

MONOGRAFIAS MEDICAS

**ESTUDIOS ACERCA DE ALERGIA EXPERIMENTAL \***

FRANCISCO ALONSO DE FLORIDA †

El término "alergia experimental" no es común. El propósito de enunciar este trabajo con ese vocablo es indicar un paralelismo indudable entre la "alergia natural" y la "alergia experimental". El término que se emplea más a menudo para referirse a esta clase de fenómenos es "hipersensibilidad". Sin embargo, este término es poco descriptivo pues la nota que mejor caracteriza al fenómeno no es la exageración o exaltación de una sensibilidad, sino más bien la adquisición, por parte del sujeto experimental o del paciente, de una nueva sensibilidad a un compuesto, llamado genéricamente antígeno o alérgeno. La sensibilidad pudiera no considerarse como nueva en un sentido estricto, ya que si el individuo responde haciéndose alérgico, ha de suponerse que la sensibilidad al antígeno pre-existe en el organismo de algún modo y en alguna medida, por pequeña que ésta sea. Pero la sensibilidad pre-existente es en

\* Basado en la Conferencia Magistral del mismo título dictada en las Jornadas Médicas de la Academia, celebradas en enero de 1975.

† Académico numerario. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

todo caso subliminal, de suerte que se manifiesta sólo cuando el proceso de alergia se pone en marcha en el sujeto experimental o en el paciente alérgico.

La alergia natural<sup>1</sup> se caracteriza porque los pacientes manifiestan una predisposición genética a adquirir o a desarrollar y hacer manifiestas, tales sensibilidades a compuestos ambientales que, por otra parte, suelen ser inocuos para los otros individuos. Esa predisposición, sin embargo, no es el objeto del presente estudio. Más bien se trata aquí de describir y explicar un modelo experimental de los mecanismos involucrados en la incitación de las reacciones. El modelo que describiremos puede, por otra parte, tomarse como válido en la clínica, pues, corresponde en muchos aspectos al sistema patológico "natural".

La mayoría de las teorías actuales acerca de la hipersensibilidad o alergia experimental<sup>2-10</sup> postulan que la interacción del antígeno ( $A$ ) con el anticuerpo ( $\bar{A}$ ) (interacción  $A\bar{A}$  de aquí en adelante) se realiza únicamente en ciertas células efectoras primarias o células blanco, en las cuales se induce, a modo de respuesta, la liberación de compuestos activos tales como la histamina, la serotonina, la acetilcolina, la sustancia de reacción lenta, y otras. Los compuestos así liberados, conocidos como mediadores farmacológicos se difunden en el seno de los tejidos, entre los espacios intercelulares y finalmente, alcanzan los efectores secundarios a los cuales excitan; dichos efectores secundarios son principalmente el músculo liso y los vasos capilares.

Hay otras teorías en las que la mediación se postula como un fenómeno más complejo. Así por ejemplo según Keller<sup>5</sup>

la interacción  $A\bar{A}$  daña a los leucocitos obligándolos a soltar ciertas sustancias tóxicas, cuya naturaleza deja sin precisar, las cuales por su parte inducen la liberación de mediadores de la anafilaxia en las células cebadas, los que a su vez causan la contracción muscular.

Entre las teorías de mediación compleja podrían incluirse también aquellas que se denominarían de bioactivación anafiláctica \* o alérgica con la participación de enzimas que realizan síntesis de productos sumamente activos como son las cininas y particularmente la bradisinina.<sup>11</sup> Entre los mecanismos de bioactivación, cabría mencionar también el modelo de la anafilotoxina. Este compuesto, cuya existencia se había supuesto desde muy antiguo, se ha identificado recientemente<sup>12</sup> con los fragmentos  $C'3$  y  $C'5$  del complemento, a las cuales se les conocen efectos muy semejantes a los de la anafilaxia: contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular, degranulación de las células cebadas y desprendimiento de histamina.

En el seno de la Academia el autor<sup>13-16</sup> se ha referido repetidamente a esas teorías para señalar su insuficiencia; es decir, para señalar que ni cada una de las teorías por separado ni todas juntas, explican otra cosa que ciertos datos experimentales, dejando de lado muchos otros, muy significativos. Pero ahora, muy aparte de una revisión de esas teorías y sus críticas, se tiene el propósito de resumir un conjunto de datos en apoyo de la teoría de la membrana. Esta, como veremos en seguida, no niega las teorías anteriores sino las complementa y permite incluirlas dentro de

\* En realidad debería de decirse "anafilaxia", pero el uso determina el término.

un cuerpo de doctrina que es coherente con los viejos y los nuevos postulados.

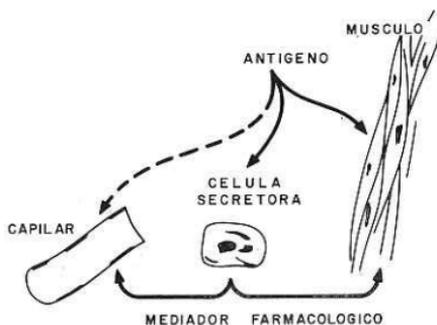
Como se señaló en una revisión histórica del problema,<sup>16</sup> la teoría de la membrana no es totalmente nueva sino que se origina de modo independiente con Dale y Doerr a principios de siglo. Sin embargo, por no ser posible, en ese tiempo, no se la había sometido a las pruebas experimentales, no se habían enunciado de un modo concreto sus mecanismos biofísicos, y por ende la teoría no había alcanzado aceptación.

Así pues, para integrar las teorías clásicas con la nuestra se reseñará inicialmente un modelo conceptual al nivel tisular, y a continuación se describirá otro modelo conceptual para explicar el llamado efecto directo; dicho modelo tiene una variante que importa mucho: el modelo alostérico que provee una base biofísica a la teoría de la membrana. En seguida se verá el modelo experimental de Schultz-Dale que, con ciertas variantes, ha servido a nuestras investigaciones; y por último se describirán las pruebas experimentales que se han aplicado a fin de verificar o refutar la teoría de la membrana, especificada según los modelos mencionados.

### El modelo al nivel tisular

Durante mucho tiempo se consideró a la anafilaxia, y por implicación a la alergia, como un fenómeno sistémico. Se pensaba que la interacción  $\overline{AA}$  producía sus efectos en algún tejido u órgano donde se originaban sustancias tóxicas. Estas últimas, acarreadas por la circulación, ejercerían un efecto dañino a distancia en el organismo. Es posible que tales fenóme-

nos sean ciertos, pero no se discutirán ahora. Se sabe por seguro, sin embargo, que la anafilaxia puede producirse en tejidos o en células aisladas *in vitro*, tales como el músculo liso,<sup>17</sup> el músculo estriado<sup>14, 18, 19</sup> y el nervio.<sup>20</sup> Para explicar todos estos fenómenos se postulan mecanismos directos y mecanismos indirectos. El mecanismo directo se verifica por la interacción  $\overline{AA}$  sobre las células que contienen el anticuerpo ( $\overline{A}$ ). Si la célula en cuestión es una célula secretora ésta producirá secreción, si es una fibra muscular producirá contracción, si es un capilar se producirán cambios en la permeabilidad, y así sucesivamente (fig. 1). El mecanismo indirecto, por otra parte, se verifica como una consecuencia de la liberación de productos químicos, mediadores farmacológicos, que ciertas células llamadas primarias como son los leucocitos y células cebadas, producen. Los productos se difunden luego entre los espacios intercelulares y actúan a cierta distancia en el seno del tejido sobre las fibras musculares, capilares, etc., ejerciendo ahí una acción secundaria. Esta última es así mis-



1 Acción directa e indirecta del antígeno, en un animal alérgico.

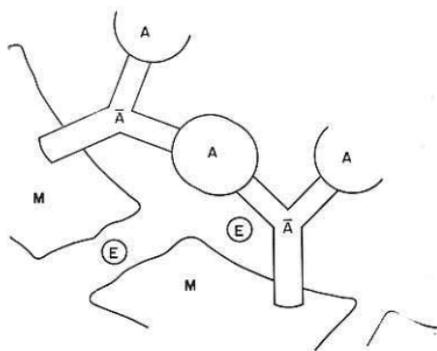
mo una respuesta de contracción, de permeabilidad vascular, etc., dependiendo de la célula que es objeto de los efectos autofarmacológicos.<sup>7</sup>

### Efecto directo de la alergia experimental

El modelo mínimo consiste en lo siguiente:

a) Los anticuerpos, moléculas de inmunoglobulina, se fijan por medio de su fragmento  $F_c$  en sitios específicos de la membrana plasmática del músculo o de ciertas células como son los mastocitos y los leucocitos.

b) La membrana está formada de unidades, cada una de las cuales tiene un dispositivo valvular para franquear canales al paso de iones (fig. 2). El sistema es específico, es decir, la apertura de vál-



2 Mecanismo molecular de la acción del antígeno. El antígeno ( $A$ ) se combina con el anticuerpo ( $\bar{A}$ ) dando lugar a los agregados. La interacción da lugar a un cambio conformacional tanto en  $A$  como en  $\bar{A}$ . Luego el cambio conformacional se transmite a las moléculas estructurales de la membrana ( $M$ ) todo lo cual resulta en corrientes de iones ( $E$ ) como un primer paso en la excitación de los tejidos.

ulas permitirá el paso de ciertas especies iónicas, pero no de otras.<sup>21</sup> Hay ciertos datos que permiten hablar de dispositivos de translocación<sup>22, 23</sup> en lugar de dispositivos valvulares. El mecanismo de válvula implica la idea de movimientos iónicos impedidos por fuerzas electroquímicas y de concentración. El mecanismo de translocación, en cambio, indica el paso de los iones llevados de un lado a otro mediante acarreadores<sup>24</sup> según la teoría cinética del transporte de iones.<sup>25</sup> Sin embargo para el propósito de nuestro modelo los dos mecanismos pueden tomarse indistintamente como válidos.

c) La interacción  $A\bar{A}$  actúa sobre los mecanismos valvulares o de translocación en cada unidad, de modo que al paso de los iones, se generan corrientes eléctricas a través de la membrana.

d) Las corrientes eléctricas que se generan ponen en marcha un mecanismo de actividad intracelular, el cual en definitiva se integra en una respuesta que depende de la organización de la célula de que se trate; si ésta es muscular dará lugar a la contracción; si es un mastocito o leucocito, dará lugar a la secreción de hormonas locales, autocoideas como la histamina.

Douglas<sup>26</sup> basándose en ciertos datos obtenidos por el autor y sus colaboradores en el músculo, ha postulado que también las células secretoras secretan sus productos inducidas por la interacción  $A\bar{A}$ . Tanto en el músculo como en las células secretoras, la interacción  $A\bar{A}$  induciría la activación de la membrana, y ésta a su vez activaría un sistema intracelular, de contracción o de secreción, según el caso, a lo largo de un sistema de acoplamiento, donde el papel del calcio sería fundamental.

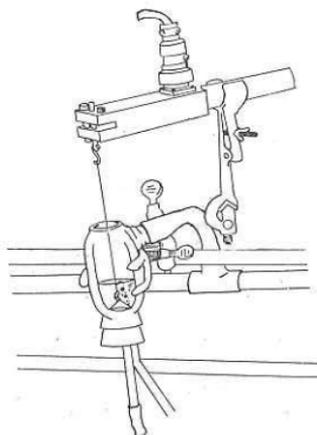
*Un modelo alostérico.* El modelo descrito puede visualizarse como un modelo alostérico de la membrana<sup>27-29</sup> en los siguientes términos: las unidades son protómeros a cada uno de los cuales se incorpora al menos una molécula de inmunoglobulina, la cual actúa como unidad para el reconocimiento estereoespecífico del antígeno (o alérgeno). La interacción  $A\bar{A}$  da lugar a una deformación de  $\bar{A}$ ; esta deformación a su vez determina un cambio conformacional en el protómero. Cada cambio conformacional en el protómero, da lugar, a su vez, a la inducción de cambios conformacionales en protómeros vecinos, todo lo cual implica un fenómeno amplificador. El fenómeno iónico valvular o de translocación se produce al nivel de los protómeros. El modelo en su forma alostérica es muy útil como se verá más adelante.

### El modelo experimental de Schultz-Dale

En forma independiente Schultz<sup>30</sup> y Dale<sup>17</sup> descubrieron que el músculo liso alérgizado y suspendido *in vitro* responde con una contracción a la acción del antígeno añadido al baño. En seguida se describen los pasos esenciales de esos experimentos, pues, como veremos, el modelo experimental sigue siendo muy útil en los estudios de alergia. El modelo consiste en lo siguiente:

a) Administrar al animal, generalmente cobayo, un antígeno (compuesto macromolecular que suele ser proteínico o polisacárido) en inyecciones subcutáneas repetidas a lo largo de varios días.

b) Dejar pasar un plazo de aproximadamente una o dos semanas.



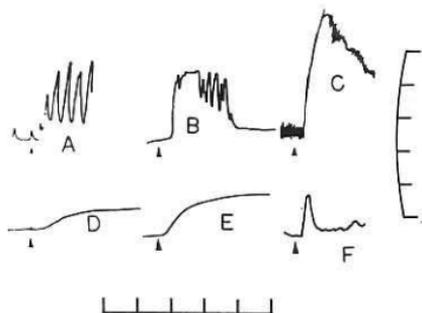
3 Dispositivo experimental: un vaso de doble pared entre las que circula agua a 37°C. En la cámara anterior se encuentra una solución electrolítica amortiguada, la cual baña un fragmento de músculo liso conectado a un transductor mecánico-eléctrico.

c) Matar al animal y perfundir el sistema arterial con una solución electrolítica amortiguada con el fin de lavarlo de la sangre contenida en el sistema circulatorio.

d) Tomar del animal un fragmento de músculo liso (útero, intestino, anillo traqueal, etc.) y suspenderlo *in vitro* bañado por una solución electrolítica amortiguada, conectándolo a un dispositivo para el registro de las contracciones musculares (fig. 3).

e) Añadir las dosis de los compuestos activos como son la histamina, la acetilcolina u otros y la dosis de antígeno, a fin de registrar las respuestas de contracción (fig. 4).

El modelo experimental de Schultz-Dale tiene algunas variantes con respecto a la técnica que se utiliza para la sensibilización o alérgización. Por una parte está



4 Respuestas de músculos lisos alergizados por vía activa: útero (A), vesícula seminal (B), ileon terminal (C), tira de aorta (D), anillo traqueal (E) y músculo diafragma denervado (F). Resultados inéditos de Olmedo y Alonso de Florida.

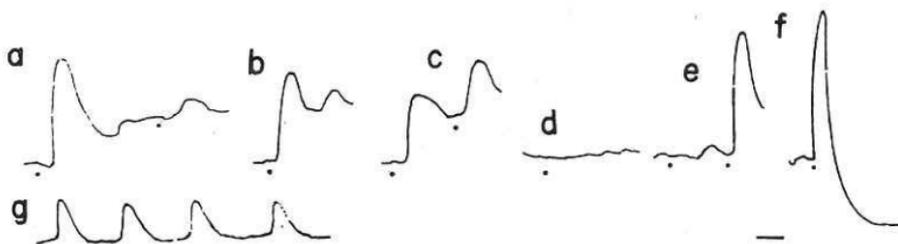
la *alergización activa*, que como quedó dicho consiste en la administración repetida del antígeno; este procedimiento da lugar a la producción de anticuerpos por el organismo y a su ulterior fijación en diversas células. Pero, puede también recurrirse a alergizar los animales mediante la inyección intravenosa de antisueros o productos purificados de inmunoglobulinas, técnica que se conoce como *alergización pasiva in vivo*; o bien alergizar a los tejidos *in vitro* incubándolos con las inmunoglobulinas a concentraciones variables: *alergización pasiva in vitro*. Por otra parte, el modelo experimental de Schultz-Dale ha sido extendido por el autor y su grupo para abarcar otros tejidos como son el músculo estriado y el nervio. (Ver más adelante.)

#### Efecto del antígeno aplicado a sitios restringidos sobre la superficie celular

La primera consecuencia de la teoría general que el autor y su grupo de trabajo

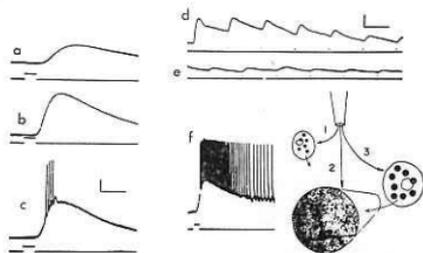
sometieron al análisis experimental, fue que el antígeno ejerce una acción despolarizante en la membrana de las fibras musculares. Se acepta como un conocimiento clásico de la fisiología<sup>31</sup> que la membrana tiene una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior, la cual se debe a la disparidad de la permeabilidad a los iones y a la acción de sistemas enzimáticos como es la bomba de sodio encargada de extraer sodio del interior hacia el exterior de la célula. La despolarización no es otra cosa que la disminución, desaparición, o aun reversión, de dicha diferencia de potencial que se produce como consecuencia del paso de los iones a lo largo de los canales que se franquean como resultados de la interacción AA. Puede ser también, efecto de la translocación de los iones a través de la membrana.

En el estudio experimental se utilizó el diafragma denervado del cobayo alergizado, pues ya se había comprobado anteriormente<sup>32, 33</sup> que este músculo se comporta en mucho como el músculo liso del modelo clásico, por lo que a la reacción alérgica *in vitro* y a los efectos farmacológicos se refiere (fig. 5). Así las tiras de diafragma denervado: a) despliegan actividad contráctil espontánea y rítmica, y despliegan tono; b) son sensibles a la histamina; c) son sensibles a la acetilcolina; d) cuando provienen de animales alergizados, son sensibles al antígeno específico, y a las proteínas antigénicas relacionadas estructuralmente; e) tanto la sensibilidad al antígeno, como la sensibilidad a las drogas, se reducen después de la activación dando lugar a una etapa denominada periodo de refractaridad; f) la sensibilidad se recupera lentamente a lo



largo de un proceso llamado resensibilización; y *g*) la curva dosis respuesta al antígeno tiene la característica forma de campana, con un máximo entre 30 y 100  $\mu\text{g./ml.}$ , de concentración final en el baño.

5 Diafragma denervado alergizado contra ovoalbúmina. Cada punto en el trazo significa el momento de añadir un compuesto activo; a veces se dieron dos compuestos activos en sucesión sin lavar la preparación (trazos sin interrupción). Así (*a*) ovoalbúmina (100  $\mu\text{g./ml.}$ ) e histamina (3  $\mu\text{g./ml.}$ ); (*b*) 60 minutos después de (*a*), histamina 3  $\mu\text{g./ml.}$ ; (*c*) ovoalbúmina (100  $\mu\text{g./ml.}$ ) aplicada 60 minutos después de (*b*) e histamina (3  $\mu\text{g./ml.}$ ); (*d*) ovoalbúmina 15 minutos después de (*c*); (*e*) ovoalbúmina 100  $\mu\text{g./ml.}$  60 minutos después de (*d*) e histamina (3  $\mu\text{g./ml.}$ ); (*f*) acetilcolina (3  $\mu\text{g./ml.}$ ); esta última da lugar a una contracción seguida de una relajación; (*g*) actividad rítmica del músculo denervado que aparece ocasionalmente. (Tomado de Alonso de Florida y col.<sup>33</sup>)



6 Registros intracelulares *in vitro* del potencial de membrana del músculo diafragma denervado. Al abrir la válvula, el antígeno difunde en la solución electrolítica que baña el músculo. Los registros *a*, *b* y *c* corresponden a distancias cada vez menores de la microválvula a la fibra muscular, al momento de soltar el antígeno (ovoalbúmina). Se nota que la magnitud de la despolarización aumenta a medida que se acorta la distancia de la pipeta al sitio de registro; calibraciones: 10 mV, 1 seg. Los registros *d* y *e* son el resultado de una secuencia de descargas de antígeno (ovoalbúmina) a tiempos regulares; calibraciones: 5 mV, 6 seg.; se nota la desensibilización progresiva. En *f* se administran pulsos al interior de la fibra y al mismo tiempo se administra una descarga de antígeno (deshidrogenasa láctica); véase cómo la despolarización se corresponde con un cambio de impedancia, la cual se mide por la disminución en la amplitud de los pulsos registrados. Finalmente en *g* se muestran tres caminos posibles 1, 2 y 3 del antígeno difundido; en el texto se discute porqué 2 es el más factible en estos caminos.<sup>34</sup>

El gran calibre de las fibras musculares que componen esas preparaciones las hacen muy apropiadas para las técnicas electrofisiológicas.<sup>34</sup> Estas consistieron en aplicar el antígeno por medio de una microválvula o micropipeta de vidrio, cuya embocadura, muy pequeña (5  $\mu$  a 10  $\mu$ ), podía abrirse o cerrarse mediante un émbolo que se aproximaba o retiraba mediante un electroimán. La microválvula fue ideada y construida especialmente para realizar estos experimentos.<sup>35</sup> Las respuestas eléctricas de la membrana se registraron con la técnica convencional de microelectrodos de vidrio. Los resultados mostraron (fig. 6) que tanto la amplitud como el curso temporal de la despolarización que se producía al descargar un volumen de la solución interior de la pipeta en el líquido ambiente de la preparación, dependían

de la distancia entre la punta de la microválvula y la superficie celular en el sitio de implantación del microelectrodo. Las distancias mayores daban por resultado menores amplitudes y ciclos de despolarización-repolarización más lentos, lo cual verosímilmente reflejaba mayores distancias en que la proteína tenía que difundirse antes de alcanzar la fibra. Por otra parte, la superficie de la fibra no mostró sitios especialmente sensitivos al antígeno, sino que su sensibilidad fue uniforme. Por consiguiente parece válido concluir, que el efecto del antígeno se ejerce directamente sobre la fibra muscular denervada, ya que de actuar en las células cebadas, éstas deberían haberse destacado como sitios de sensibilidad exquisita al antígeno.

*Cambios en la resistencia de la membrana.* Otros experimentos<sup>34</sup> realizados también en las fibras del músculo diafragma denervado y alergizado se destinaron a estudiar los cambios de impedancia que la teoría preve en el sistema, según corresponde al modelo en que los anticuerpos actúan como dispositivos capaces de activar válvulas que abren o cierran poros de canales al paso de iones de determinada clase, o que verifican translocaciones. Los resultados, en efecto, demostraron que el antígeno induce la caída brusca de la resistencia, hasta alcanzar un valor muy pequeño, comparable a un cortocircuito. Utilizando un microelectrodo para inyectar corriente al interior de la fibra, se midió la amplitud de los pulsos registrados en el exterior, los cuales se consideraron como una función de la resistencia eléctrica existente a través de la membrana de la fibra. La disminución de la resistencia fue, según los resultados,

concomitante con los cambios de polaridad (fig. 6).

### Alergia experimental del músculo en ausencia de nervios

Los estudios anteriores efectuados en el músculo denervado, demostraron de paso que la anafilaxia puede darse en la ausencia de nervios. La conclusión aunque negativa tiene importancia pues Ginger y Alpers<sup>36</sup> habían dado una serie de datos farmacológicos de bloqueo de la transmisión sináptica que tendían a sustanciar la idea de que la acción del antígeno se ejercía sobre el anticuerpo anclado a las terminaciones nerviosas, y que así la interacción  $A\bar{A}$  estimularía la producción del neurotransmisor, y que éste, en fin, activaría al músculo. La anafilaxia del músculo sin la participación de los nervios, se comprobó así mismo en los experimentos de Dale y Zilletti<sup>37</sup> quienes demostraron que la tetrodotoxina no tiene ningún efecto manifiesto de bloqueo de la reacción anafiláctica en el íleon del cobayo alergizado.

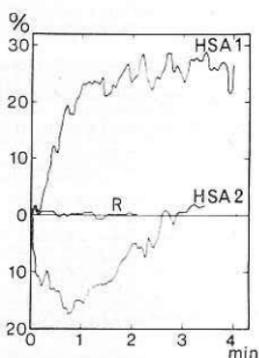
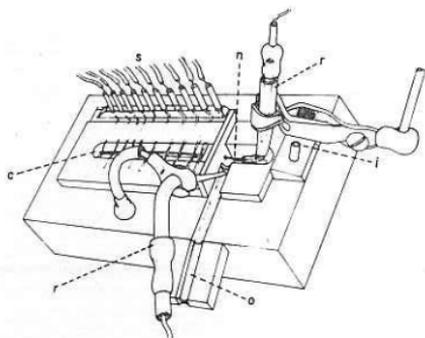
Ahora bien, no obstante que la anafilaxia del músculo se produce en ausencia de nervios, los nervios podrían participar mediante el mecanismo que proponen Ginger y Alpers, y entonces superponerse al efecto directo sobre el músculo liso. Más adelante se relatan, en efecto, experimentos<sup>20</sup> que demuestran la respuesta anafiláctica de los nervios.

*La alergia experimental del nervio.* Si los anticuerpos se comportan como dispositivos de la excitación, tal efecto podría observarse como de hecho se ha observado no solamente en músculo liso, sino también en otros tejidos excitables, como es el

nervio. El efecto en el nervio tiene el interés de que el sistema es relativamente sencillo, y que en general es insensible o escasamente sensible al efecto de hormonas locales.<sup>38, 39</sup> Por otra parte tiene el interés, como ya se mencionó en el párrafo anterior, de que el nervio se supone involucrado en las respuestas anafilácticas del músculo, atribuyéndole el papel de sitio primario de la interacción del antígeno con el anticuerpo.<sup>20</sup>

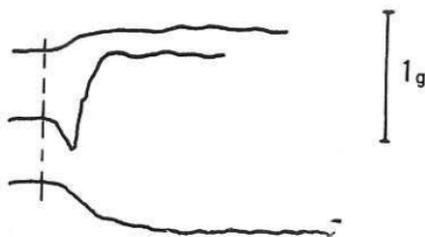
Los estudios se realizaron en el nervio frénico aislado del cobayo (fig. 7). Se midieron los cambios de potencial de demarcación que resultan de exponer al antígeno los nervios obtenidos de animales alergizados. Las respuestas consistieron tanto en deflexiones positivas como negativas. Cuando el antígeno se aplicó en ocasiones sucesivas, lavando entre dos aplicaciones sucesivas, la preparación mostró desensibilización parcial o total. Así pues los resultados se avienen a la idea central de este trabajo, de que los anticuerpos son dispositivos que se unen a la membrana plasmática y que efectúan un mecanismo valvular iónico, o translocación iónica y que, como consecuencia, se establecen corrientes eléctricas, las cuales dan lugar a la excitación intracelular.

*La relajación alérgica.* La teoría de que los anticuerpos al interactuar con el antígeno determinan un mecanismo de permeabilidad de canales a las corrientes iónicas, o que propician la translocación de iones de uno a otro lado de la membrana, tiene una importante consecuencia. Esta es que, en determinadas circunstancias, deberían observarse, no ya los mecanismos de excitación celular reflejados por un fenómeno de contracción, sino los mecanismos de inhibición celular reflejados



7 La respuesta anafiláctica del nervio. *Arriba.* El nervio frénico *n* se coloca en el dispositivo, pasa a través de una perforación que se encuentra en el tabique divisor y que comunica el compartimiento *c* que es una cámara húmeda (normalmente tapada con un portaobjetos), en la que circula solución electrolítica. Esta última se alimenta por *i*, luego baña el nervio y finalmente sale por *o*. El potencial de membrana se registró mediante dos electrodos *r*. *Abajo.* Se ilustra los efectos de dos dosis consecutivas de albúmina humana (100  $\mu\text{g./ml.}$ ): respectivamente *HSA1* y *HSA2*. El registro *R* es de control. (Tomado de *Ninomiya* y col.<sup>20</sup>)

como relajación muscular. El comportamiento dualístico de la reacción anafiláctica, de hecho, pudo observarse<sup>40</sup> en los anillos traqueales de cobayos superalergizados; es decir, en los anillos traqueales de animales preparados mediante



8 Relajación alérgica experimental. Se registraron las respuestas de tensión de un anillo traqueal obtenido de un cobayo hiperalergizado mediante la administración durante tiempos muy prolongados, meses, del antígeno (seroalbúmina humana) mezclado con adyuvantes. De arriba a abajo la concentración de los productos activos fue: histamina, 10  $\mu\text{g./ml.}$ ; antígeno (primera dosis), 50  $\mu\text{g./ml.}$ ; antígeno (segunda dosis), 50  $\mu\text{g./ml.}$  Nótese la respuesta bifásica a la primera dosis de antígeno, y la relajación como respuesta a la segunda dosis de antígeno. (Tomado de Alonso de Florida y Córdoba.<sup>40</sup>)

inyecciones repetidas de antígenos con adyuvantes a lo largo de periodos prolongados. En esas circunstancias, la reacción consistió en una respuesta bifásica (fig. 8): una pequeña relajación seguida de una contracción. Después de lavar, una segunda dosis del antígeno dio lugar, como una regla, a una marcada relajación.

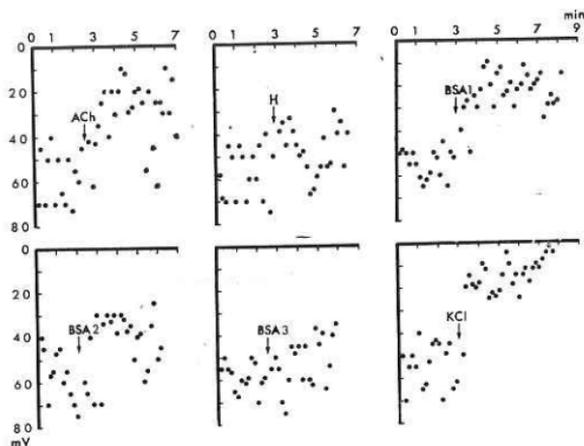
### Refutación del efecto alérgico directo en músculo

Recientemente Dale y Zilletti<sup>37</sup> estudiaron la distribución de células cebadas en el músculo longitudinal del íleon, determinaron su contenido en histamina y la liberación de la misma en la anafilaxia del tejido. Encontraron que el músculo longitudinal tratado con octalamina a la concentración de  $10^{-3}$   $\mu\text{g./ml.}$  durante un minuto, reduce la cuenta de mastocitos en 95 a 100 por ciento, lo cual reduce la reacción

anafiláctica a todas las dosis de antígeno; y que esto aconteció a despecho de que el músculo conserva su capacidad de respuesta a pequeñas dosis de histamina y de otros mediadores de la anafilaxia. Por consiguiente los datos de Dale y Zilletti parecen contradecir nuestro modelo de la acción directa del antígeno; cuando menos por lo que a la aplicación del modelo al músculo liso se refiere. Pero si Dale y Zilletti tienen razón, ha de asumirse el argumento de que el antígeno aplicado en microdosis sobre las preparaciones de diafragma denervado, haciendo uso de la microválvula, alcanza tanto a las fibras musculares como a las células cebadas que se encuentran en la superficie, pero que únicamente activa a estas últimas. Habría entonces que presuponer la existencia de una densidad de mastocitos muy numerosa; la suficiente como para que los efectos se manifestasen uniformemente en toda la superficie; es decir, habría que suponer que cada descarga de antígeno alcanzaría al menos un mastocito en suficiente concentración como para incitarlo a desprenderse de su histamina o de otro mediador farmacológico de la anafilaxia.

*Efectos en tejidos alergizados y desprovistos de mastocitos.* El supuesto de un efecto indirecto, como lo sostienen Dale y Zilletti según se explica en el párrafo anterior, parece mal basado; para declararlo válido habría que comprobar una muy elevada densidad de mastocitos. No obstante, y en vista de esas objeciones, la teoría de la acción directa se sometió a una prueba experimental sumamente rigurosa, consistente en desproveer a las preparaciones de sus mastocitos, no mediante la acción de fármacos, sino por medio de la micromanipulación.<sup>41</sup> Esta

9 Diagramas de dispersión de los potenciales de membrana en el músculo cremáster. Cada punto del diagrama corresponde a una medición del potencial de membrana. A los tiempos marcados por las flechas se administró: *Acb*, acetilcolina 10  $\mu\text{g./ml.}$ ; *H*, histamina 10  $\mu\text{g./ml.}$ ; *BSA1*, *BSA2* y *BSA3* dosis sucesivas del antígeno, 10  $\mu\text{g./ml.}$ ; *KCl*, solución isotónica de cloruro de potasio a fin de producir la despolarización total de la fibra. Obsérvese la despolarización que se produce como respuesta a los varios compuestos administrados; la histamina es, sin embargo, inefectiva. (Resultados inéditos de Ninomiya y Alonso de Florida.)

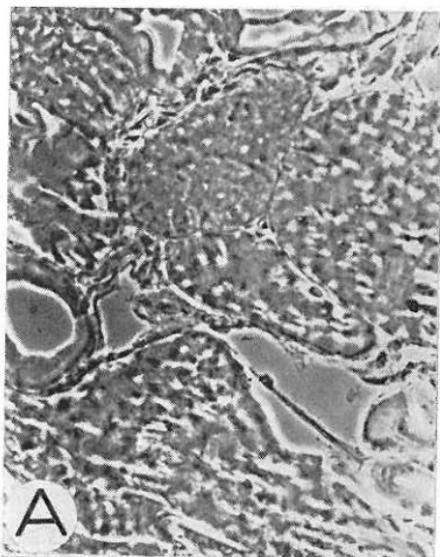


vez se utilizó el músculo cremáster extirpado de cobayos machos alergizados activamente. Previamente se había demostrado, por el mismo grupo, que ese músculo responde *in vitro* con contracciones muy vigorosas a dosis relativamente bajas del antígeno específico. El músculo cremáster, por otra parte, está formado de fibras musculares más anchas aun que las del músculo diafragma denervado, unas 100  $\mu$  de ancho, y por consiguiente es muy útil para los estudios de electrofisiología. La estructura del músculo se presta para diseccionar bandeletas que contienen una sola capa de fibras, así que la preparación puede examinarse bajo microscopio con contraste de fase e identificar, además de las fibras musculares, los mastocitos u otras células de origen sanguíneo. Una vez que los mastocitos se han identificado, pueden eliminarse por micromanipulación sorbiéndolos en micropipetas de vidrio. Ninomiya <sup>42</sup> ha demostrado por medio de estudios farmacológicos la existencia de fibras musculares lisas en el cremáster pero

éstas se encuentran en una lámina de tejido conjuntivo denso por fuera de la lámina de fibras musculares estriadas, de modo que las primeras quedan eliminadas de las preparaciones, mediante la extirpación de la lámina de tejido conectivo.<sup>43</sup>

Los experimentos electrofisiológicos <sup>41</sup> consistieron en (fig. 9) introducir a tiempos más o menos regulares, cada vez en un sitio distinto de la preparación, un microelectrodo, de modo de obtener, fotografiándolo de la pantalla de un osciloscopio, el valor del potencial de membrana. Según este procedimiento se barría, por así decirlo, cierta área de la fibra muscular, antes y después de administrar el antígeno, y otras sustancias activas, como la histamina, el cloruro de potasio, la acetilcolina, o una solución isotónica.

Los resultados demostraron que el potencial de membrana en reposo varía en respuesta al antígeno, a la acetilcolina, a la histamina, y a la solución de cloruro de potasio. Esta última, como es sabido, produce la máxima despolarización que es



posible. La respuesta al antígeno se obtuvo únicamente en las preparaciones obtenidas de los animales alergizados como era de esperarse según el modelo. Además el antígeno aplicado en dosis sucesivas, lavando la preparación entre cada dosis, demostró la desensibilización del tejido ya que la respuesta disminuía, o se abolía del todo, con las dosis sucesivas. Por consiguiente, estos resultados confirman el postulado de que el antígeno actúa en las fibras musculares sin la necesaria intervención de las células cebadas; verosímilmente en virtud de la interacción con el anticuerpo situado en la superficie de las mismas fibras musculares.

*Localización por fluoresceína de los agregados de antígeno-anticuerpo.* Los estudios anteriores corroboran la teoría de que las proteínas antigénicas ejercen un efecto directo en las propiedades de la membrana celular de las células musculares alergizadas. Como consecuencia de este efecto los anticuerpos se encontrarían en esa misma superficie y aplicando las técnicas de fluorescencia podrían ser visualizados. La siguiente etapa <sup>44</sup> de la investigación fue determinar la presencia de esos anticuerpos mediante las técnicas de fluorescencia como enseguida se explica.

Como en los experimentos anteriores, se utilizó el músculo cremáster del cobayo

10 Corte por congelación de cremáster alergizado contra albúmina humana y luego tratado con fluoresceína-albúmina-humana. En *A*, se muestra la imagen que se produce bajo el efecto del contraste de fase; nótese las fibras musculares cortadas de través y algunos de los elementos del tejido conectivo que las rodea. En *B*, imagen fluorescente que se produce bajo el efecto de la luz ultravioleta; nótese cómo se dibujan las figuras de las fibras y los elementos del tejido conectivo 40 X. (Resultados inéditos de Gutiérrez-López y Alonso de Florida.)

alergizado. Una serie experimental se llevó a cabo en las preparaciones obtenidas por microdissección como en los estudios referidos en el párrafo anterior. Estas preparaciones mostraron, aparte de su utilidad para los estudios electrofisiológicos, ser muy convenientes en los estudios de fluorescencia. El antígeno se marcó con isotiocianato de fluoresceína. Luego las preparaciones se expusieron al antígeno-fluoresceína a concentraciones adecuadas durante una hora. En seguida se lavaron concienzudamente y por último, se observaron en el microscopio con luz ultravioleta. Los resultados revelaron que los espacios intersticiales, entre dos fibras, aparecen más brillantes que las áreas restantes en el tejido. Los primeros resultados que se ilustran en la figura 10 demuestran que la fluorescencia aparece cubriendo las fibras musculares. Otros resultados se publicarán posteriormente pero se confirma que un trasfondo verde, es bien aparente correspondiendo con las fibras musculares. Además se mostrará que en los espacios intersticiales se destacan parches aún más brillantes, que con ayuda del contraste de fase, pueden identificarse como fibroblastos del tejido conjuntivo, y que las células cebadas se pueden identificar como cuerpos sumamente brillantes. Por supuesto que dieron resultados negativos tanto las preparaciones obtenidas de animales no alergizados, como aquellas obtenidas de animales alergizados, pero que habían sido tratados previamente con antígeno desprovisto de fluoresceína. Es claro, por consiguiente, que el antígeno se unía de modo específico a los anticuerpos localizados en los espacios intersticiales y al tejido conjuntivo del músculo. La significación de estos experimentos

considerados conjuntamente con los anteriores se discute a continuación.

### La reacción alérgica y el concepto de membrana

Todas las observaciones corroboran la teoría de que los antígenos ejercen su efecto alterando las propiedades de permeabilidad de la membrana de las células alergizadas, y que la acción se inicia por la combinación del antígeno con el anticuerpo en la superficie de las fibras musculares. En ese sentido nuestros experimentos le dan una dimensión biofísica a la postulación original de Dale y Doerr, pero los anticuerpos se encontraron en el tejido conectivo y no en la membrana propiamente dicha. Si hubiera aparecido ahí donde se conoce un límite de la fibra muscular, es decir en la fina capa de lípidos y proteína, la fluorescencia debería haberse reflejado como una línea verde uniforme limitando la imagen de cada fibra muscular. En lugar de esa imagen se encontró la fluorescencia del tejido conectivo, destacándose los elementos formados y la sustancia fundamental que aparece difusa rodeando las fibras.

Ahora bien, pueden distinguirse en realidad dos interpretaciones del término membrana. Una interpretación es estructural, es decir se infiere de datos como la microscopia de luz o electrónica; la otra es funcional. La teoría postula que una y la otra deben de corresponder, pero nuestros resultados introducen un elemento de discrepancia que no es desdeñable. A fin de salvar esa discrepancia nuestros experimentos se han encaminado ahora a indagar el papel de los anticuerpos como dispositivos que al interaccionar con el

antígeno, dan lugar a modificaciones del tejido conectivo, en particular la sustancia fundamental del mesénquima, y de ese modo alterar el intercambio electrolítico y acuoso entre el interior y el exterior de las células musculares. De ser así, la membrana desde un punto de vista funcional sería la atmósfera de tejido conjuntivo amorfo (sustancia fundamental) que rodea las fibras musculares y otras células. El control de la permeabilidad de esa membrana se haría sobre los polímeros de hexosaminas modificando verosimilmente el intercambio acuoso. Los fibroblastos y otras células secretan productos capaces de afectar esa polimerización y consecuentemente el equilibrio acuoso e iónico de los líquidos intersticial e intracelular.

#### REFERENCIAS

- Hallowell, C. L.: *Immunity from allergies*. The Sciences. 15:11, 1975.
- Austen, K. F. y Humphrey, H. H.: *In vitro studies of the mechanism of anaphylaxis*. Adv. Immunol. 3:1, 1963.
- Austen, K. F. y Becker, E. L.: *Biochemistry of the acute allergic reactions*. Blackwell Scientific Publ. Oxford y Edimburgo, 1968, p. 315.
- Becker, E. L.: *Introduction*. En: *Cellular mechanisms and involvement in acute allergic reactions*. Fed. Proc. 28:1702, 1969.
- Keller, R.: *On the role of secondary mast-cell damage and histamine-release in the course of immune reactions*. En: *Biochemistry of the acute allergic reactions*. Austen, K. F. y Becker, E. L. (Eds.). Blackwell Scientific Publ. Oxford y Edimburgo, 1968, p. 253.
- Keller, R.: *Tissue mast cells in immune reactions*. Elsevier Co. Amsterdam, 1970, p. 144.
- Mongar, J. L. y Schild, H. O.: *Cellular mechanisms in anaphylaxis*. Physiol. Rev. 42: 226, 1962.
- Orange, R. P.; Stechschulte, D. J. y Austen, K. F.: *Cellular mechanisms involved in the release of slow reacting substance of anaphylaxis*. Fed. Proc. 27:1710, 1969.
- Rocha e Silva, M.: *Release of histamine in anaphylaxis*. En: *Handbook of experimental pharmacology*. Eichler, O. y Farah, A. (Eds.). Berlín, Springer. 18:431, 1966.
- Brocklehurst, W. E.: *The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock*. J. Physiol. 151:416, 1960.
- Beraldo, W. T.: *Formation of bradykinin in anaphylactic and peptide shock*. Am. J. Physiol. 163:283, 1950.
- Coombs, R. R. y Lachmann, P. J.: *Immunological reactions at the cell surface*. Brit. Med. Bull. 24:113, 1968.
- Alonso de Florida, F.: *Ideas sobre la excitación celular en la anafilaxia*. GAC. MÉD. MÉX. 94:1027, 1964.
- Alonso de Florida, F.: *Acerca de la hipótesis de la membrana en la anafilaxia*. GAC. MÉD. MÉX. 97:1621, 1968.
- Alonso de Florida, F.: *Ciencia y creencias acerca del mecanismo de acción de los agentes químicos en los sistemas vivos*. GAC. MÉD. MÉX. 99:609, 1969.
- Alonso de Florida, F.: *Historia de los conceptos de receptor y anticuerpo*. GAC. MÉD. MÉX. 109:157, 1975.
- Dale, H. H.: *The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea-pig*. J. Pharmacol. Exper. Therap. 4:167, 1913.
- Ado, A. D.; Ginetsinskii, A. G. y Shamarina, N. M.: *The allergic reaction of skeletal muscle*. Fiziol. Zh. SSSR. 32 Translation No. RTS 2220, National Lendings Library. Boston, Spa. Yorks, 1946, p. 76.
- Ado, A. D. y Ginetsinskii, A. G.: *Anaphylactic contraction of skeletal muscle*. Byull. Eksp. Biol. Med. 18 Translation No. 2219, National Lending Library. Boston, Spa. Yorks, 1944, p. 64.
- Ninomiya, J. G.; Gijón, E. y Alonso de Florida, F.: *Anaphylactic reaction in the phrenic nerve of the guinea-pig*. Intern. J. Neuroscience. 3:291, 1972.
- Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F.: *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. J. Physiol. 117:500, 1952.
- Tasaki, I. y Singer, I.: *Membrane macromolecules and nerve excitability: A physico-chemical interpretation of excitation in squid giant axons*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 137:792, 1966.
- Watanabe, A.; Tasaki, I. y Lerman, L.: *Bionic potentials actions in squid giant axons internally perfused with sodium salts*. Proc. Nat. Acad. Sci. 58:2246, 1967.
- Alonso de Florida, F. y Ninomiya, J. G.: *La excitabilidad*. En: *La conformación molecular en el control biológico*. Alonso de Florida, F. (compilador). GAC. MÉD. MÉX. 100, Supl. 2:19, 1970.
- Ling, G. N.: *A physical theory of the living state: The association-induction hypothesis*. Nueva York, Blaisdel, Publ. 1962.
- Douglas, H. H.: *Autacoids*. En: *The pharmacological basis of therapeutics*. Goodman y

- Gillman (Eds.). McMillan Co. Londres-Toronto, 1969, p. 620.
27. Changeaux, J. P. y Thiery, J.: *On the excitatory and cooperativity of biological membranes*. En: *Regulatory functions of biological membranes*. Jarnefelt, J. (Ed.). Publ. Elsevier. Londres, 1968, p. 116.
  28. Changeaux, J. P.; Podleski, T. R. y Meunier, J. C.: *On some structural analogies between acetylcholinesterase and the macromolecular receptor of acetylcholine*. *J. Gen. Physiol.* 54: 225, 1969.
  29. Changeaux, J. P. y Podleski, T. R.: *Remarks on the cholinergic receptors of the electroplax membrane*. FEBS Symposium. 21:329, 1970.
  30. Schultz, W. H.: *Physiological studies in anaphylaxis. I. The reaction of smooth muscle of the guinea-pig sensitized with horse serum*. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1:549, 1910.
  31. Katz, B.: *Nerve, muscle, and synapse*. McGraw-Hill, Inc. Nueva York, St. Louis, San Francisco, Toronto, Londres y Sydney, 1966.
  32. Alonso de Florida, F.; del Castillo, J.; González, C. C. y Sánchez, V.: *Anaphylactic reaction of denervated skeletal muscle in the guinea-pig*. *Science*. 147:1155, 1965a.
  33. Alonso de Florida, F.; del Castillo, J.; González, C. C. y Sánchez, V.: *On the pharmacological and anaphylactic responsiveness of denervated skeletal muscle of the guinea-pig*. *Brit. J. Pharmacol.* 25:610, 1965b.
  34. Alonso de Florida, F.; del Castillo, J.; García, X. y Gijón, E.: *Mechanism of the Schultz-Dale reaction in the denervated diaphragmatic muscle of the guinea-pig*. *J. Gen. Physiol.* 51:677, 1968.
  35. Bryant, S. H.; del Castillo, J.; García, X.; Gijón, E. y Lee, C. F.: *An electrically operated micro-tap*. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 23:573, 1967.
  36. Geiger, W. B. y Alpers, H. S.: *Mechanism of the Schultz-Dale reaction*. *J. Allergy.* 30: 316, 1959.
  37. Dale, M. M. y Zilletti, L.: *The Schultz-Dale response of the longitudinal muscle strip preparation of guinea-pig ileum*. *Brit. J. Pharmacol.* 39:542, 1970.
  38. Shanes, A. M.: *Electrochemical aspects of physiological and pharmacological action in excitable cells. I. The resting cell and its alteration by extrinsic factors*. *Pharmacol. Rev.* 10:59, 1958a.
  39. Shanes, A. M.: *Electrochemical aspects of physiological and pharmacological action in excitable cells. II. The action potential and excitation*. *Pharmacol. Rev.* 10:165, 1958b.
  40. Alonso de Florida, F. y Córdoba, F.: *The anaphylactic relaxation of the smooth muscle of the guinea pig*. *Pharmacodyn.* 158:24, 1965.
  41. Alonso de Florida, F.; Ninomiya, J. G. y Paz, C.: *On the receptor function of antibodies in muscle fibers*. *The Physiologist.* 15:71, 1972.
  42. Ninomiya, J. G.: *Some pharmacological properties of the cremaster muscle of the guinea-pig*. *Brit. J. Pharmacol.* 55:487, 1975.
  43. Ninomiya, J. G.; Merchant, H. y Alonso de Florida, F.: *Smooth-muscle fibers associated with striated fibers in the cremaster muscle of the guinea-pig*. *The Physiologist.* 18:334, 1975.
  44. Alonso de Florida, F. y Gutiérrez-López, A.: *Localización del antígeno marcado con fluoresceína en el músculo cremáster del cobayo alérgico*. *Acta Physiol. Latinoamer.* 23:30, 1973.

## MAS SOBRE EL ABSCESO HEPATICO

El tratamiento de las supuraciones hepáticas, varía según la forma que afectan... el del gran absceso, es enteramente quirúrgico y apenas diagnosticado, es imprescindible la necesidad de operarlo. Los principios de la llamada operación del absceso, han sido formulados entre nosotros y su terapéutica formada desde antes del periodo anti-séptico... A los nombres de Recamier, MacLean y Murray, oponemos el del memorable Dr. Jiménez... Sobre un hecho sí, me permito llamar la atención de mi honorable auditorio, la práctica de la punción llamada exploradora, práctica ciega, que en la mayoría de los casos confirma el diagnóstico, y por consiguiente prueba lo innecesario de su ejecución. Hay más, basta recordar las veces que el hígado se nos escapaba cuando no nos habían enseñado a fijarlo, para comprender el cambio de relaciones que la punción producirá en el órgano y la dificultad que esto pueda ocasionar, siempre que la operación no siga de cerca a la investigación. (Ignacio Prieto: *Colecciones supuradas del hígado*. GAC. MÉD. MÉX. Tomo VI, tercera serie, pp. 121-132, abril de 1911.)