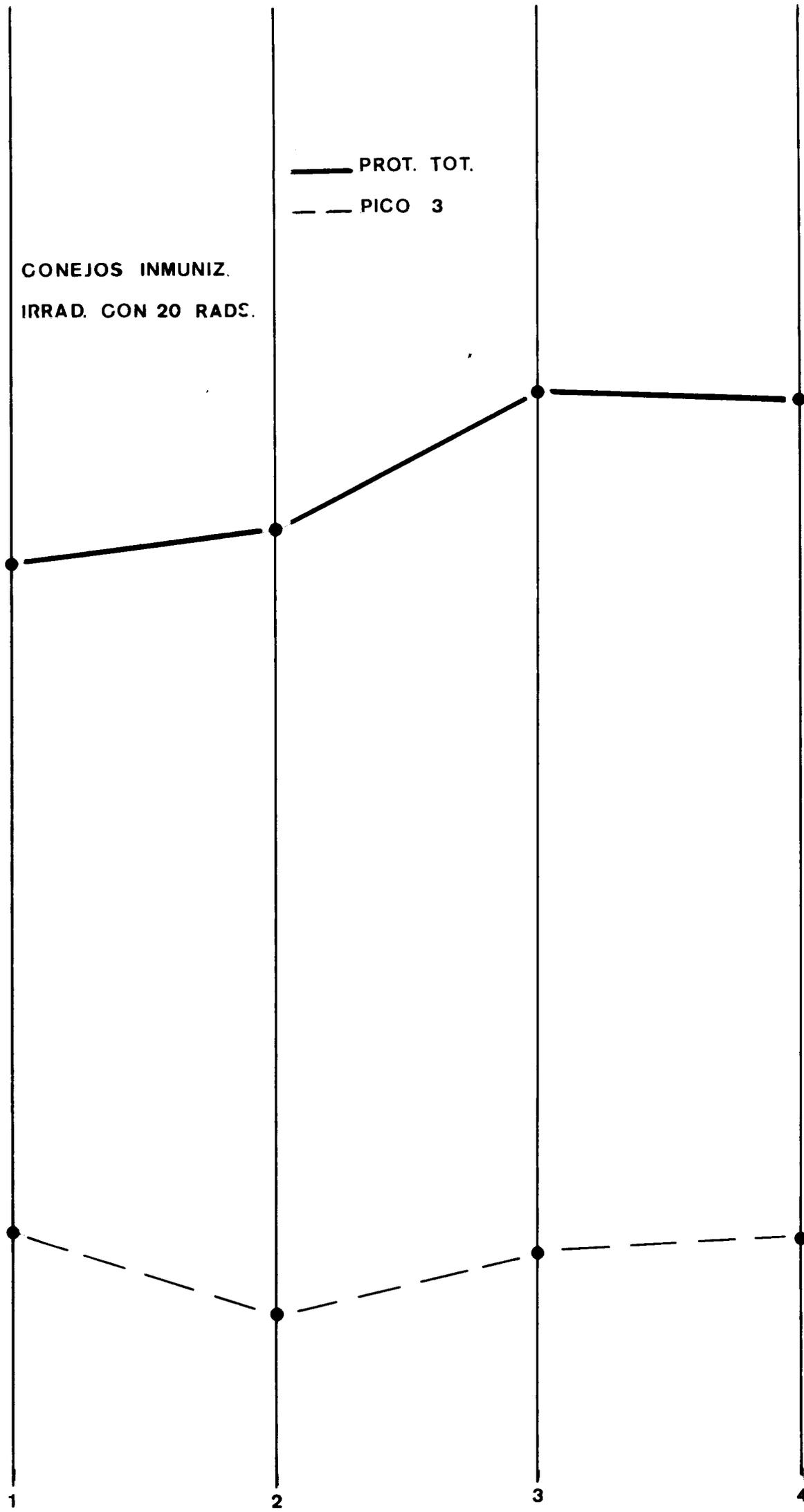
1ª a 4ª determinaciones

Proteínas totales \_\_\_\_\_

Pico nº 3            \_\_\_\_\_

CONEJOS INMUNIZ.  
IRRAD. CON 20 RAD.

— PROT. TOT.  
- - - PICO 3



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 15

Comportamiento electroforético de los pico nº 4 y proteínas totales en los conejos irradiados con 20 rads e inmunizados según la técnica expuesta en la pág. 94

1ª a 4ª determinaciones

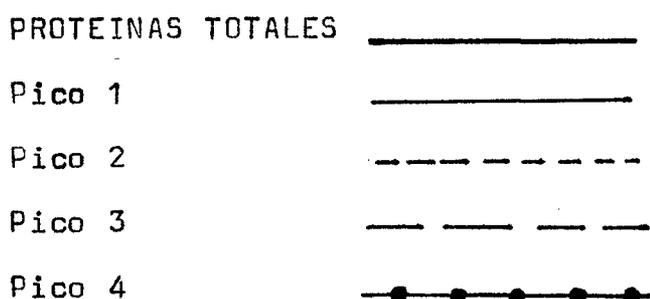
Proteínas totales \_\_\_\_\_

Pico nº 4                    —●—●—●—●—



## LECTURA DE LA GRAFICA N° 16

Comportamiento electroforético de los conejos irradiados con 20 rads e inmunizados según técnica expuesta en la pág. 94

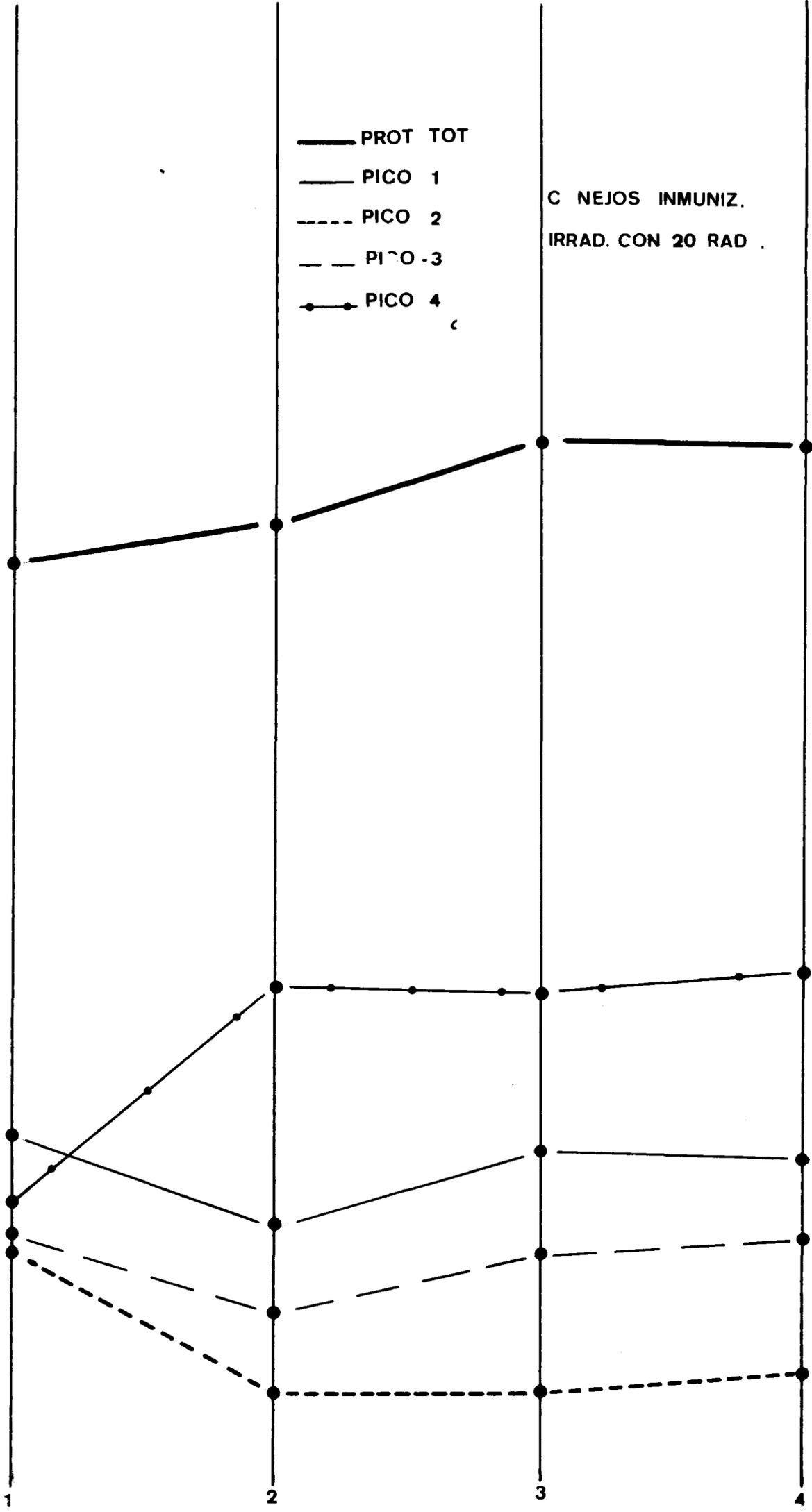


PROTEINAS TOTALES	6.27	6.52	7.46	7.37
Pico 1	37.60	27.12	31.00	30.26
Pico 2	2.60	0.88	0.80	1.05
Pico 3	27.30	17.40	21.30	22.43
Pico 4	30.41	52.40	45.20	46.83

1ª Determinación . . . Pre-inmunización  
 2ª " . . . 1ª Inmunización  
 3ª " . . . 2ª Inmunización  
 4ª " . . . 3ª Inmunización

———— PROT TOT  
 ———— PICO 1  
 - - - - PICO 2  
 - - - - PICO -3  
 ● —● PICO 4

C NEJOS INMUNIZ.  
 IRRAD. CON 20 RAD .



## LECTURA DE LA GRAFICA N° 17

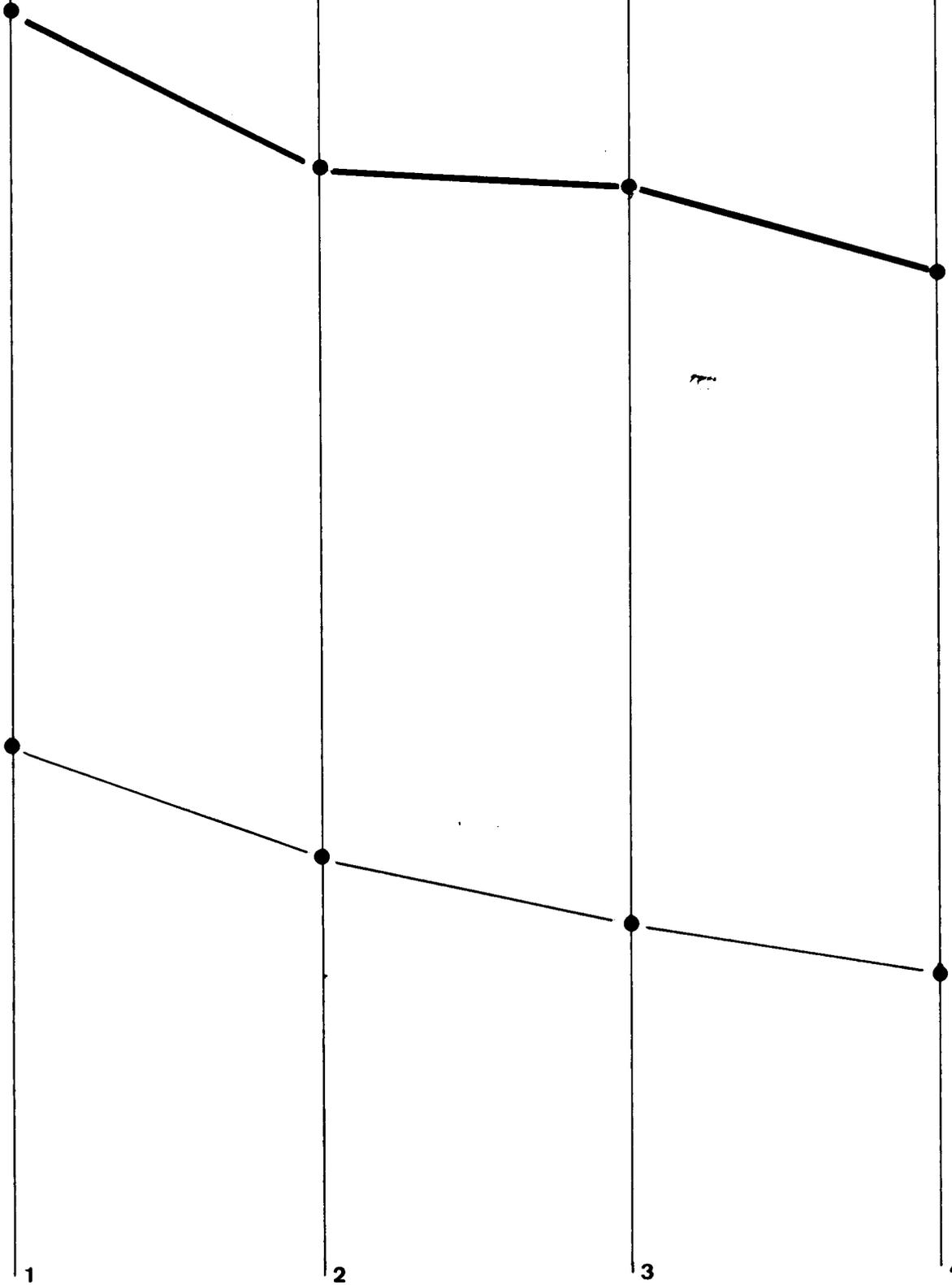
Comportamiento electroforético de los pico  
n° 1 y proteínas totales en los conejos irra -  
diados con 20 rads y no inmunizados

1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales \_\_\_\_\_

Pico n°1 \_\_\_\_\_

— PROT T  
— PICCO 1  
NO  
CONTOS INMUNIZ  
IRRA'DI CON 20 F.ADS



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 18

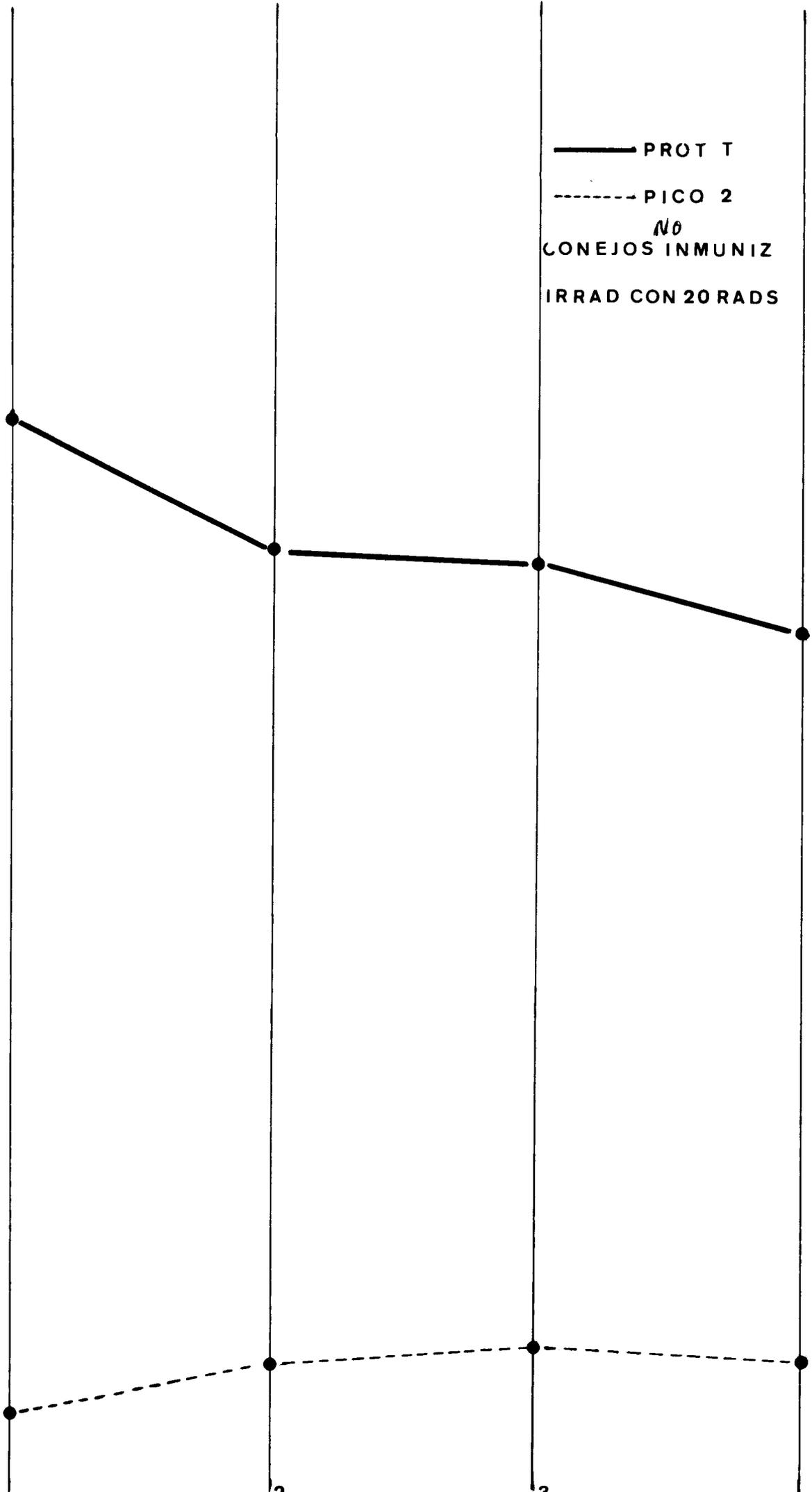
Comportamiento electroforético de los pico nº 2 y proteínas totales en conejos irradiados con 20 rads y no inmunizados.

1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales \_\_\_\_\_

Pico nº 2 - - - - -

— PROT T  
- - - PICO 2  
*No*  
CONEJOS INMUNIZ  
IRRAD CON 20 RADS



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 19

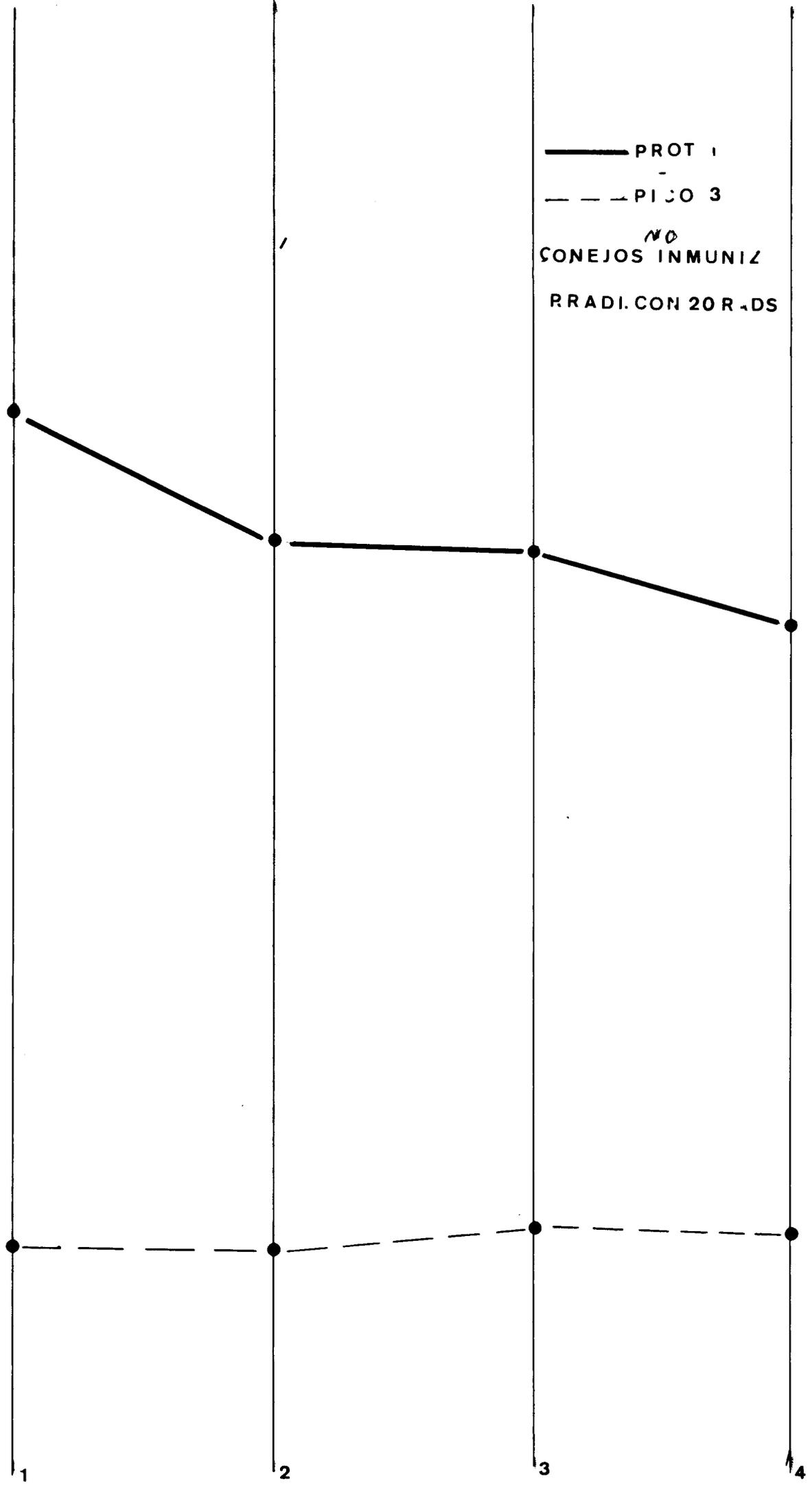
Comportamiento electroforético de los pico nº 3 y proteínas totales con los conejos irradiados con 20 rads y no inmunizados.

1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales \_\_\_\_\_

Pico nº 3            - - - - -

— PROT 1  
- - - PICO 3  
Nº  
CONEJOS INMUNIZ  
RADI. CON 20 RADS



## LECTURA DE LA GRAFICA N° 20

Comportamiento electroforético de los pico  
n° 4 y proteínas totales en los conejos irra-  
diados con 20 rads y no inmunizados.

1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales \_\_\_\_\_

Pico n° 4                   ●●●●



## LECTURA DE LA GRAFICA N° 21

Comportamiento electroforético de los cone-  
jos irradiados con 20 rads y no inmunizados.

PROTEINAS TOTALES \_\_\_\_\_

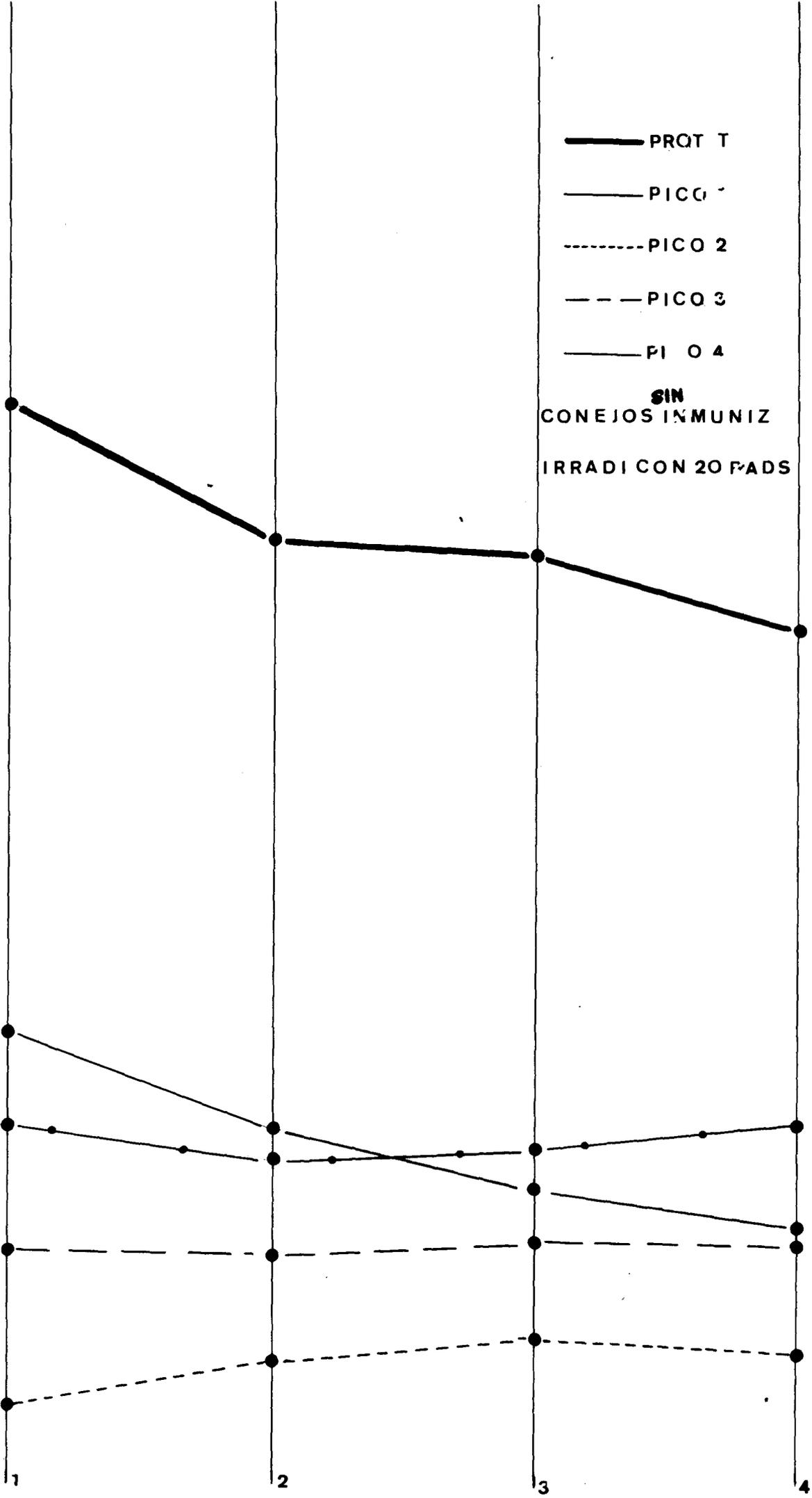
Pico n° 1 \_\_\_\_\_

Pico n° 2 - - - - -

Pico n° 3 \_\_\_\_\_

Pico n° 4 ●●●●●

PROTEINAS TOTALES	7.31	6.42	6.30	5.80
Pico 1	42.5	37.6	32.5	30.6
Pico 2	0.75	1.3	1.5	1.6
Pico 3	21.8	24.7	26.2	28.3
Pico 4	34.1	34.7	36.4	42.7



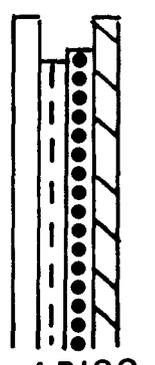
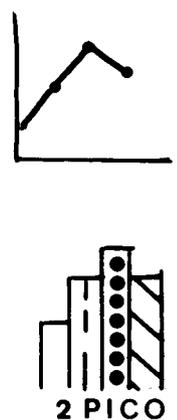
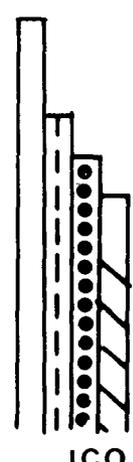
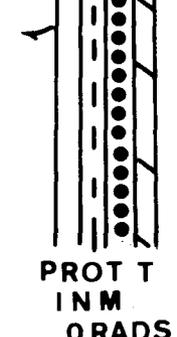
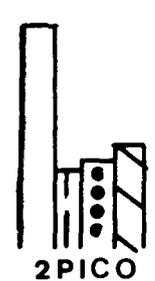
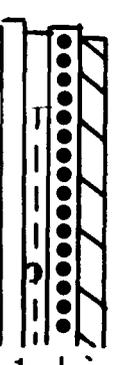
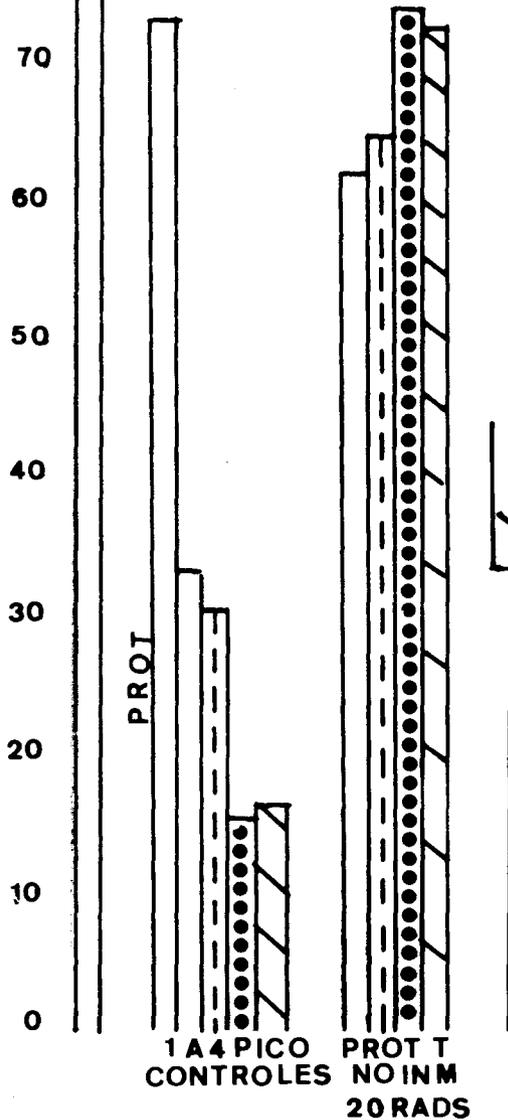
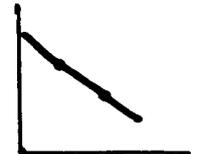
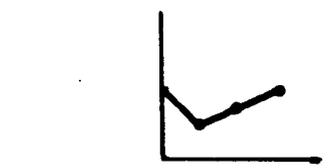
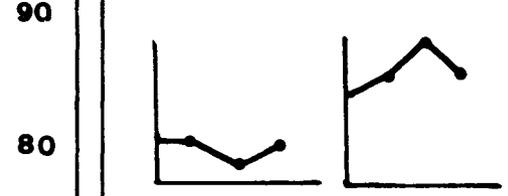
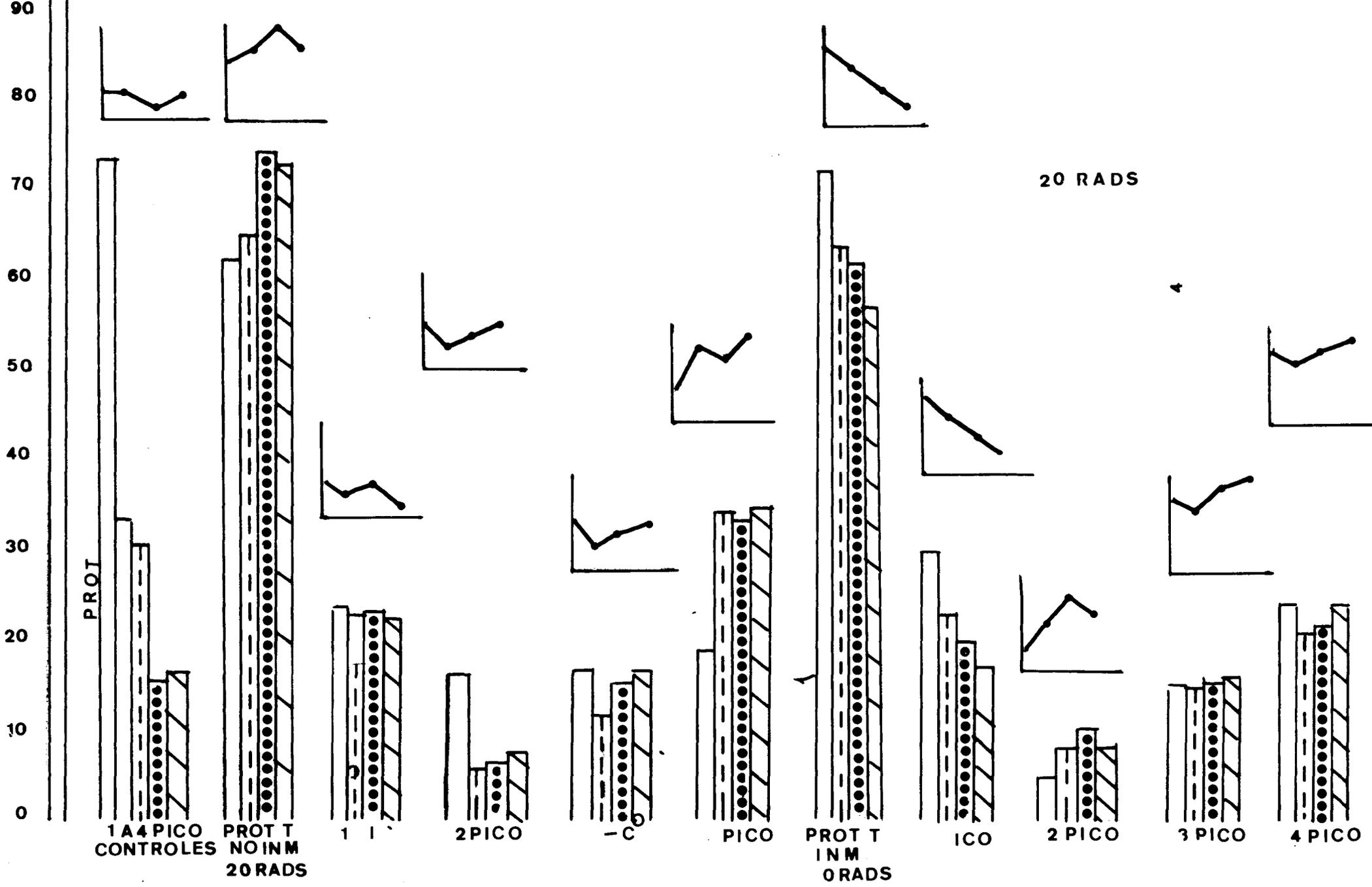
## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 22

Comportamiento electroforético de las proteínas totales, cuatro picos y cuatro determinaciones (tres inmunizaciones) en los conejos irradiados con 20 rads inmunizados (según técnica expuesta en la pág. 94 ) y no inmunizados y su comprobación con los controles.

### Proteínas totales

1ª Determinación  2ª Determinación — — — — —

3ª Determinación ●●●●●● 4ª Determinación / / / / / / / /



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 23

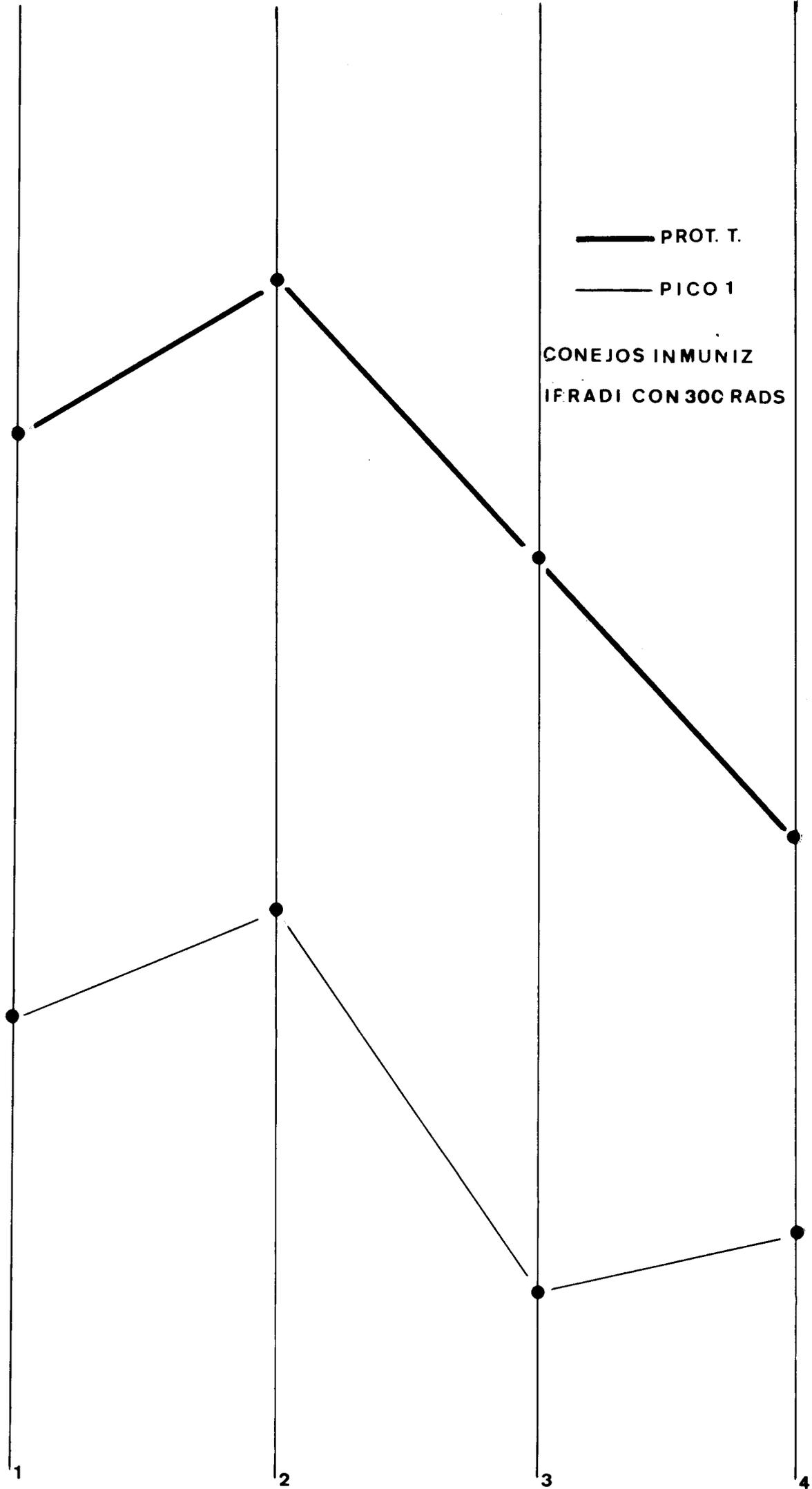
Comportamiento electroforético de los picos  
Nº 1 y proteínas totales en los conejos irradiados  
con 300 rads e inmunizados según la técnica  
expuesta en la pág. 94

1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales 

Pico nº 1 

b



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 24

Comportamiento electroforético de los pico nº 2 y proteínas totales en los conejos irradiados con 300 rads e inmunizados según la técnica expuesta en la pág. 94

1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales \_\_\_\_\_

Pico nº 2 -----

100%

90

80

70

60

50

40

30

20

10

5

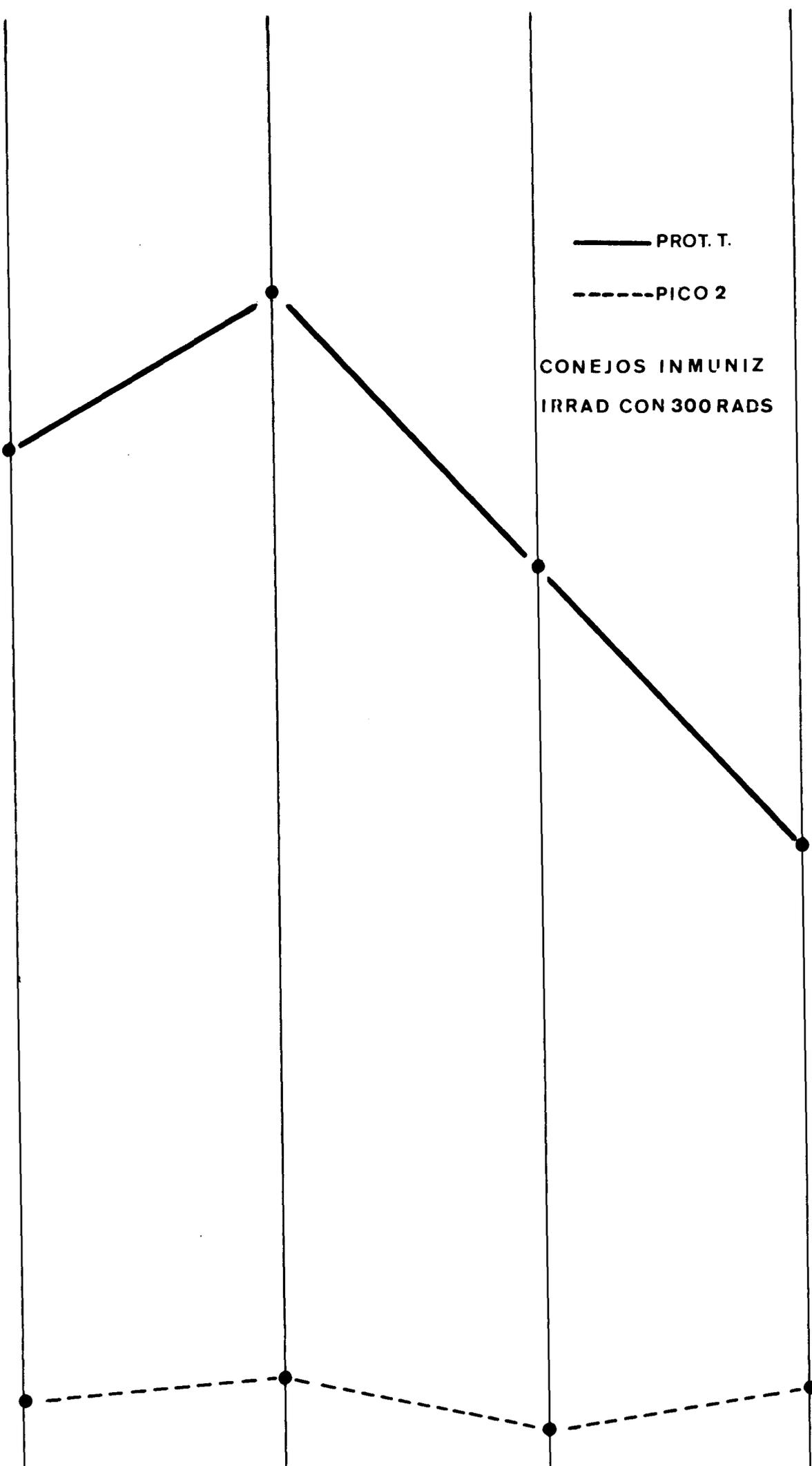
— PROT. T.

- - - PICO 2

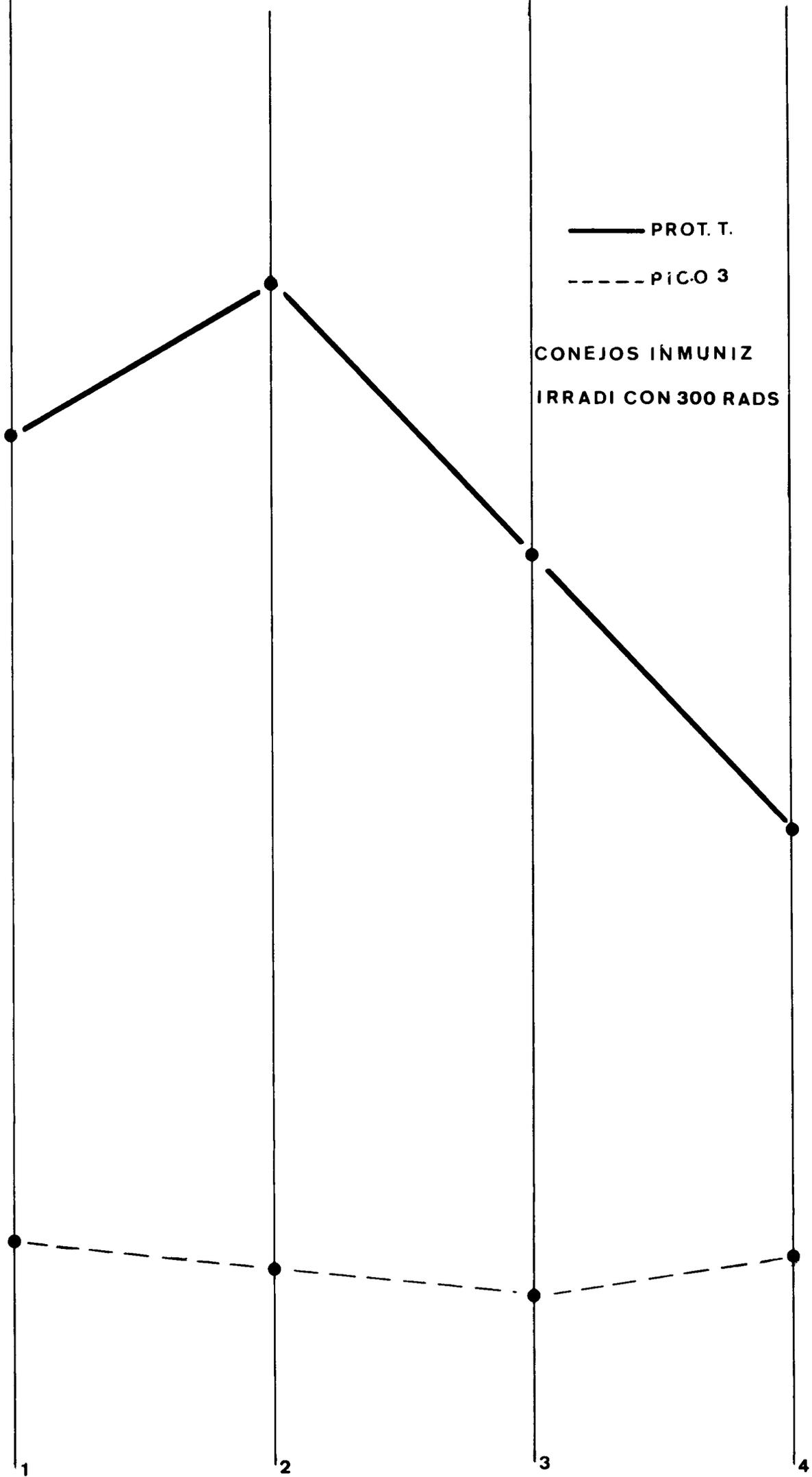
CONEJOS INMUNIZ  
IRRAD CON 300 RADS

3

4







— PROT. T.

- - - PICO 3

CONEJOS INMUNIZ  
IRRADI CON 300 RADS

1

2

3

4

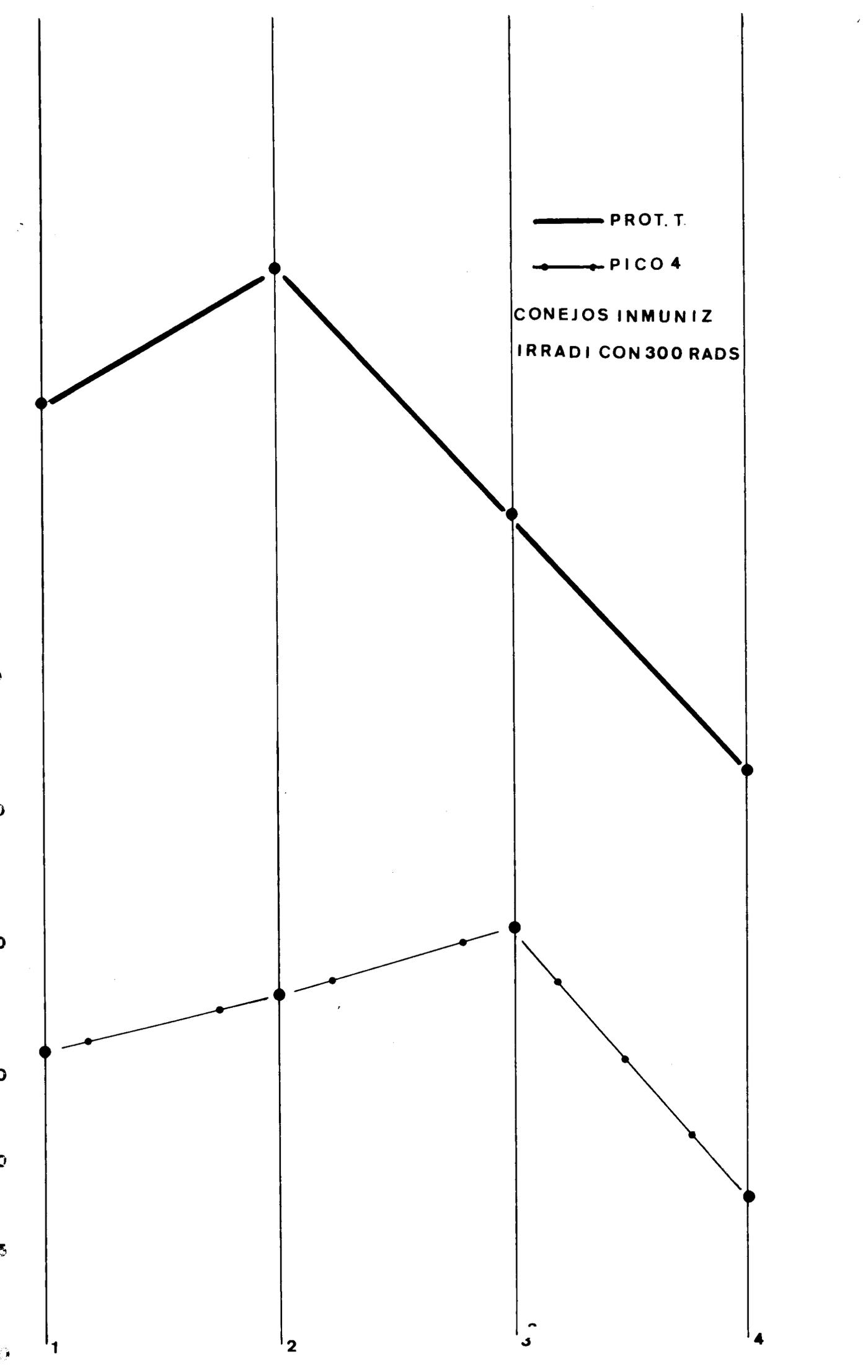
## LECTURA DE LA GRAFICA N° 26

Comportamiento electroforético de los pico n° 4 y proteínas totales en los conejos irradiados con 300 rads e inmunizados según la técnica expuesta en la pág. 94

1ª a 4ª Determinaciones

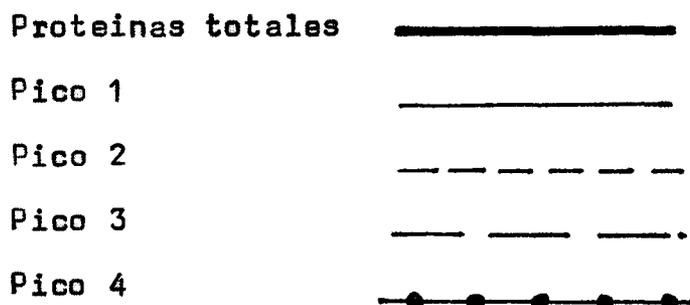
Proteínas totales 

Pico n° 4 



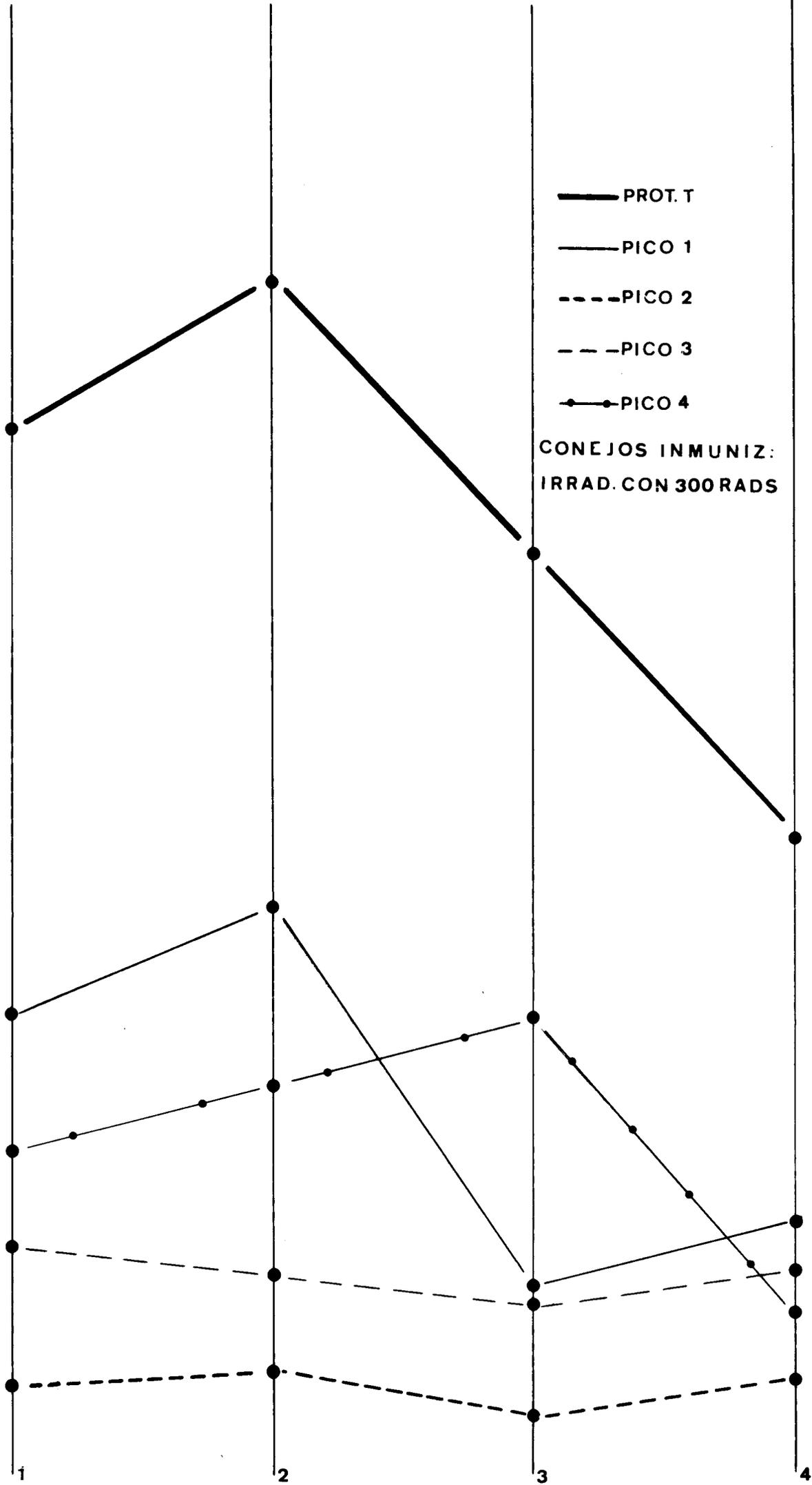
## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 27

Comportamiento electroforético de los conejos irradiados con 300 rads e inmunizados, según técnica expuesta en la pág. 94



Proteínas totales	7.12	8.15	6.25	4.35
Pico 1	44.6	48.03	20.32	39.00
Pico 2	0.92	0.92	0.62	1.42
Pico 3	22.30	17.20	19.20	32.27
Pico 4	31.20	32.40	50.30	24.70

1ª Determinación	. . .	Pre-inmunización
2ª	" . . .	1ª <del>in</del> -inmunización
3ª	" . . .	2ª "
4ª	" . . .	3ª "



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 28

Comportamiento electroforetico de las proteinas totales, cuatro picos, cuatro determinaciones y tres inmunizaciones en los conejos irradiados con 300 rads inmunizados (según técnica expuesta en la pág. 94) y no inmunizados y su comparación con los controles.

Proteinas totales \_\_\_\_\_

1ª Determinación  2ª Determinación — — — —

3ª Determinación ●●●●●● 4ª Determinación // // // //

100%

90

80

70

60

50

40

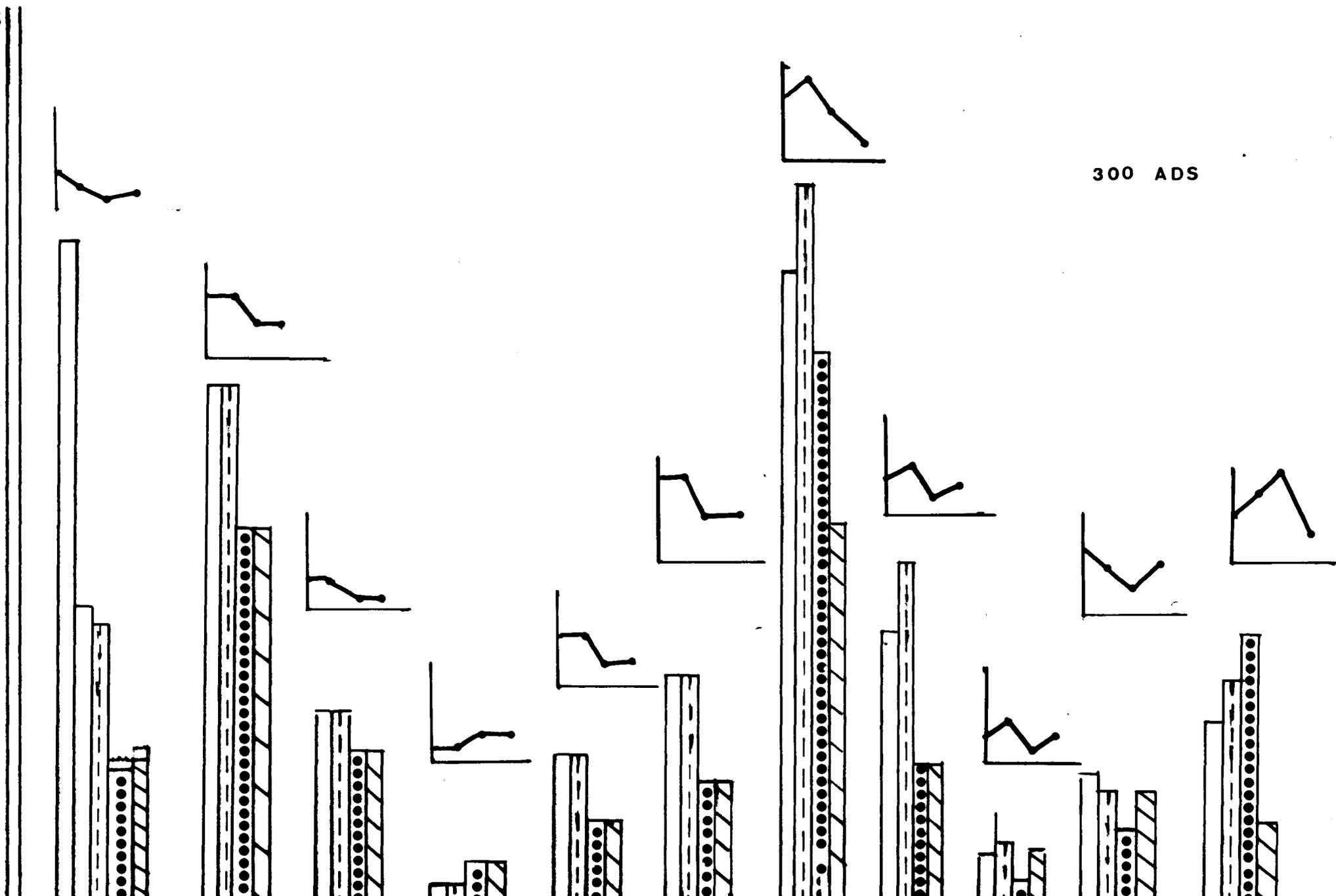
30

20

10

0

300 ADS



## LÈCTURA DE LA GRAFICA N° 29

Comportamiento electroforético de los pico  
n° 1 y proteínas totales en los conejos irradiados  
con 300 rads sin inmunizar.

1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales \_\_\_\_\_

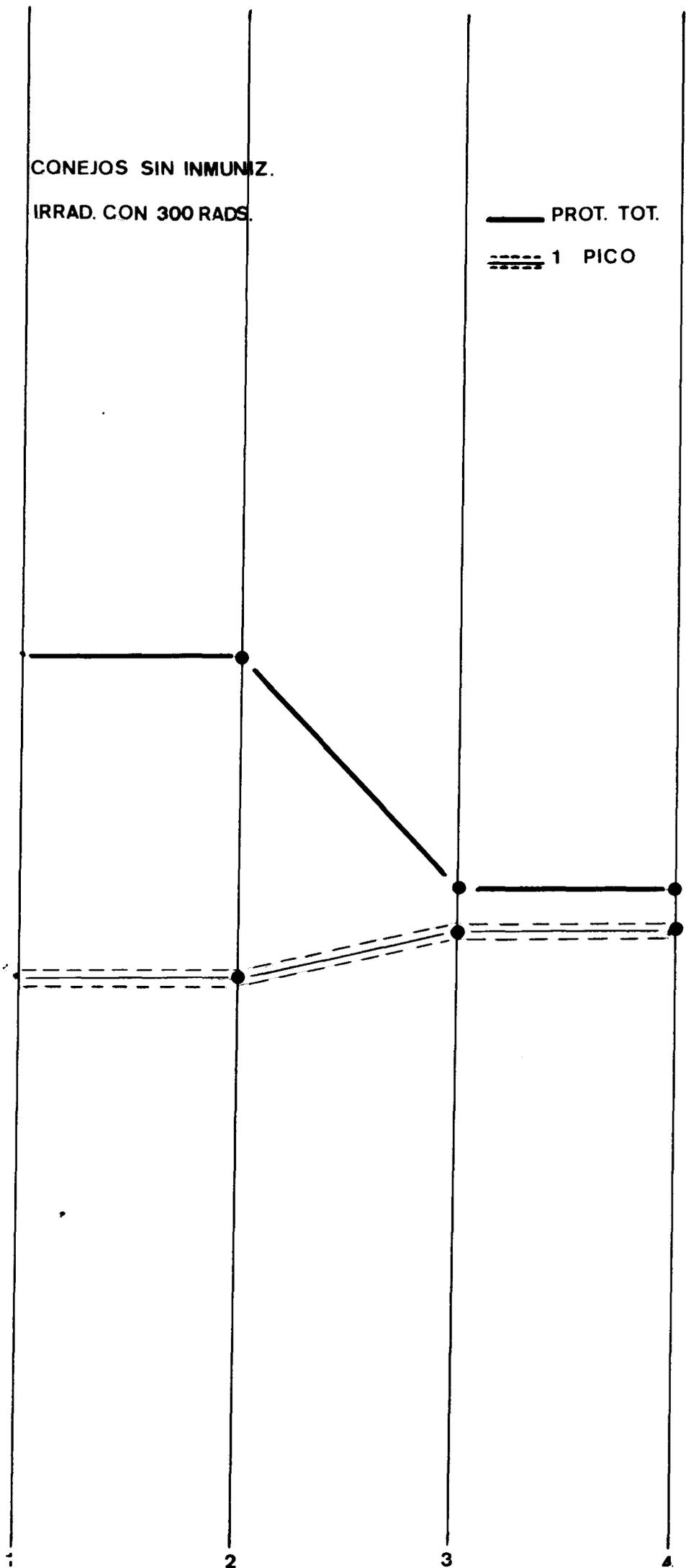
Pico n° 1 \_\_\_\_\_

CONEJOS SIN INMUNIZ.

IRRAD. CON 300 RADS.

— PROT. TOT.

----- 1 PICO



## LECTURA DE LA GRAFICA N° 30

Comportamiento electroforético en los pico  
n° 2 y proteínas totales en los conejos irradiados  
con 300 rads sin inmunizar.

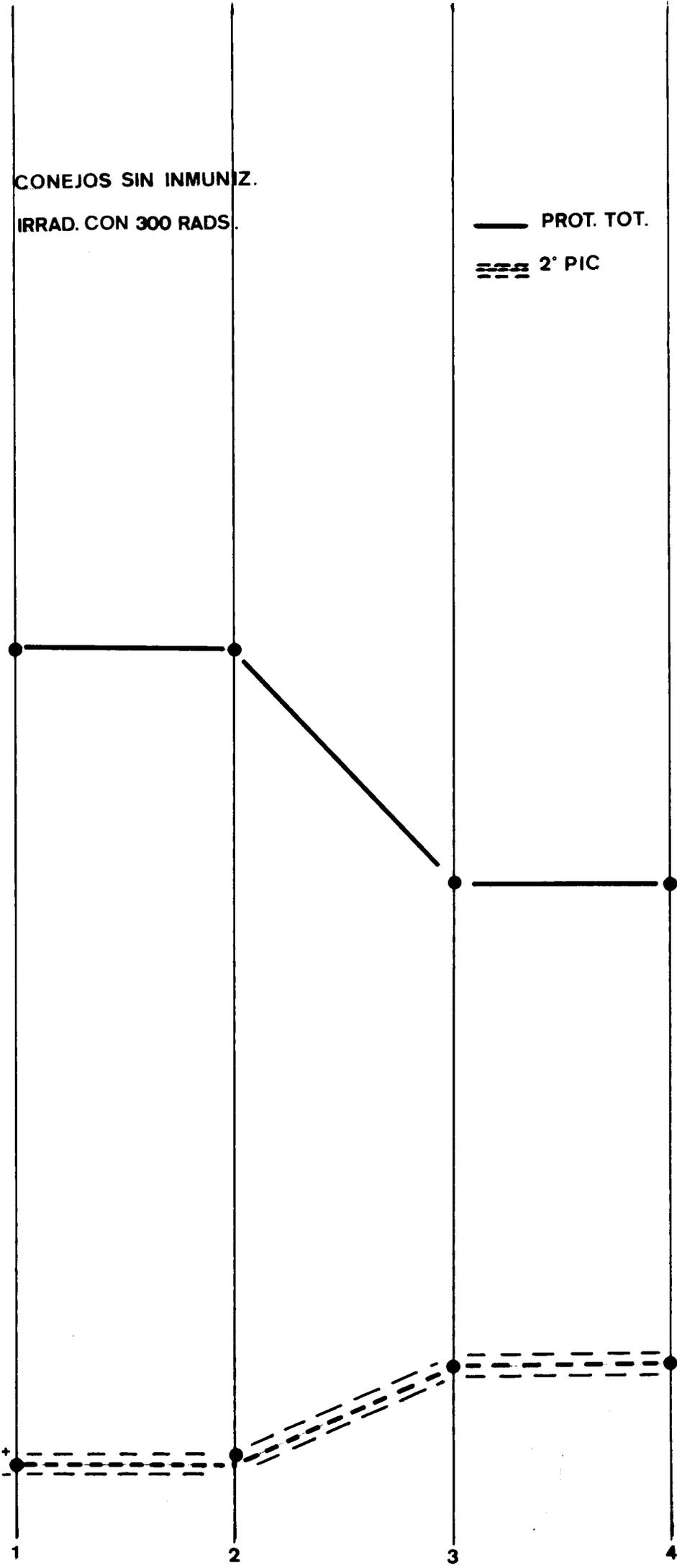
1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales 

Pico n° 2 

CONEJOS SIN INMUNIZ.  
IRRAD. CON 300 RADS.

— PROT. TOT.  
- - - 2° PIC



## LECTURA DE LA GRAFICA N° 31

Comportamiento electroforético de los pico  
n° 3 y proteínas totales en los conejos irradiados  
con 300 rads y sin inmunizar.

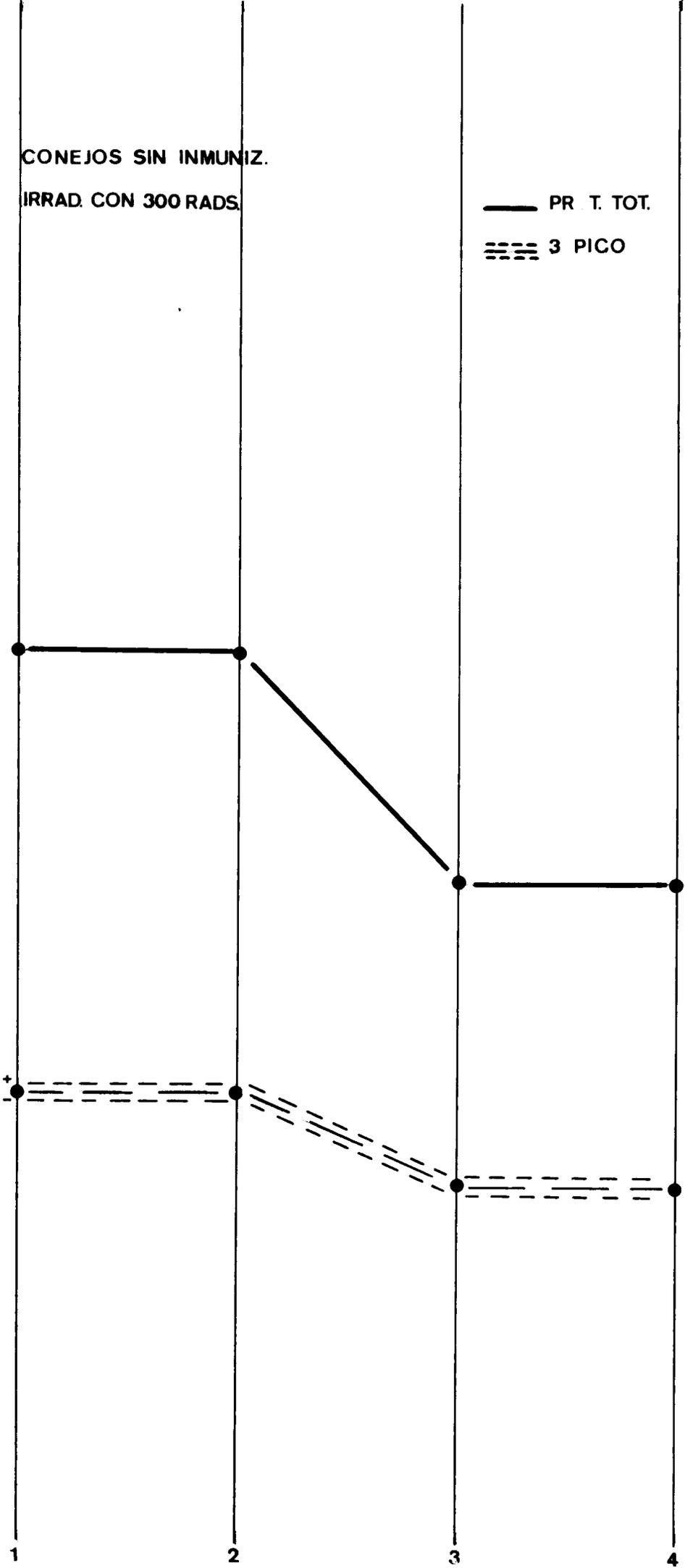
1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales 

Pico n° 3 

CONEJOS SIN INMUNIZ.  
IRRAD. CON 300 RADS.

— PR T. TOT.  
≡≡≡ 3 PICO



## LECTURA DE LA GRÁFICA Nº 31

Comportamiento electroforético de los pico nº 4 y proteínas totales en los conejos irradiados con 300 rads y sin inmunizar.

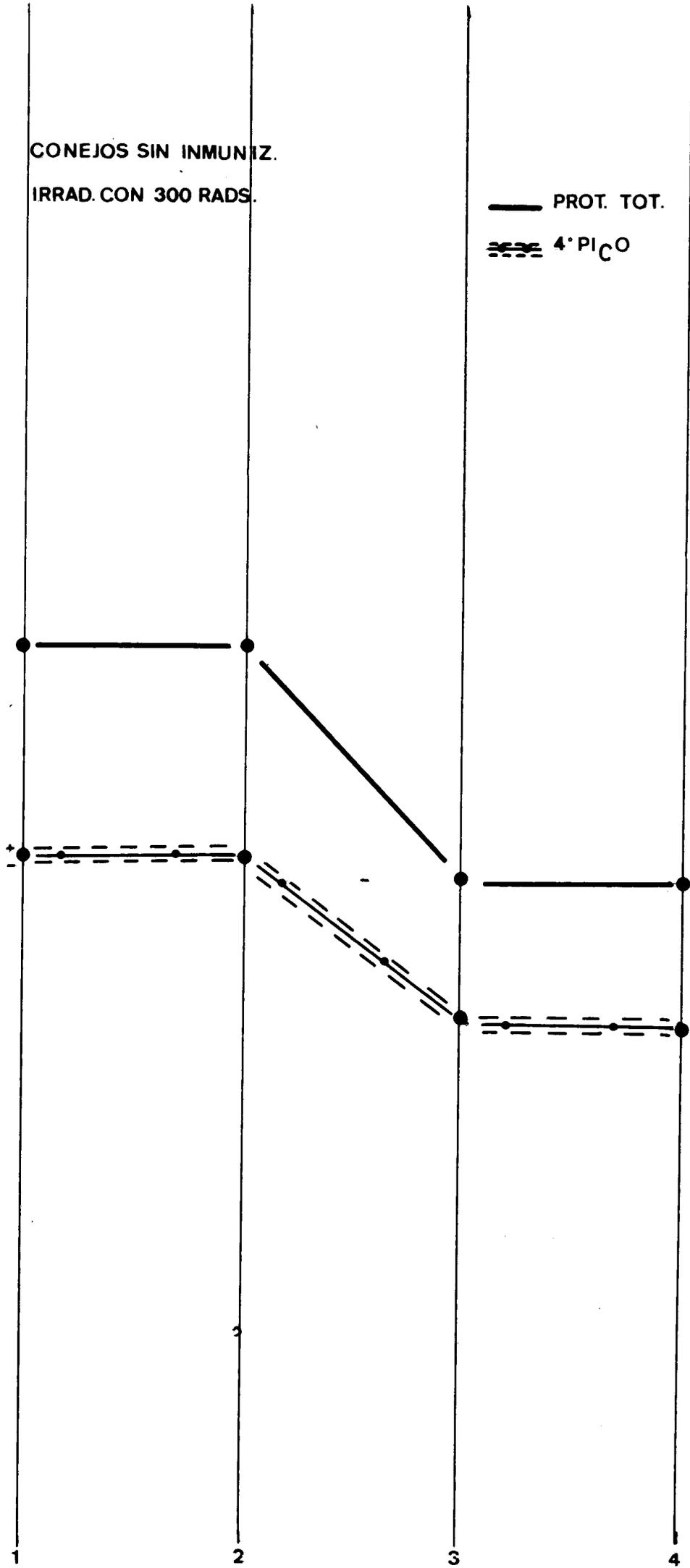
1ª a 4ª Determinaciones

Proteínas totales 

Pico nº 4 

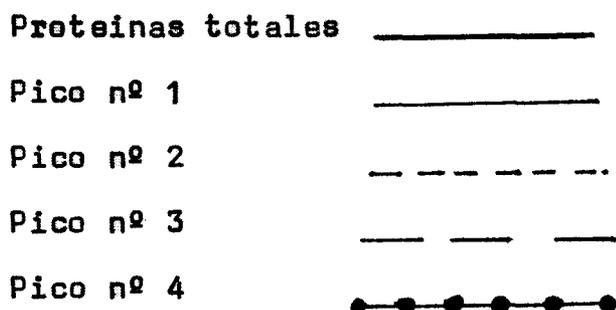
CONEJOS SIN INMUNIZ.  
IRRAD. CON 300 RADS.

— PROT. TOT.  
≡≡≡ 4° PICO



## LECTURA DE LA GRAFICA N° 32

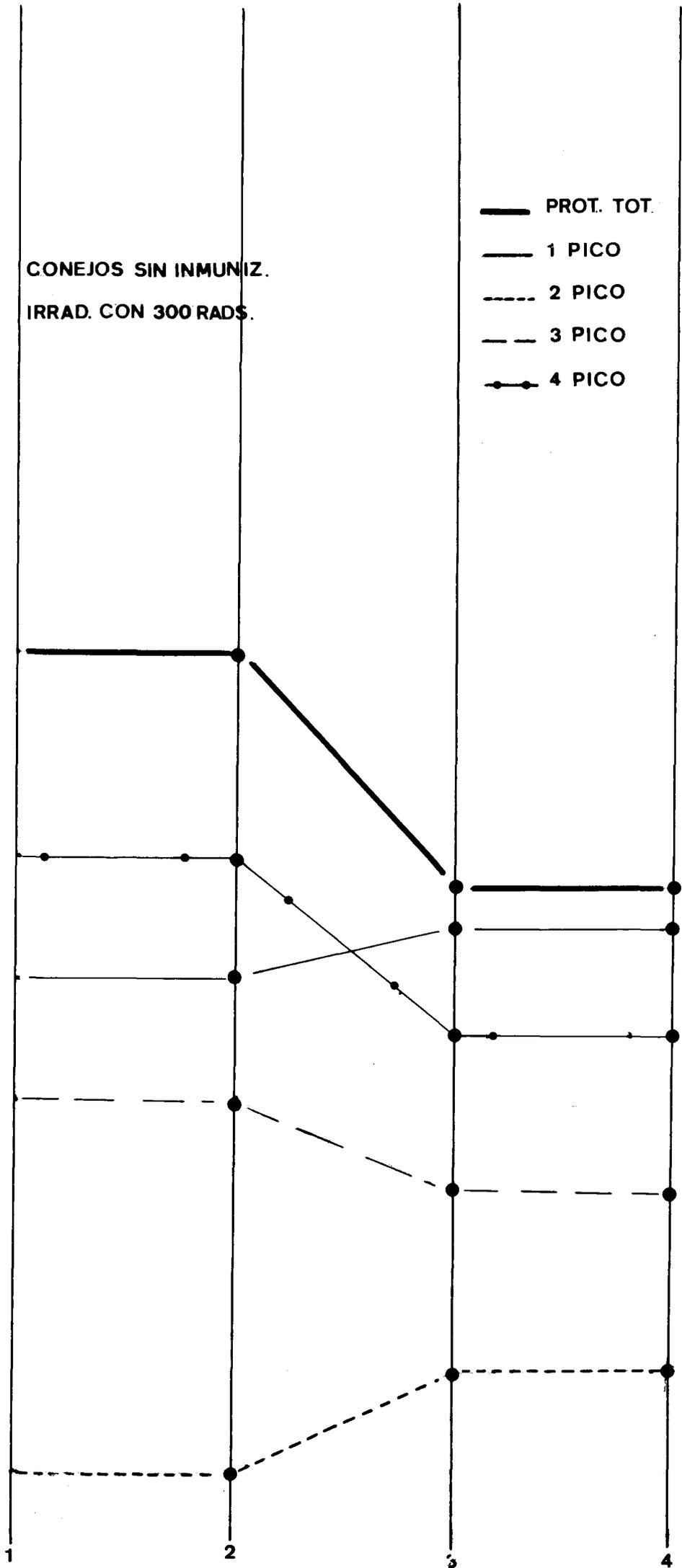
Comportamiento electroforético de los conejos irradiados con 300 rads y no inmunizados.



	1ª Determ.	4ª Determ.
Proteinas Totales	5.85	4.30
Pico 1	37.42 $\pm$ 0.5	40.36
Pico 2	0.48 $\pm$ 0.003	1.15
Pico 3	29.36 $\pm$ 0.32	23.42
Pico 4	44.82 $\pm$ 0.27	33.87

CONEJOS SIN INMUNIZ.  
IRRAD. CON 300 RADS.

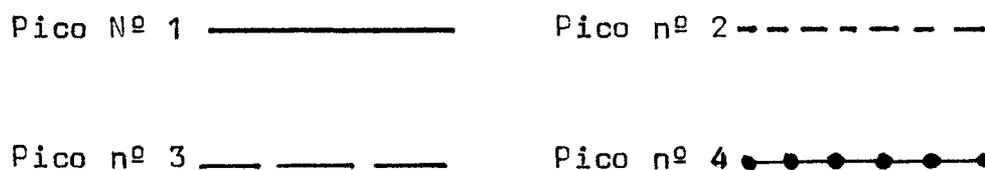
- PROT. TOT.
- 1 PICO
- - - 2 PICO
- - - 3 PICO
- 4 PICO



## LECTURA DE LA GRAFICA N° 33

Comportamiento electroforético de los co  
nejos controles (testigos).

Proteinas Totales —————



Proteinas Totales: 7.42

Pico 1 . . . . .	45.3	-	1.2 %
Pico 2 . . . . .	0.42	-	0.03 %
Pico 3 . . . . .	21.08	-	0.73 %
Pico 4 . . . . .	22.73	-	0.83 %

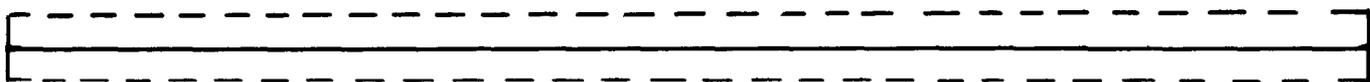
CONEJOS CONTROLES

1 A 4 DETERMINACION

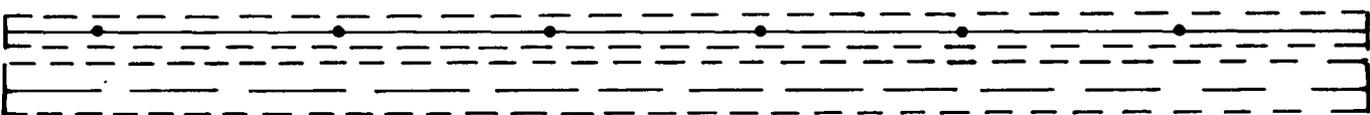
PROT. TOT.

---

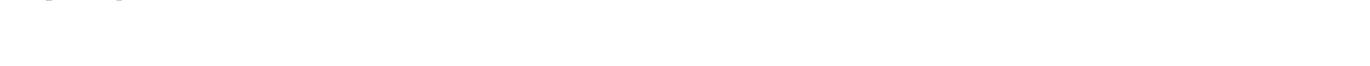
1 PICO



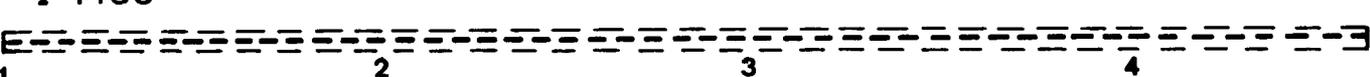
4 PICO



3 PICO



2 PICO



LECTURA DE LA GRAFICA N<sup>o</sup> 34

CURVA DE HEMAGLUTINACION (MIDLEBROOK-DUBOS)  
 CON HEMATIES TANIZADOS Y CONJUGADOS CON ANTIGENO  
 CRISTALINIANO EN CONEJOS SIN IRRADIAR E INMUNIZA  
 DOS SEGUN SECUENCIA YA DESCRITA EN PAG. 94

1<sup>a</sup> Inmunización . . . .

4 días despues . . Título . . 1/2a 1<sup>a</sup> determinación

2<sup>a</sup> Inmunización

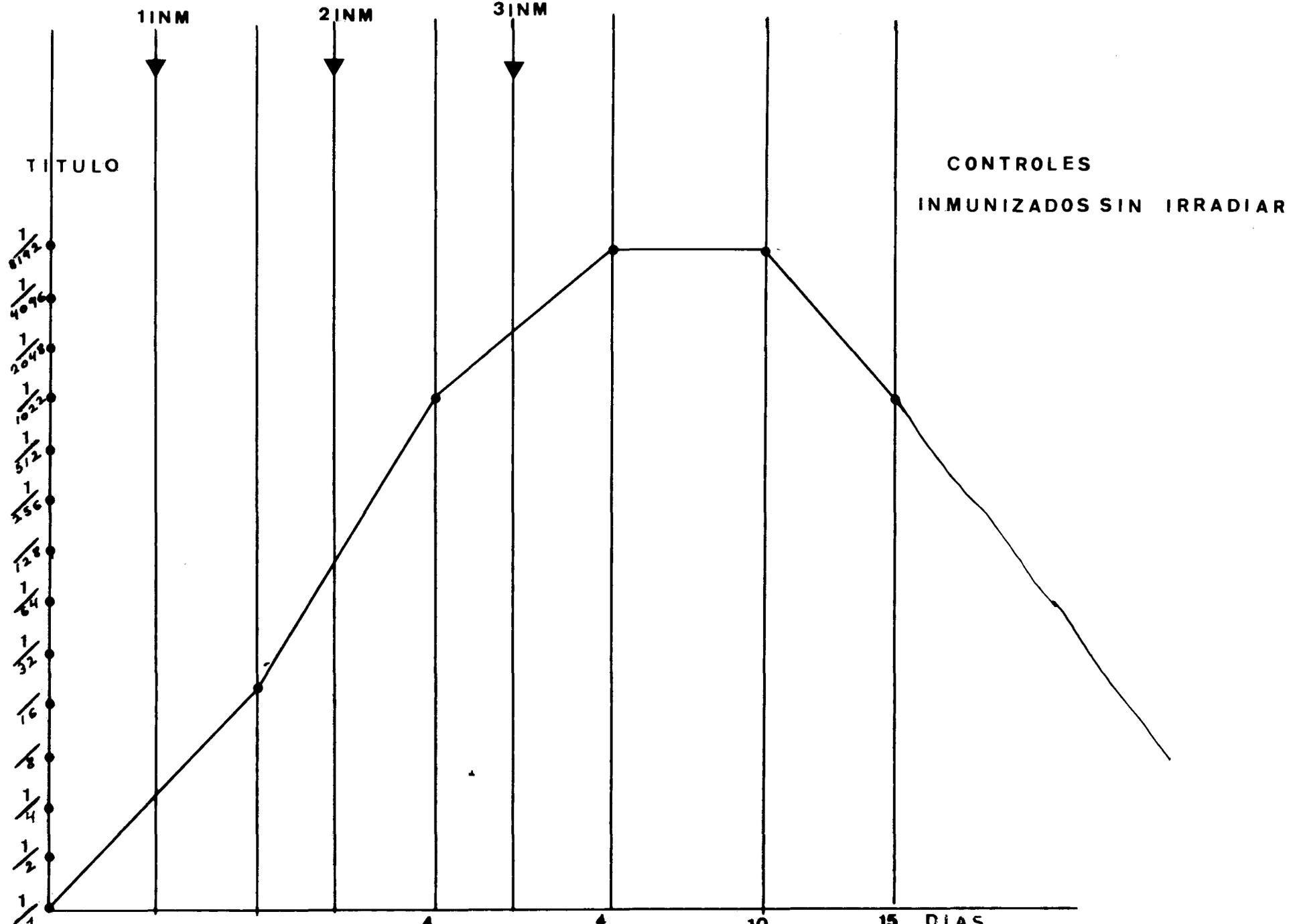
4 días después . . Título . . 1/2a24 2<sup>a</sup>determinación

3<sup>a</sup> Inmunización

4 días después . . Título . . 1/8.192 3<sup>a</sup>determinación

10 días despues. . Título . . 1/8.192 4<sup>a</sup>determinación

15 días despues. . Título . .1/1024 5<sup>a</sup> determinación



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 35

Curva de hemaglutinación (middlebrook-dubos) con hematies tanizados y conjugados con antígeno cristaliniano en conejos conjugados con antígeno cristaliniano en conejos irradiados con 10 rads e inmunizados según secuencia ya descrita en la pag. 94

## 1ª Inmunización

4 días despues . . Título . 1/20. 1ª Determinación

## 2ª Inmunización

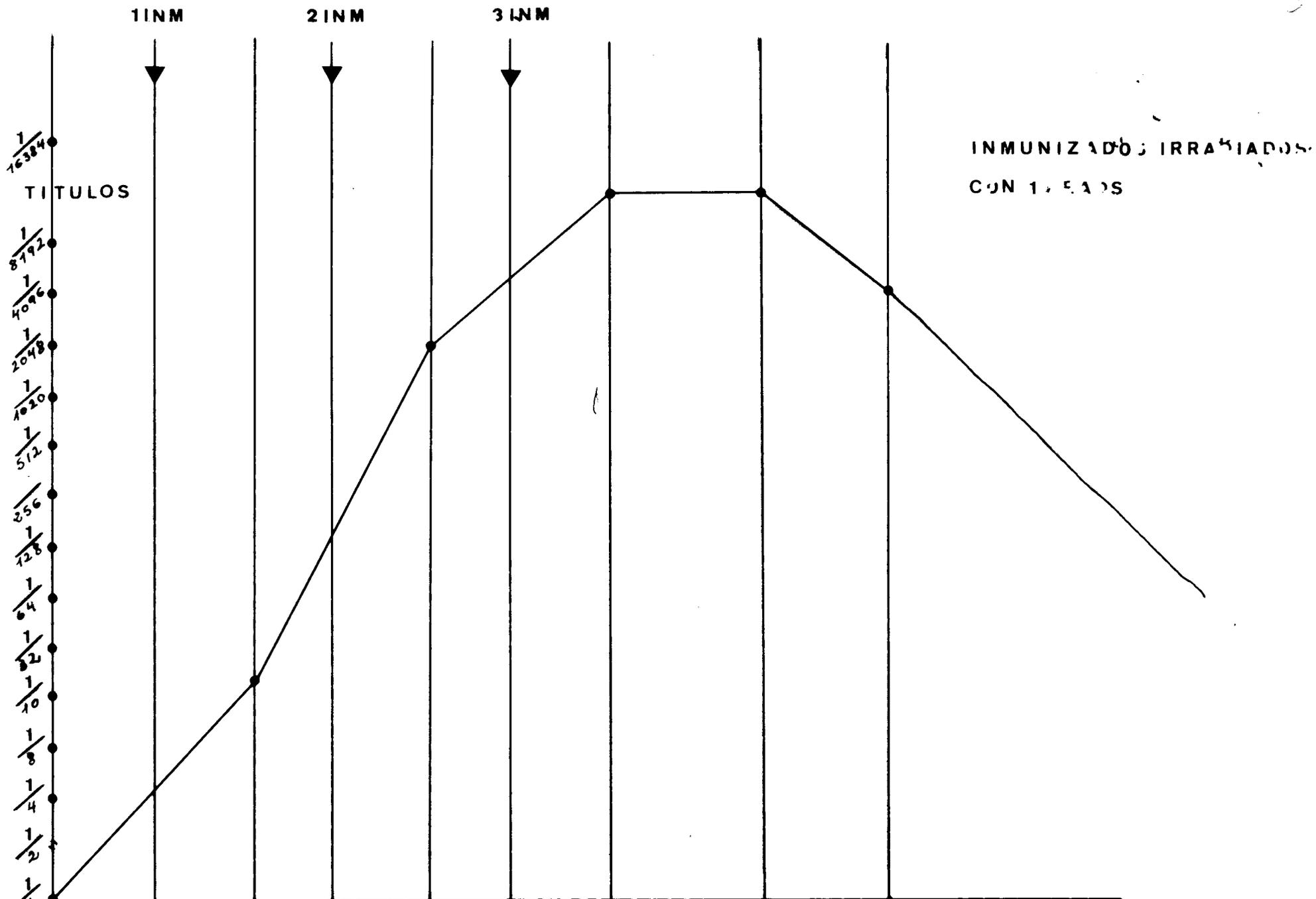
4 días después . . Título . 1/2048. 2ª Determinación

## 3ª Inmunización

4 días después . . Título . 1/16384. 3ª Determinación

10 días después . . Título . 1/16384. 4ª Determinación

15 días después . . Título . 1/4096. 5ª Determinación



## LECTURA DE LA GRAFICA Nº 36

Curva de hemaglutinación middlebrook-dubos) con hematies tanizados y conjugados con antígeno cristaliniario en conejos irradiados con 20 rads e inmunizados según secuencia ya descrita en la pág. 94

1ª Inmunización

4 días después . Título . 1/40 . 1ª Determinación

2ª Inmunización

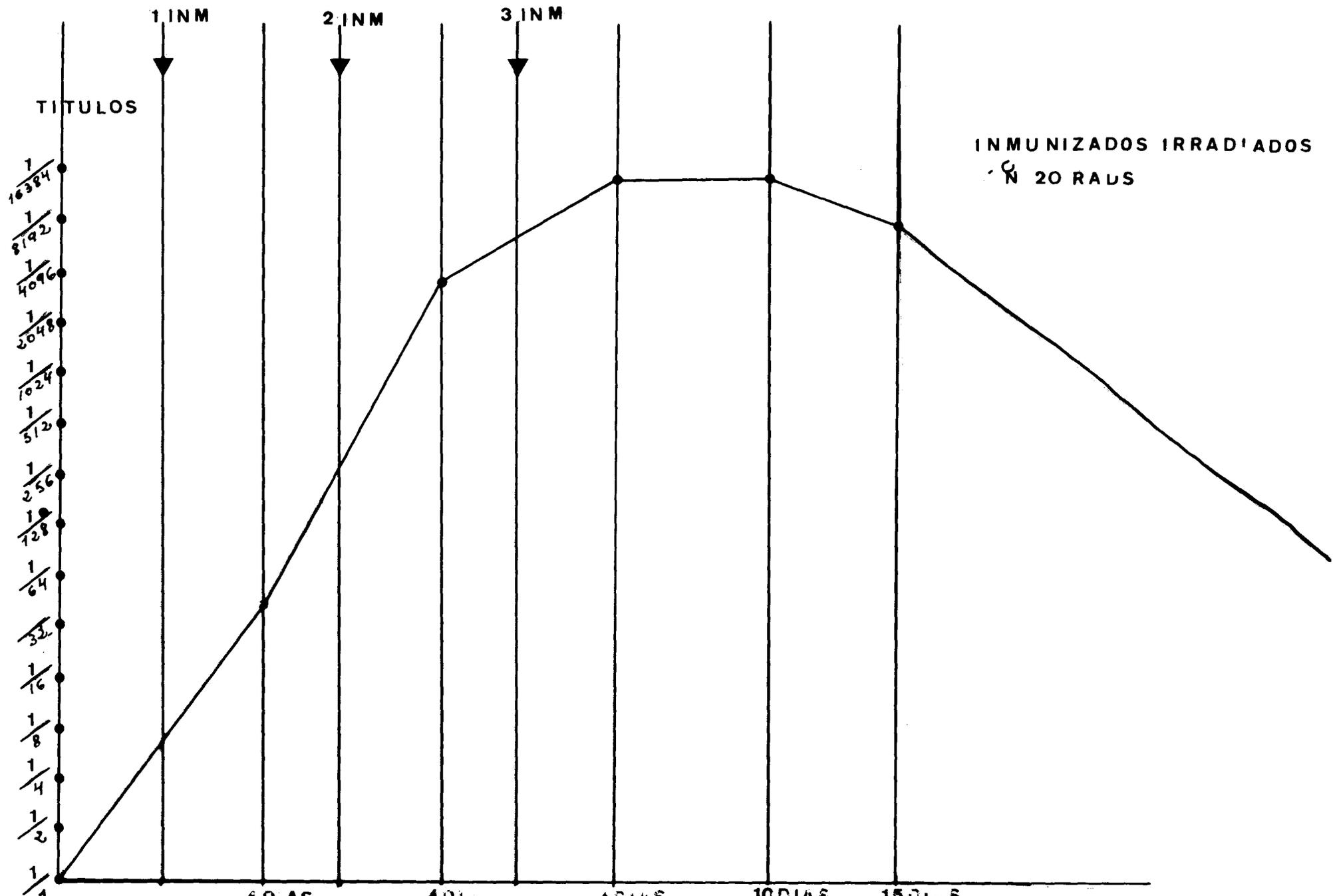
4 días después . Título . 1/4096 . 2ª Determinación

3ª Inmunización

4 días después . Título . 1/16384 . 3ª Determinación

10 días después . Título . 1/16384 . 4ª Determinación

15 días después . Título . 1/8192 . 5ª Determinación



## LECTURA DE LA GRAFICA N° 37

Curva de hemaglutinación (Middlebrook-Dubos) con hematies tanizados y conjugados con antígeno cristaliniario en conejos irradiados con 300 rads e inmunizados según secuencia ya descrita en la pág. 94

## 1ª Inmunización

4 días después . Título .  $1/2$  . 1ª Determinación

## 2ª Inmunización

4 días después . Título .  $1/512$  . 2ª Determinación

## 3ª Inmunización

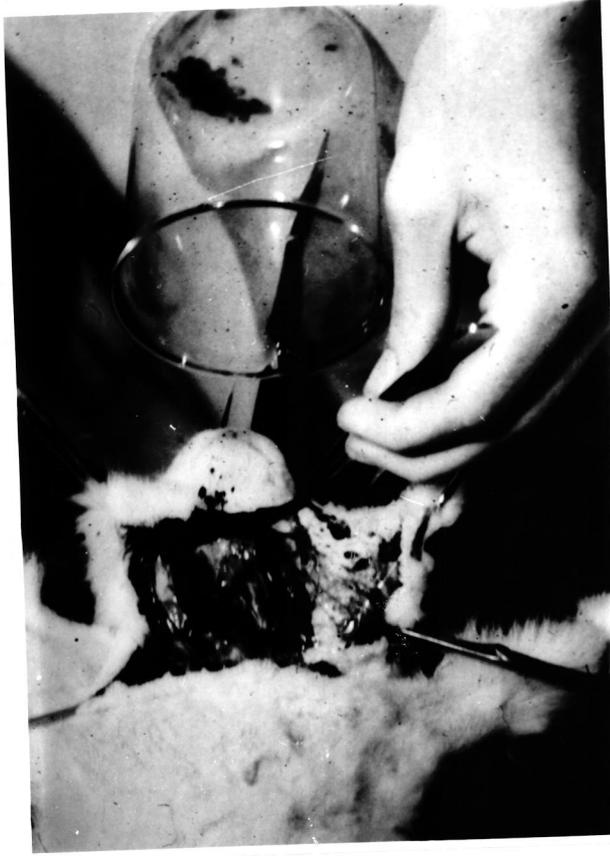
4 días después . Título .  $1/256$  . 3ª Determinación

10 días después . Título .  $1/256$  . 4ª Determinación

15 días después . Título .  $1/128$  . 5ª Determinación



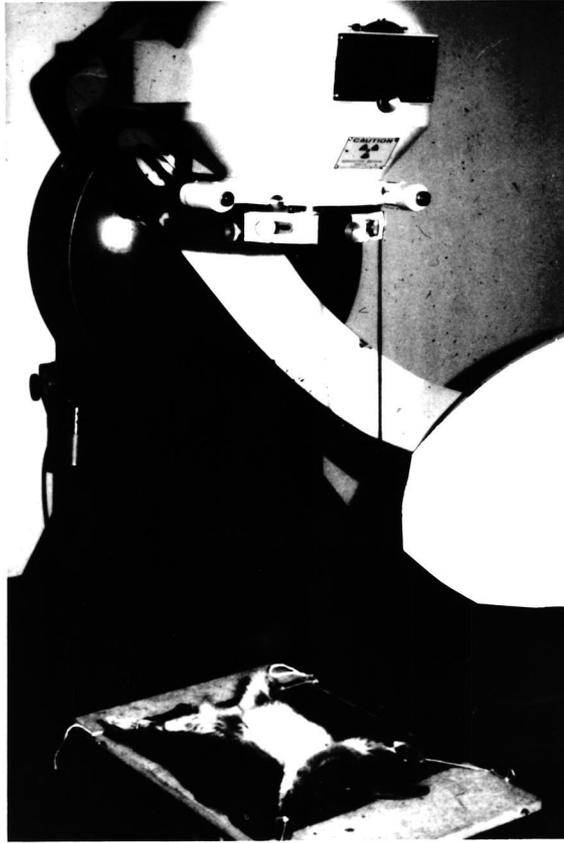
Detalle de la cateterización de la vena marginal del conejo para las muestras en suero al objeto de tener un control de la respuesta en anticuerpos.



Detalle de la disección de vasos cervicales en los animales para la obtención total del suero. Técnica de HCHAYER. Obsérvanse ambas carótidas y yugulares en sendos lados.



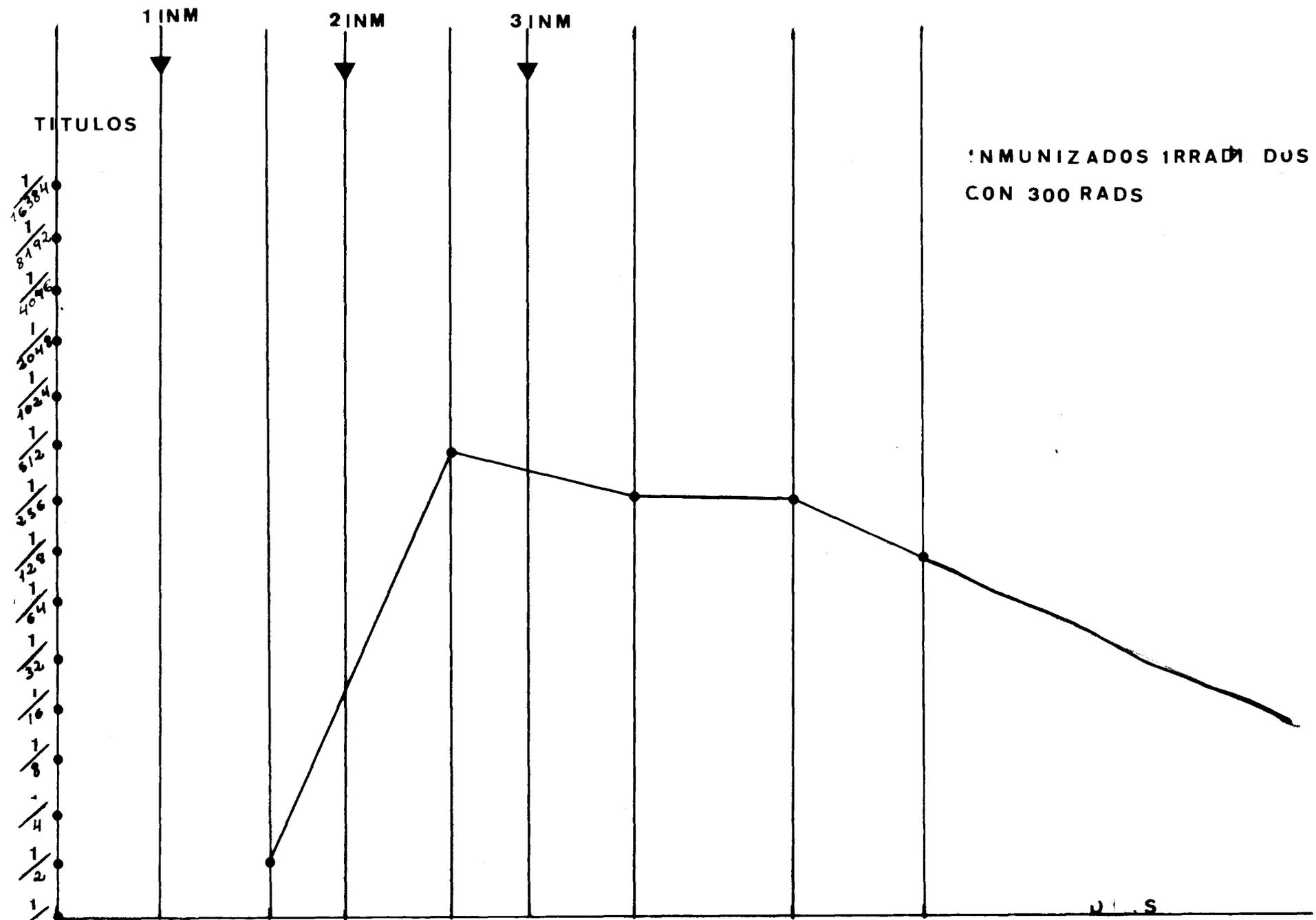
Forma de colocar los animales inmunizados para una irradiación total ventral en Unidad Theratron C-II del Servicio de Telecobaltoterapia de la Facultad de Medicina.



Técnica de irradiación total de los animales mediante Unidad Theratron C-II. Servicio de Radiocobaltoterapia.



Colección de antisueros de los conejos inmunizados, conservados en congelación en tubos cerrados FLUKN.



C A P I T U L O   V I I

COMPORTAMIENTO Y DISCUSION DE LOS  
RESULTADOS

C O M P O R T A M I E N T O

H E M A T I C O C E L U E A R

D E L O S L O T E S

A N I M A L E S C O N T R O L E S

Y E X P E R I M E N T A L E S

Los diferentes grupos de animales controles inmunizados e irradiados con 10 rads, no inmunizados e irradiados con 10 rads, inmunizados e irradiados con 20 rads, no inmunizados e irradiados con 20 rads, Inmunizados e irradiados con 300 rads, no inmunizados e irradiados con 300 rads, así como los controles se han mantenido en sus cifras dentro de los límites de la normalidad pudiendose constatar tan solo una caída de los eritrocitos del orden del 11 al 17 % para los irradiados con 300 rads, tanto en el grupo inmunizado como en el sin inmunizar, pudiendo afirmar por tanto que el fenómeno es debido a la irradiación y no al procesamiento por el mecanismo

mo de inmunización ya descrito. A nivel medular no se ha estudiado el comportamiento de los precursores de la serie roja.

Con respecto al comportamiento de la serie blanca sólo hemos podido constatar una caída del número total de células blancas que no fué superior en ningún caso al 20% de las cifras iniciales, y esto sólo en los animales tratados con una mayor dosis de irradiación no constatando esta caída en los animales de dosis inferiores ni en los controles.

Igualmente que con la serie roja este descenso es totalmente achacable al proceso de irradiación y no al de inmunización toda vez que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Se han observado esporádicamente y no en un grupo sino en animales aislados de un grupo experimental determinado, elevaciones transitorias de la cifra total de leucocitos que han desaparecido al muestreo siguiente. Lo debemos achacar tan solo a la posibilidad de que el animal haya sufrido alguna infección intercurrente. Incluso este fenómeno ha ocurrido esporádicamente al igu

igual en cualquiera de los grupos experimentales, por lo que no podemos hablar tampoco de un estado de carencia o déficit inmunitario, que dejase a los animales en situación de minusvalía frente a las infecciones en general.

### Comportamiento y discusión de los resultados bioquímicos.

Proteínas totales en animales sin inmunizar (efecto de la irradiación solamente).

Proteínas totales en animales irradiados e inmunizados.

Proteínas totales en animales por grupos según dosis de irradiación diferente e inmunizados y no inmunizados.

El procesamiento o la técnica electroforética que describimos en el capítulo de MATERIAL Y METODO arrojó los datos siguientes:

En primer lugar el estudio de las proteínas totales en los controles, se mantuvo, con oscilaciones mínimas dentro de los límites fisiológicos.

Por el contrario tuvimos ocasión de constatar cambios que en ocasiones llegaron hasta un 48 % de las cifras iniciales, en determinados grupos

experimentales, que a continuación analizaremos:

En lo que respecta al comportamiento de las proteínas totales en los tres grupos de irradiación, sin ningún otro procesamiento experimental, observamos independientemente, de las cifras iniciales pretratamiento (pre-irradiación en nuestro caso) como en los animales tratados con 10 rads, la cifra decae entre la primera y la segunda semana, para recuperar los valores iniciales, e incluso algo superiores, a la tercera semana, lo que podría achacarse a un EFECTO REBOTE EN LA FUNCION PROTEICO-POYETICA (THOMPSON, Janes J. y Cols.).

El mismo análisis crítico en el grupo experimental tratado con 20 rads, demuestra la inversión en el comportamiento de la curva, acusando valores superiores entre la primera y segunda semana.

Valores que se mantienen entre la segunda y tercera, para decrecer, aunque en menor porcentaje entre la tercera y cuarta semana. Este efecto, que como veremos a continuación, se encuentra magnificado en el lote experimental de máxima irradiación, ya se hace ostensible con 20 rads, llamando la atención al respecto, el hecho de que variaciones de irradiación tan pequeñas como 10

rada pueden ya tener una repercusión manifiesta en el comportamiento protéico sérico.

Los trabajos publicados al respecto (THOMPSON J. and HOFFMANN, L., 1971), no acusan tales efectos siendo por tanto una vida abierta a la investigación; a la búsqueda de nuevos parámetros de comportamiento bioquímico tras dosis subliminares de irradiación.

En el comportamiento de las proteínas totales de los conejos irradiados con 300 rads, se observa cómo las cifras finales tras un mantenimiento en la primera semana, desciende de forma drástica hasta un 25% de las cifras iniciales, manteniéndose se las semanas sucesivas en estas cifras bajas. (ISHIZAKA, R. y cols., 1972).

Ello sugiere el fenómeno de una LESION GENERALIZADA SOBRE LA FRACCIÓN CELULAR PROTEINOPOYÉTICA

hecho que se corrobora por la circunstancia de que la caída no ocurre de inmediato, sino a partir de la segunda semana.

Ello induce a pensar que este mantenimiento con caída posterior, es debido a que al incidir la radiación sobre la fracción proteínopoyética, la

alteración de la síntesis ocurre gradualmente desde el momento de la irradiación; si bien los defectos sobre las cifras periféricas de proteínas totales se observan como consecuencia de la ruptura del equilibrio anabolismo-catabolismo proteico, o lo que es lo mismo; cesa la síntesis gradualmente en el momento de la irradiación, pero no aumenta el catabolismo protéico, por lo que las cifras iniciales, se mantienen en tanto no son catabolizadas sin una restitución posterior.

En lo que respecta al comportamiento del mismo parámetro en los conejos tratados con 20 rads, este efecto de elevación de las cifras totales a la primera semana, postirradiación se sigue manteniendo; si bien no se observa la caída, propia de la segunda semana constatada en el grupo irradiado con 10 rads, lo que podría interpretarse como un EFFECTO ESTIMULANTE DE LA PROTEINOPOYESIS. (GERALD and EDELMAN, M.).

Observando aquí cómo esta elevación incurre fundamentalmente en la fracción específica, lo mismo que en el grupo anterior; pero el hecho de que la caída de la cuarta fracción (inespecífica) se haya mostrado menor, hace el que prevalesca sobre

las cifras totales el incremento absoluto, sin tener repercusión en la misma relativa del grupo inespecífico antes mencionado.

El grupo irradiado a mayor dosis (300 rads) y procesado según la misma secuencia que los grupos anteriores, muestra ya un índice claro del efecto de dicho tratamiento en el animal; acusando caídas de un 37%; cifra altamente significativa en el total proteico.

El hecho que llama la atención de un incremento relativo, entre la primera y segunda semana para caer a continuación de forma casi vertical, se podría interpretar como la consecuencia de un efecto estimulante, que de por sí representa la antigenización, de un efecto más rápido, que el que traduciría la propia irradiación, por lo que si durante la primera semana, pensamos, aunque disminuya el efecto proteino-poyético general, persiste la tasa de proteínas séricas, aún no catabolizadas y por otra parte se le suma el efecto estimulante de la inmunización primaria, lo que explicaría el incremento inicial.

A partir de la segunda semana disminuyen claramente el total protéico a expensas de una reduc

ción drástica de la fracción proteínopoyética.

La técnica electroforética ya comentada en el epígrafe de MATERIAL Y METODOS, el análisis del total protéico sérico en los distintos grupos experimentales, arrojó los siguientes datos:

Los animales irradiados con 10 rads e inmunizados, según la secuencia ya expuesta en otros capítulos mostraron un descenso durante la primera semana, descenso muy poco manifiesto con reposición durante la segunda semana.

Este análisis en sí, es menos significativo ya que analizamos el comportamiento total de una serie de grupos protéicos séricos en conjunto.

Posteriormente, al analizar las diferentes fracciones tendremos ocasión de comentar, cómo esta disminución mínima de las proteínas totales ocurre a expensas de una caída máxima por parte de las proteínas inespecíficas (UNDERDOWN, J.B., 1971) y que no tiene implicación directa con el proceso de la inmunización y la contraposición con la elevación de la fracción gamma, que si bien, no compensa cuantitativamente la caída del pico inespecífico, si presenta una elevación de más de un 25%. Por tanto, concluimos comentando el hecho de que el total pro

téico disminuye, si bien esta disminución no es expresión de tal o cada uno de los picos que componen el total protéico.

Analizando independientemente cada uno de los grupos en sus fracciones, inmunizadas y sin inmunizar pero ambos grupos sometidos a la misma dosis de irradiación podemos observar como se respeta la caída inicial, si bien, menos aguda en los inmunizados y existiendo una reposición a las cifras normales en la tercera semana. Como consecuencia del incremento de las gammaglobulinas, efecto de la respuesta secundaria, cifra que posteriormente tiende a decaer, como consecuencia del catabolismo, subsecuente a dicha fase anabólica previa.

Este efecto no se observa en los animales no inmunizados, por lo que podemos, dado el efecto homogéneo en cada uno de los animales que componen el grupo achacar dicho fenómeno, al proceso exclusivo de inmunización.

En el grupo siguiente (20 rads), la comparación entre los grupos mismos, y sin inmunizar arroja:

Un trayecto de la curva completamente opuesto

mientras que los animales sin inmunizar, como dijimos anteriormente acusaban una depresión lenta del total protéico en semanas sucesivas; en el grupo inmunizado se observa una elevación de dicho parámetro. Teniendo en cuenta que la respuesta inmune se encuentra elevada, tenemos que evaluar las cifras obtenidas, como el resultado de un factor que tiende a disminuir el total (la irradiación) y otro que tiende a elevarlo a expensa fundamentalmente de la fracción gamma. Como en los animales inmunizados, sin irradiar donde no existe el factor irradiación, que disminuiría dicha fracción gamma. Las cifras totales de gamma-globulina están más bajas que un grupo irradiado, concluimos que la irradiación de 20 rads, al menos en este tipo de animales, con los antígenos utilizados y a esta secuencia de inmunización, ejerce un efecto inmunostimulante.

En el estudio del comportamiento de las proteínas totales de los animales irradiados con 300 rads observamos, cómo el incremento inicial de las proteínas circulantes y de otra a las posibles lesiones celulares, se vá drásticamente disminuidas incluso a valores inferiores de los animales no

inmunizados. Dada la disminución ocurrida en la fracción gamma, al fallar el elemento de respuesta de la antigenización (La irradiación).

Podríamos hablar de un efecto paradójico en cuanto a la respuesta primaria (primera semana) aunque sin poder precisar el fenómeno inductor de dicha respuesta.

Analizando el comportamiento de los picos in dependientemente en cada uno de los grupos, obser vamos cómo el pico número uno presenta una gran elevación, tras la caída inicial de la primera se mana en los animales no inmunizados, efecto que en los animales irradiados a la misma dosis e in munizados se presenta como paradójico, mostrando una elevación a la primera semana cuando los no inmunizados presentaban depresión y por el con trario una depresión a la segunda semana que se in crementa a la tercera semana.

Dado el comportamiento de la fracción gamma (HORNICK, C.L. y cols., 1972), y a la vista de lo anteriormente expuesto con respecto a las proteinas Totales, hemos de pensar en la existencia de un sistema de compensación protéico independiente de la irradiación, siendo esta depresión que aquí

acusamos, compensada con dicha fracción gamma.

El comportamiento del pico segundo, en los dos lotes experimentales, irradiados con 10 rads (inmunizados y sin inmunizar) tiene un comportamiento similar en ambos por lo que pensamos que el proceso secuencial de inmunización no afecta en nada al comportamiento protéico de dicho pico.

El pico tercero de los que analizamos, presenta como se puede observar en la gráfica, un comportamiento similar al pico primero, es decir, una inversión en cuanto al comportamiento en cada uno de los lotes experimentales.

De una parte existe elevación en el pico tercero de los animales no inmunizados, con depresión en los inmunizados, pero es el pico cuarto, donde el efecto de la inmunización se hace más patente.

Observando cómo en los animales irradiados sin inmunizar y como consecuencia, como ya observamos al tratar en conjunto las Proteínas Totales, de la alteración del equilibrio anabolismo-catabolismo protéico, este cuarto pico se muestra decadente en cuanto a la primera semana se refiere; decadencia que permanece en las semanas subsiguientes (BRAM. BELL, W.R., y cols., 1964).

Cuando en este grupo de animales incide el estímulo que supone la antigenización sucesiva; este equilibrio anabolismo-catabolismo se invierte dando como efecto no sólo la desaparición en la caída de la curva-comportamiento, sino por el comportamiento, sino por el contrario apareciendo incluso una elevación. Elevación que aparece muy acentuada durante la segunda semana y que se mantiene en elevación durante la tercera, si bien en un grado menor.

#### 20 Rads

En cuanto al estudio de los cuatro picos analizados en los dos lotes experimentales irradiados con 20 rads, las consecuencias son similares a las vistas en el primer grupo.

Constatamos en los dos primeros picos un comportamiento inverso en la trayectoria-evolución durante las tres semanas, siendo el tercer grupo invariable en ambos lotes (inmunizados y sin inmunizar).

El comportamiento de la fracción gamma, el de mayor interés, en este análisis presenta significación importante, en efecto, en los animales inmunizados, sin irradiar, la elevación propia

(producción de anticuerpos específicos) presenta un ritmo sensiblemente inferior al que mostraban los índices de gamma-globulina en los animales inmunizados a la misma secuencia y bajo la misma dosis, pero irradiados con 20 rads (BRAMBELL, W.R. y cols., 1964).

Por lo que insistimos en resaltar este efecto paradójico que representa la estimulación en la producción de anticuerpos específicos, mediante un tratamiento, que en principio tendría un efecto contrario; es decir, cuando se somete a los animales a una dosis subliminar de irradiación en principio y clasicamente considerada como inmunosupresora constatamos un índice sensiblemente superior de unmunoglobulinas específicas del índice de los animales no irradiados.

### 300 Rads

Como hemos analizado en el apartado correspondiente a las Proteínas Totales, este grupo de animales de experimentación tratados con 300 rads presenta una depresión proteica; depresión que se acusa en todos y cada uno de los picos analizados.

El único punto significativo, es el hecho de

Que a esta dosis de irradiación, la fracción gamma que durante las dos primeras semanas no presenta diferencia en ninguno de ambos lotes, durante la tercera semana se esboza una elevación en el grupo antigenizado lo que se puede interpretar como una disminución del efecto biológico de la irradiación con permanencia del efecto estimulante de la inmunización (THRASHER, S. y Cols., 1971).

Dado el paralelismo existente entre el comportamiento en la respuesta inmune de los animales controles, en relación con la respuesta primaria de la inmunización y el ritmo de elevación de la tercera semana, de este grupo irradiado, en el pico de las gamma-globulinas, podemos decir que la elevación constatada durante dicha tercera semana, la producción de anticuerpos es similar a un efecto primario de inmunización, si bien partiendo de basales más bajas.

Es decir que los animales inmunizados a 300 rads se comportan como los irradiados a dicha dosis sin inmunizar, siendo las modificaciones encontradas achacables, solo al proceso de irradiación.

A partir de la segunda semana, en que el efecto de la irradiación cesa o al menos disminuye en gran cuantía, los animales acusan la tercera inmunización con un efecto primario, es decir, como si las anteriores, no hubiesen ocurrido.

C O N C L U S I O N E S

- 1 - Se ha practicado un ensayo de respuesta inmune tras inmunosupresión inespecífica por irradiación gamma utilizando un panel multiprotéico como antígeno estandarizado.
- 2 - Existe en nuestros lotes experimentales un cambio ostensible en el nivel de proteínas totales séricas que en ocasiones llegó a un 48% de las cifras medias control.
- 3 - La caída standard para el grupo de máxima irradiación fué de un 25% mantenido dos semanas post-irradiación. Ello sugiere un fenómeno lesivo sobre la fracción celular proteínopoyética.
- 4 - El nivel de caída de tales cifras proteico-sé-

- ricas adopta niveles decrecientes en relación a la dosis de irradiación gamma recibida.
- 5 - No hemos podido constatar las diferencias de tal comportamiento protéico en relación con la profundidad del campo irradiado.
  - 6 - Los efectos de la irradiación sobre las cifras totales de proteínas séricas, con cierta proporcionalidad a la dosis de irradiación, como hemos indicado en una conclusión anterior, se muestra a partir del día 15 post-irradiación en adelante, siendo un efecto retardado, ya que se hace ostensible al disminuir las proteínas sericas existentes por el catabolismo normal sin un efecto proteino poyético acorde con dicho proceso catabólico.
  - 7 - El grupo tratado con mínima dosis de irradiación gamma acusa un moderado aumento con respecto a los controles, pudiendose concluir que en nuestros lotes experimentales los animales reaccionaron como si se tratase de un efecto estimulante de la proteínopoyesis, hecho constatado igualmente por GERALD y EDELMAN.
  - 8 - Cuando los animales irradiados se encuentran en un periodo de inmunización, esta caída es

- proporcionalmente menor que si no se han anti  
genizado.
- 9 - La disminución en el descenso de las cifras totales se compensa con un incremento relativo de la fracción gamma.
  - 10 - Los niveles de la fracción gamma a dosis subliminales de 20 rads se encuentran aumentadas en los animales inmunizados y así irradiados por lo que tenemos que concluir que al menos en es  
te tipo de animales y con tal dosis de irradia  
ción aparece un efecto inmunoestimulante.
  - 11 - Los animales inmunizados sin irradiar sufren una elevación de su fracción gamma sensiblemente inferior al mismo grupo de animales, idéntica  
mente antigenizados, pero irradiados con 20 rads hecho apuntado por BRAMBELL y Cols.
  - 12 - El lote experimental irradiado a 300 rads e in  
munizado se comporta sensiblemente igual al mis  
mo grupo sin inmunizar, siendo las alteraciones encontradas con respecto a los grupos centrales sólo achacable al proceso de irradiación.
  - 13 - Significativo es el hecho de que a partir de la tercera  
semana postirradiación a 300 rads, cuán  
do continúan de modo periódico las secuencias d

- de antigenización los animales responden a la cuarta estimulación antigénica, con tipo de respuesta en todo similar a la conocida como primaria desde el punto de vista inmunológico.
- 14 - El comportamiento con la técnica de hemaglutinación específica, frente a hematíes tanizados conjugados-proteínas cristalinas, producen un título de hemaglutinación sensiblemente pe recido en los lotes experimentales, centrales e irradiados con 10 y 20 rads.
- 15 - En el grupo antigenizado e irradiado con 300 rads no aparece título estensible hasta el día 19 postprimera inmunización.
- 16 - En el grupo anteriormente citado el comportamiento no sólo es variable con respecto a los centrales en el tiempo de aparición del título, sino en la cuantía del título mismo de he maglutinación.
- Manteniéndose siempre en nuestro caso, por ba jo de al menos 8 puntos de dilución respecto de los centrales (de títulos 1/256 a títulos 1/16.389) en los centrales.
- 17 - Al menos en conejos, y en los grupos ex perimentales que hemos tratado es más significativo

el grado de especificidad de anticuerpo que la cifra misma de inmunoglobulinas. Ello hace pensar que la alteración producida por la irradiación se podría ver a dos niveles diferentes; de una parte el déficit cuantitativo de globulinas ya acusado y de otra parte el déficit biológico (cualitativo), que representaría la falta de conjugación específica de dichas inmunoglobulinas con los antígenos que teóricamente provocaron su síntesis.

B I B L I O G R A F I A

ANDERSON, R.E. and DOUGHTY, W.E.: Irradiation and the immune response with particular reference to tMycic dependent mechanism. Front. Radiation Ther. Onc. 6: 445-458. 1972

BELLANTI A. JOSEPH: Inmunología. Edit. Interamericana S.A. Buenos Aires, 1972

BELLOCH, V. - CABALLE-ZARAGOZA, J.R.: Manual de Terapeutica Física y Radiología. Pág. 438-450. Valencia, 1968.

BERKUM, D.W.VAN and VOS O.: Immunological aspects of homo and heterologous bone marrow transplantation in irradiated animals. J.C.Comp. Physiol. 50 suppl. 1: 139-156., 1957

BURNET SIR MACFARLANE: Cellular immunology. Publ. Melbourne University Press., 1971

BRAMBELL W.R.F.R.S. HEMINGS, W.A.: A theoretical model of  $\gamma$ -globulin catabolism *Nature*. 203:1352-1355., 1964.

CAMBELL D.H. and GARVEY J.S.: The fate of foreign antigen and speculations as to its role in immune mechanisms. *Lab. Inv.* 10:1126., 1961

CRONKITE E.P. and BOND V.P.: Radiation injury in man. Edit. Charles C. Thomas Springfield III., 1960.

CLARK J.R. BLEE RANDOLPH and RUSSEL W. CUMPLEY B.A. M.A.phD.: The year book of cancer. Edit. N.Y., 1971

CARWRIGHT, G.T.: El laboratorio en el diagnóstico hematológico. Edit. Científico Médica. Barcelona, 1973.

DAGUET, G.L.: Elements d'immunologie medicale. Edit. Flammarion-Medicine-Science., 1972

DRAPER, L.R.: The effects of prolonged irradiation on the immune response in the effects of ionizing radiation on immune processes. Edit. Leone, C.A.

221-224 Geredon and Breach N.Y., 1962

MAKIND DAN T.: Advances in Radiation Immunology.

Fred. Prec. 19:586., 1960

DETTMAN;P.M., DEMIS,A.J. and STORAASLI,J.P.: The radiation tolerance of lymphoid tissue. Front. Radiat. Ther. Onc. 6:428-444., 1972

KLAUS S. EICHMANN M.D. LACKLAN HENRY, LEROY HOOD M.D. and KRAUSE RICHARD M.: Induction of rabbit antibody with molecular uniformity after immunisation with group C streptococci. The Rockefeller University N.Y. and the National Cancer Institute J. exp. Med. 131:207-221., 1970

EDELMAN GERARD M.: Antibody structure and molecular immunology. The Rockefeller University, N.Y. Health Service A.I. 09273 and A.M.04256 Annal N.Y. Academic of Sciences 4-25., 1973

EDELMAN G.M., BRUCE, A., DUNNIGHAM, W. EINAR GALL, GOTTELIEG P.D.- HAUSSER R. and WAXDAL J.: The covalent structure of an entire  $\gamma$ G immunoglobulin molecule Biochemistry. 63:78-85., 1969.

FÄBRİKANT J.I.: The effect of continuous irradiation in Pathology of irradiation. Berdjis C.C. Edit. 50-85 Willians and Wilkins. Baltimore.,1971

GENGOZIAN N. and MAKINODAN T.: Relation of primary antigen injection to time of irradiation on antibody production in mince. J. Immunolog. 80:189-197 1958.

GOWANS J.L. and Mc GREGOR D.D.: The inmunological activities of lymphocytes. Prog. Allergy 9:1-78., 1965

INGEGERD, HELITROM and HELITROM KARL EARL,E.: Colony inhibition studies on blecking and non blecking serum effects on cellular immunity to sarcomas Int. J.Cancer 5: 195-201., 1970

OLOV HANS SJOGAREN and WARNER A. GLENN: Serum factors in tumor-free patients cancelling the blocking of cell-mediated tumor immunity. In.J.Cancer 8., 185-191., 1971

HELLSTROM,K.E. SJGREN H.MATHE and SMITH: Progress in inmunology.Ed. Amos B. Academic Press N.Y.,1971

HORNICK L. CAROLE and KARUSH FRED: Antibody Affinity III. The role of multivalence. Immunochemistry 9 :325-340., 1972

HAIMOVICH JOSEPH and EISEN HERMAN, N.: Combining sites of immunoglobulins that built the 2.4 dinitrophenil (DNP) Group specifically. World Health Organization and the Ford Foundation. 352-361., 1972

HUMPHREY J. L. and WHITE B. G.: Inmunología Médica. Edit. Toray. S.A., Barcelona., 1972

ISHIZAKA TERUKO- ISHIZAKA KIMISHIGE-ORANGE and AUSTEN FRANK: Farmacology inhibition of the antigen-induced releass of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from monkey tissues mediated by human Iq E. The journal of Immunology 106: 1267-1273., 1971

ISHIZAKA R. and ISHIZAKA T.: Ige and reaginic hiper-sensibility. Part. VI: Immunoglobulism Disease-Department of Medicine and Microbiology. The J. Hopking University School of Medicine. Baltimore Md. 21239: 443-456., 1972

ISHIZAKA T.-ISHIZAKA KIMISHI-G. JOHNSON and BENNICH HANS: Histamine release from human leucocytes by antigen antibody. The journal of immunology: 884-8892., 1968

INCHESTER R.J. y KUNKEL: Ions of DLG with various and amenic macromolecules. Immunology 107: 309-310 1971

DIRECCION CIENTIFICA LABORATORIOS SEMAR S.A.: Inmunología . Vols. 1,2,y 3: Nociones teóricas y prácticas. Edit. Lab. SEMAR S.A. Barcelona, 1971

JOHNSON JONAS M.D. EINHORN M.D.; FAGRAEUS ASTRID M.D. and EINMORN J.: Organ antibodies after local irradiation. Radiology: 90 536-540., 1968

KAMINSKI M.: The analysis on the antigenic structure of protein molecules. Prog. Allery, 9:79-, 1965

MELCHERS FRITZ: Actualizaciones de Inmunología-Max Plank für Moleculare Genetik de Berlin. Reseña Médica Cultural. 3:31-40., 1971

McKENNA J.M. and KINGSLEY M. STEVENS: The early phase of the antibody response. Jeun. Immunology. 78:311., 1957

KAMPEN E.J. and ZIJILSTRA: Standardization of hemoglobinometry. Clin. Chim. Acta 6:538., 1961

LINDOP P.J. and ROBLATT J.: Long-term effects of single whole body exposure of mice to ionizing radiations. Life Shortening Prac. Rey Sec. 154:332-349., 1961

LEONE C.A.: The effects of ionizing Radiation on immune processes. Gordon and Breach N.Y., 1962

MAKINODAN T. FRIEDBERG B.H. TOLBERT M.G. and GENGOZIAN N.: Relation of secondary antigen injection to time of irradiation on antibody production in mice. J. Immunology 83:184-188., 1959

MARSHAK R.H. HAZZI CHARLES: Small bowel in immunoglobulin deficiency syndromes. Am.J.Roentgenology 122:227-240

MALCOLM R.MAC KENCIE, GREEVY and HEH NONA: The Inte

action of human IgM and CLq. The Journal of Immunology 106:65-68., 1971

MIKLEN H.S. and LOUIT J.F.: Tissue Grafting and Radiation. Academic Press N.Y. 66., 1949

MELCHERS F.: La síntesis de los anticuerpos. Reseña. 1 y 2: 31-40., 1973

MAKINODAN T.: Advances in Radiation Immunology. Fed. Proc. 19:586-589., 1960

NOSSAL G.J.V.-WARNER N.L. and NEATHER LEWIS: Incidence of celled simultaneously secreting IgM and IgG antibody to Sheep erythrocytes. Cellular immunology 2:41-43., 1971

NOSSAL G.J.V.: Bullat and target-an analysis of antigenic stimulation. J. Invest. Derm.48:358-369., 1967

OLD L.J. BOYSE E.A.; GOERGING G. GETTEN H.F.: Serological approaches to the study of cancer in animals and man.

PAPHENEIN A.: Kurze technologische Zusazumenstellung  
Fäbungsverschriften uns mit Panchrom. Folia Naeremat  
12: 178., 1911

QUIOCHO FLORANTE A. and LIPSCOMB W.N.: Carboxpepti-  
dase A..a protein and enzime. Department of Chemis  
try Howard University. Cambridge. Massachussets.  
1-75

RUSSEL S. WEISSUR, MIRVIK Q.N. and PEARSALL NANCY:  
Inmunoloqía. Edit. Interamer. S.A.N.Y., 1971

ROITT I.: Ensayos de inmunoloqía experimental. Edit.  
Jim. Barcelona., 1974

ROSENSTEIN ROBERT W. MUSSON R. A. KUNISBERG W.H. and  
RICHARD FRANK F.: Contact region for dinitrophenyl  
and menadrome hapten man immunoglobulyn binding more  
than one antigen. Pric. Nat. Acad. Sei. U.S.A. 69:877-  
881., 1972

ROTIT IVAN: Inmunoloqía esencial. Ed. Jims. Barcelona  
1972.

STONER R.D. and HALE W.M.: Radiation effects on primary and secondary antibody response in the effect of ionizing radiation on immune processes. Leone C. A. Edit. Gordon and Breach N.Y., 183-219., 1962

STRUMIA M.M.SAMPLE and HART E.D.: A improved micro microhematocrit method. Americ.J.Clin.Path.24:1016  
1954

SAMBERG A.J.OLIVEIRA B. and OSLER A.G.: Two complement interaction sites in guinea pig immunoglobulins.  
Journal of immunology. 106:282-313., 1971

SNELL G.D. WINN H.J. and KANDUTSCH A.A.: A quantitative study of cellular immunity. Journal Immunology  
87: 1-61., 1965

STEPHEN C.E. BRONSON PAUL M. and VAN OSS CAREL J.:  
The valency of IgM and rabbit anti-dextran antibody as a function of the size of dextran molecule.  
Immunochemistry 9:273-288., 1972

SACHER G.A. and GRAMN D.: Survival of mice under duration-of-life exposure to gamma rays. I the do-

Stage-survival relation and the lethality function.

J. Nat. Cancer Inst. 32:227-321., 1973

TALIAFERRO W.H. TALIAFERRO I.G and JAROSLOW B.N.:  
Radiation and immune mechanisms. Academic Press.

N.Y., 1964

TALIAFERRO W.H. and TALIAFERRO I.G.:Further studies in the radiosensitive stages in hemolysin formation.

J. Infect. Dis. 95:134-141., 1954

TALIAFERRO W.H. and TALIAFERRO I.B.: Effect of X-Rays on hemolysin formation following various immunization and irradiation procedures. J. Infect.

Dis. 95:117-133., 1954

THOMPSON JAMES J. and HOFFMAN LOUIS G.: Homotropic cooperative building of the first component of guinea pig complement to rabbit IgG erythrocyte complex

A possible allosteric effect. Proc. Nat. Sci. U.S.A.

68:2730-2733., 1971

THRASHER SUSAN G. and COHEN STANLEY: Studies of the

mecanism of binding chemically modification cy-  
tophylic antibodies to macrofaques. Journal of In-  
munology. 107:672-677., 1971

UPTON A.C. CONTE F.P. HURST G.S. and MILLS W.A.:  
The relative biological effectiveness of fast neu-  
trons. X-rays and gamma rays for acute lethaly in  
mice. Radiation Res. 4:117-131., 1956

UNDERDOW BRIAN J. SIMMS ERNEST and EISEN HERMAN N.:  
Subunit structure and number of combining sites of  
the inmunoqlobulin. A myeloma plasmacytoma MOPC-  
315. Biochemistry 10: 4359-4368., 1961.

VALERY PASTEUR RADOT and HAMBURGER JEAN: Carcino-  
logia. Edit. Medicales Flammarien 1970. France.

PERNIS B. FORNI and AMANTE L.: Inmunoqlobulyns as  
cell receptors University of Milan: Anals New. Acad.  
of Sciences N.Y. 421-431., 1971

YONEMASU KUNIO and ATRoud R.M.: Clq-rapis purifi-  
cation method preparation of monospecific antise-  
ra and for biochemical studies. Journal of inmuno-  
logy. 106:304-314., 1971

VEGA CID F.J. HENNEKEUSER H. and CAMPOS J.L.: Tinción con verde de Guinea. Actas XVII. Jour.As.Esp. Biop.Clin. Cadiz., 1970.

VILLANUEVA J.R.: La célula viva. Edit. Blume. Barcelona., 1969

VILLANUEVA J.R.: La base molecular de la vida. Edit. Blume. Barcelona., 1971

Frontier of radiation therapy and oncology the interrelationship of the immune response: Edit. Vaeth J.M. San Francisco. California., 1972

VAZ N.M. and PRUVOST-DANON ANNIE: Behaviour of mouse mast cell during anaphylaxis in vitro. Prog. Allergy 13:11-173., 1969

WIPRECHT A.HOWARD M.M., NEIL G., COOPER and MULLER HANS J.: The reaction of mononuclear and aggregated immunoglobulins with C1. Immunochemistry B.: 1011-1020., 1971

WALDMANN TOMAS A. and STROBER WARREN: Metabolism of immunoglobulins. Progress Allergy 13:1-110., 1969

WEBB T. and LAPRESLE G.: Donnees actuelles sur les bases chimiques de la specificite immunologique des proteines. Bull Sec.Chim.Biol. 46-1701., 1971

BASIC Radiation protection criteria NCRP report No NCRP. Publications Washington D.C., 1971