

REGULACION DE LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO
POR COMPONENTES NO-INMUNES DEL SUERO

MYRIAM KOSTOVETZKY LIBERANT

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSTGRADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1980

BIBLIOTECA
JUAN A. ESCALANTE D.
UNIDAD ACADEMICA DE
LOS CICLOS PROFESIONAL
& DE POSGRADO / CCH
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A Ramón

A David, Ruth y Judith
por su amor y paciencia

A mis padres, hermanos y amigos.

A mis tutores, Dr. Carlos Larralde, Dra. Kaethe Willms,
y Dr. Federico Chávez Peón, por su guía, amistad y estímulo científico durante mi preparación profesional.

A los Dres. Enrique Piña y Martha Zentella de Piña

Con agradecimiento a las personas que me
ayudaron a la elaboración de esta tesis.

Al Ing. Tzipe Govezensky por su
valiosa ayuda

A la Srita. Esperanza Ruiz, al Sr.
Salvador Barbosa y al Sr. José
Avilés.

INDICE

I. INTRODUCCION

II. MATERIAL Y METODOS

1. Diseño Experimental
2. Sistemas DNP-antiDNP
 - a) Inmunógenos
 - b) Procedimientos de Inmunización
 - c) Purificación de Anticuerpos
3. Sistema Gat-anti-GAT
4. Sueros No-Immunes
5. Técnicas Bioquímicas
 - a) Preparación de Inmunoadsorbentes
 - b) Marcaje de Antígenos
 - c) Fraccionamiento de Suero Normal
 - d) Acoplamiento de Anticuerpos a una Fase Sólida
 - e) Intercambio de Hidrógeno
6. Técnicas Inmunológicas
 - a) Microprecipitación en Capilar
 - b) Precipitación Cuantitativa
 - c) Capacidad de Fijación del Antígeno a una Fase Sólida
 - d) Diálisis en Equilibrio
7. Análisis Matemáticos de los Parámetros de la Reacción

III. RESULTADOS

1. Efecto Modulador del Suero Normal Homólogo sobre la Reacción Antígeno-Anticuerpo
2. Determinación de los Parámetros de la Reacción Antígeno-Anticuerpo

3. Variables que Influyen sobre el Efecto Modulador del Suero Normal en la Reacción Antígeno-Anticuerpo
 - a) Tiempo
 - b) Afinidad
 - c) Complejos con Diversas Relaciones de Reactantes
 - d) Efecto de Sueros Heterólogos

4. Fracción Sérica Responsable de la Modulación de la Reacción Antígeno-Anticuerpo
 - a) Efecto de Macro y Micromoléculas
 - b) Efecto de Inmunoglobulinas No-Inmunes y Albúmina
 - c) Efecto del Complemento
 - d) Efecto del Calcio

5. Efecto Alostérico del Suero
 - a) Cinética de Intercambio de Hidrógeno
 - b) Aplicación del Modelo Matemático

6. Efecto Modulador del Suero sobre la Reacción Hapteno-Anticuerpo

IV. DISCUSION

V. APENDICES

1. Antecedentes Históricos del Efecto del Suero sobre la Reacción - Antígeno-Anticuerpo
2. Afinidad y Aidez
3. Deducción de las Ecuaciones de Scatchard y Sips
4. Deducción de las Ecuaciones de Langmuir-Klotz
5. Modelo de Inhibición Competitiva
6. Modelo de Inhibición Alostérica

VI. REFERENCIAS

ABREVIATURAS

a	=	Índice de heterogeneidad
Ac	=	Anticuerpo
Ag	=	Antígeno
BGG	=	Gamaglobulina bovina
BSA	=	Albúmina sérica bovina
C ₁	=	Primer factor del complemento
C ₃	=	Tercer factor del complemento
CPM	=	Cuentas por minuto
CRA	=	Actividad liberadora del complejo
DID	=	Doble inmuno-difusión
DNP	=	Dinitrofenol
DNBS	=	Sal sódica del ácido dinitrobencensulfónico
DNP-BSA	=	Dinitrofenol acoplado a albúmina sérica bovina
DNP-HSA	=	Dinitrofenol acoplado a albúmina sérica humana
DNP-lis	=	Dinitrofenil lisina
E.A	=	Albúmina de huevo
Fab	=	Fragmento que contiene al sitio activo de los anticuerpos
Fc	=	Fracción cristalizable de los anticuerpos
F.S.	=	Fase sólida
FSH	=	Hormona folículo estimulante
GAT	=	L(glu ⁶⁰ ala ³⁰ tir ¹⁰) _n
GPA	=	Albúmina sérica de cobayo

HGH	=	Hormona de crecimiento
HSA	=	Albúmina sérica humana
IgG	=	Inmunoglobulina de clase G
IgM	=	Inmunoglobulina de clase M
Ko	=	Constante de afinidad aparente o promedio de la reacción
L	=	Ligando libre
LH	=	Hormona luteinizante
OVM	=	Ovomucoide
P	=	Ligando pegado
PBS	=	Amortiguador de fosfatos salinos
PCKLA	=	Hemocianina acoplada a diazofenil fosforilcolina
PGG	=	Gamaglobulina de cerdo
PLL	=	Poli L-lisina
P.N.	=	Polisacáridos del neumococo
r	=	Proporción de antígeno pegado en relación a la capacidad total de fijación del sistema
RIE	=	Radioinmunoensayo
RSA	=	Albúmina sérica de conejo
So	=	Número total de sitios de fijación

INTRODUCCION

En la actualidad la especificidad, la diversidad y la heterogeneidad de los anticuerpos (1-7), se explican así:

1. La especificidad depende de la complementaridad estérica de las -- estructuras terciaria y cuaternaria en áreas discretas de la superficie de los reactantes. La que permite la participación de las -- fuerzas débiles de interacción --muy sensibles a la distancia (8)-- que mantienen la unión antígeno anticuerpo.
2. Las estructuras terciaria y cuaternaria, y por ende la complementaridad, dependen de la estructura primaria (secuencia de aminoácidos en el caso de proteínas) de los reactantes.
3. La genética señala que la secuencia de aminoácidos, y por ende la especificidad, depende de la secuencia de bases en el DNA.
4. La diversidad y la heterogeneidad se explican proponiendo distintos genes para los diferentes anticuerpos.

Debe notarse la influencia del determinismo genético en esta -- área fundamental de la inmunología (9-11), excluyéndose a la participación del medio ambiente -- sitio y condiciones donde se lleva a cabo la reacción-- en la determinación de las propiedades de la reacción antígeno-anticuerpo.

Sabiendo que la reacción de fijación entre el antígeno y el -- anticuerpo no es covalente y depende de la sumación de fuerzas de interacción débiles, tales como enlaces de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos, interacciones iónicas o coulombicas, interacciones de Van der Waals y fuerzas --

repulsivas estéricas (8), uno esperaría que la presentación física de los reactantes (en solución o acoplados a una fase sólida), la carga de la superficie de reacción, el grado de solvatación, el estado de agregación y las características de difusión, influyan importantemente en la reacción. De hecho, revisando la literatura, se encuentran algunos trabajos que exploran las modificaciones que sufre la reacción antígeno-anticuerpo debida a la presencia de componentes no-inmunes del suero (12-30). Además, observaciones realizadas en nuestro laboratorio, probando otras hipótesis, indicaron la gran sensibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo a ser modificada por variables del medio ambiente o circunstanciales* (31-33). Así surgió la impresión de que existen moduladores de la reacción antígeno-anticuerpo entre los componentes no-inmunes del medio donde se lleva a cabo la reacción, y la voluntad de explorar la importancia de estos factores ambientales en las propiedades de la reacción antígeno-anticuerpo.

Las observaciones sobre los efectos del medio ambiente en la reacción antígeno-anticuerpo, hechas por otros grupos, se resumen en el Apéndice No. 1. En breve, los autores refieren el efecto que ciertas proteínas séricas y iones tienen sobre la reacción antígeno-anticuerpo y demuestran una gran variabilidad en las reacciones dependiendo de las condiciones de los ensayos (Tabla 1). Los resultados son complejos, y en ocasiones contradictorios; apuntando hacia efectos multifactoriales de los diversos componentes séricos con múltiples interacciones entre sí, las ob-

*Circunstancia: "Accidente de tiempo, lugar, modo, etc. que está unido a la sustancia de algún hecho o dicho (34)".

TABLA 1

Efecto	Factor responsable	Técnica	Especie	Ag	Ref. No.
Aumento de precipitación consumo de complemento	Complemento	precipitación cuantitativa actividad hemolítica	cuyo conejo cerdo hombre	BSA BGG HSA PGG	12
Aumento de precipitación	factor similar a C_1	precipitación en capilar	humano	-glob agregada	13
Aumento de precipitación	factor de C_1	precipitación cuantitativa	humano	-glob agregada	14
Aumento de fijación	proteína sérica	RIE - doble Ac	cuyo	HGH	15
Doble banda en DLD	complemento - C_1	DID	cuyo conejo humano	DNP BSA BGG EA	16
Aumento de precipitación	C_{1q}	RIE - doble Ac	humano borrego conejo	LH FSH HGH	17
Inhibición de fijación	IgM - α_2 macroglobu- lina	RIE - fase sólida	ovinos bovinos conejo humano	LH	18
Interferencia en sensi- bilidad	proteína sérica	RIE	humano	LH FSH	19
Solubilización complejos Ag-Ac	complemento	precipitación cuantitativa	conejo cuyo	BSA	20
Solubilización complejos Ag-Ac	vía alterna de comp- plemento	CRA	ratones	BSA	21
Solubilización precipi- tado	C_3	CRA	borrego	OA BGG DNP P.N. BSA DNP	22

TABLA 1
(continuación)

Efecto	Factor responsable	Técnica	Especie	Ag	Ref. No.
Solubilización complejo Ag-Ac	vía alterna de C'	precipitación cuantitativa	IgA ratón (mieloma)	PCKLH DNP	23
Facilitación hemaglutinación	proteína sérica P.M 500,000	hemaglutinación	aves	Eritrocitos	24
(Impedimento) de fijación. Inhibición	vía alterna de C'	Ag inmovilizado en F.S.	ratón conejo cuyo	BSA	25
Solubilización de complejos	C ₃ convertasa	CRA	humano	BSA	26
Inexactitud en las mediciones de precipitación	IgG de diferentes -- afinidades y estructuras	Inmunoprecipitación automatizada	humano	hormona péptidica	27

servaciones solo señalan inhibición o facilitación de la reacción antígeno-anticuerpo por diversas moléculas pero ninguna explora el efecto del ambiente sobre las constantes termodinámicas de la reacción, ni proyectan sus resultados sobre la importancia fundamental que dichas observaciones tienen para el marco teórico de la inmunología.

Como el conocimiento de estas variables circunstanciales no ha sido incorporado adecuadamente al marco conceptual inmunológico, ni se han establecido diseños experimentales sistemáticamente encaminados al estudio y análisis fino de la participación de eventos circunstanciales en las propiedades de la reacción, nos propusimos iniciar su estudio sistemático. En esta tesis se resumen los hallazgos principales que evalúan la hipótesis de la regulación de las propiedades de la reacción antígeno-anticuerpo por factores ambientales.

Se estudió el efecto del suero no-inmune (o normal) sobre la reacción antígeno-anticuerpo, ya que los componentes del suero constituyen el medio ambiente natural de los anticuerpos donde se llevan a cabo muchas de las reacciones con los antígenos. Los efectos de diferentes concentraciones de suero se evaluaron en reacciones antígeno-anticuerpo bien conocidas, como el DNP (Dinitrofenol) y el GAT (un antígeno sintético de fórmula $L-(\text{glu}^{60} \text{ala}^{30} \text{tir}^{10})_n$ y con peso molecular aproximado de 45 000 daltones) con sus respectivos anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad. Los ensayos se realizaron en solución o fijando los anticuerpos a una fase sólida, como un simil de receptores celulares. Los resultados de las curvas de fijación se analizaron a la manera de Scatchard

y de Sips para evaluar el efecto del medio ambiente sobre los parámetros de la reacción: a) la capacidad total de fijación de antígeno que tiene la población de anticuerpos (S_0); b) la constante de afinidad aparente y promedio de la reacción (K_0); y c) el índice de heterogeneidad (α).

Los hallazgos claramente demostraron que los componentes del suero normal modifican de manera importante a los parámetros de la reacción tanto en solución como en fase sólida. Se proponen explicaciones tentativas sobre la regulación de la respuesta inmune por factores ambientales, y se discuten algunas implicaciones que esta regulación pudiera tener sobre eventos inmunológicos, fisiológicos y patológicos.

MATERIALES Y METODOS

1. Diseño Experimental

Se estudió la fijación de los antígenos, $\text{DNP}_{24}\text{HSA-}^{125}\text{I}$ y $\text{GAT-}^{125}\text{I}$, y la del hapteno $\text{DNP-lis-}^3\text{H}$ a sus anticuerpos específicos, en presencia de diversas concentraciones de suero no-inmune, de suero decomplementado por calor, o de algunos componentes séricos, obtenidos de tres especies animales diferentes: borrego, conejo o cerdo.

Los estudios de fijación se llevaron a cabo por tres métodos:

- a) capacidad de fijación del antígeno por su anticuerpo puro acoplado a una fase sólida, como modelo de un receptor celular;
- b) precipitación - cuantitativa del antígeno radioactivo por su anticuerpo en solución, y
- c) diálisis en equilibrio cuando se exploró la capacidad de reconocimiento antigénico del hapteno por el sitio activo del anticuerpo.

2. Sistemas DNP-antiDNP

a) Inmunógenos

Se prepararon los antígenos $\text{DNP}_{24}\text{HSA}$ y $\text{DNP}_{23}\text{BSA}$ según el método de Eisen (35) haciendo reaccionar 2 g de seroalbúmina humana (HSA) o seroalbúmina bovina (BSA) con 1g de DNBS (ácido dinitrobencensulfónico, Eastman) en una solución de K_2CO_3 al 2%, a temperatura ambiente durante 24 horas. El DNBS libre se eliminó mediante diálisis exhaustivas contra amortiguador de fosfatos-salina (PBS; 0.15M , $\text{PO}_4^{=}$ 0.01M , pH 7.3). Las -

concentraciones proteicas finales se determinaron por el método de Lowry (36) y las relaciones molares DNP:HSA y DNP:BSA de las proteínas dinitro--feniladas se calcularon por la densidad óptica de los conjugados a 363 nm, utilizando como coeficiente de extinción molar para el grupo DNP, el factor 17530 (37).

b) Procedimiento de Inmunización

Los anticuerpos anti-DNP se obtuvieron mediante la inmunización de un borrego adulto y de un cerdo adulto, utilizando como antígeno el DNP₂₃ BSA. Se inyectaron 5 mg de antígeno cada 15 días, por vía intramuscular, utilizando adyuvante completo de Freund solamente en la primera inmunización. Los animales fueron sangrados una semana después de cada inmunización mediante punción de la vena yugular, obteniéndose 500 ml de sangre en cada ocasión. Se evaluó el contenido de anticuerpos séricos mediante el método convencional de Ouchterlony (38) de doble inmunodifusión en agar (Fig. 1). Solamente se purificaron los anticuerpos provenientes de sueros precipitantes.

c) Purificación de Anticuerpos anti-DNP

Para obtener la fracción de gamaglobulinas antiDNP se precipitó tres veces el antisuero con sulfato de amonio saturado de acuerdo a métodos convencionales (39). La fracción gamaglobulínica obtenida se purificó mediante cromatografía de afinidad según el método de March (40). La gamaglobulina se incubó con el inmunoabsorbente, DNP-lisina acoplada -

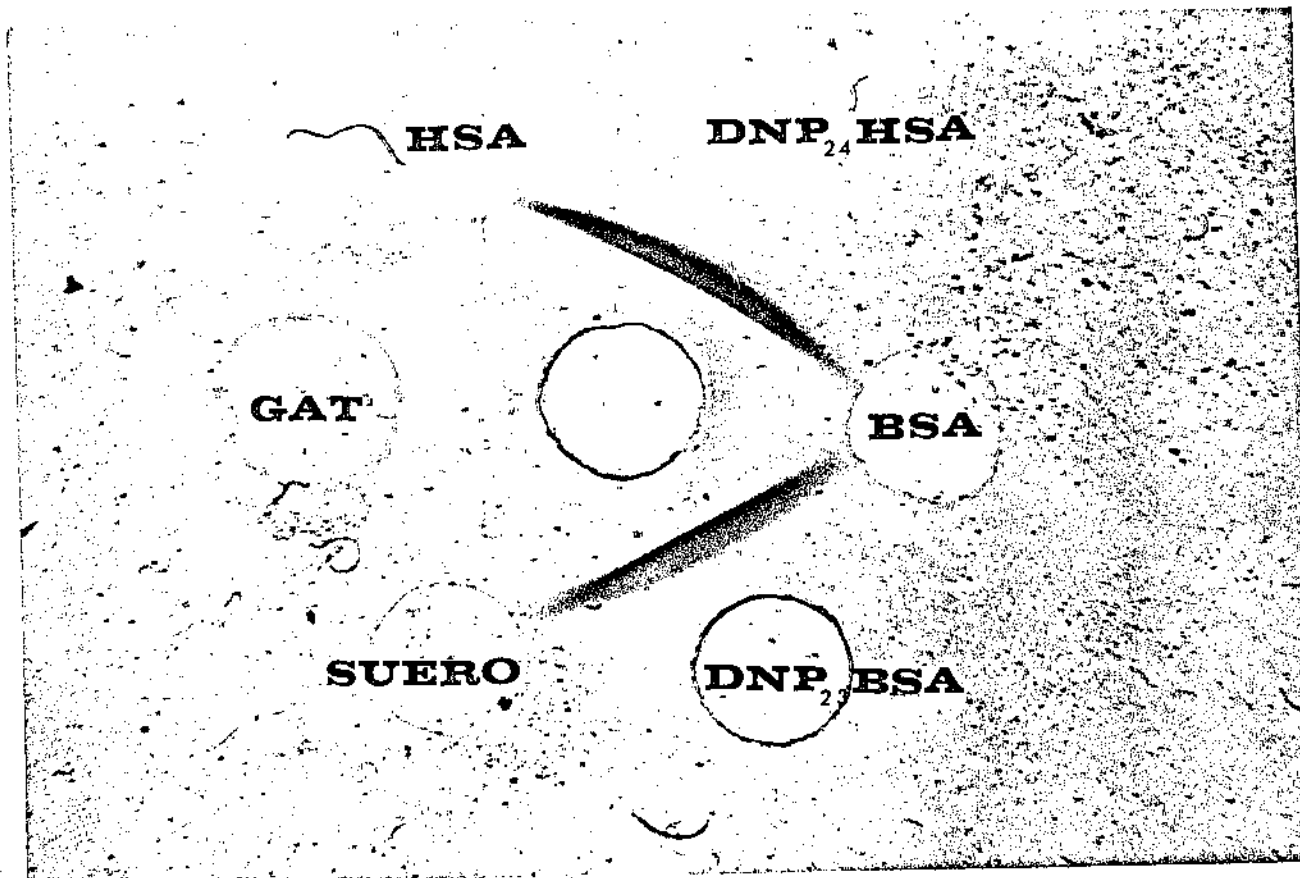


Figura 4. Doble inmunodifusión en gel de agar que nos muestra la especificidad de la población de anticuerpos antiDNP puros, ya que los anticuerpos precipitan exclusivamente con las proteínas dinitrofeniladas y no precipitan con las proteínas acarreadoras, ni con otros ligandos no relacionados, ni con el suero normal.

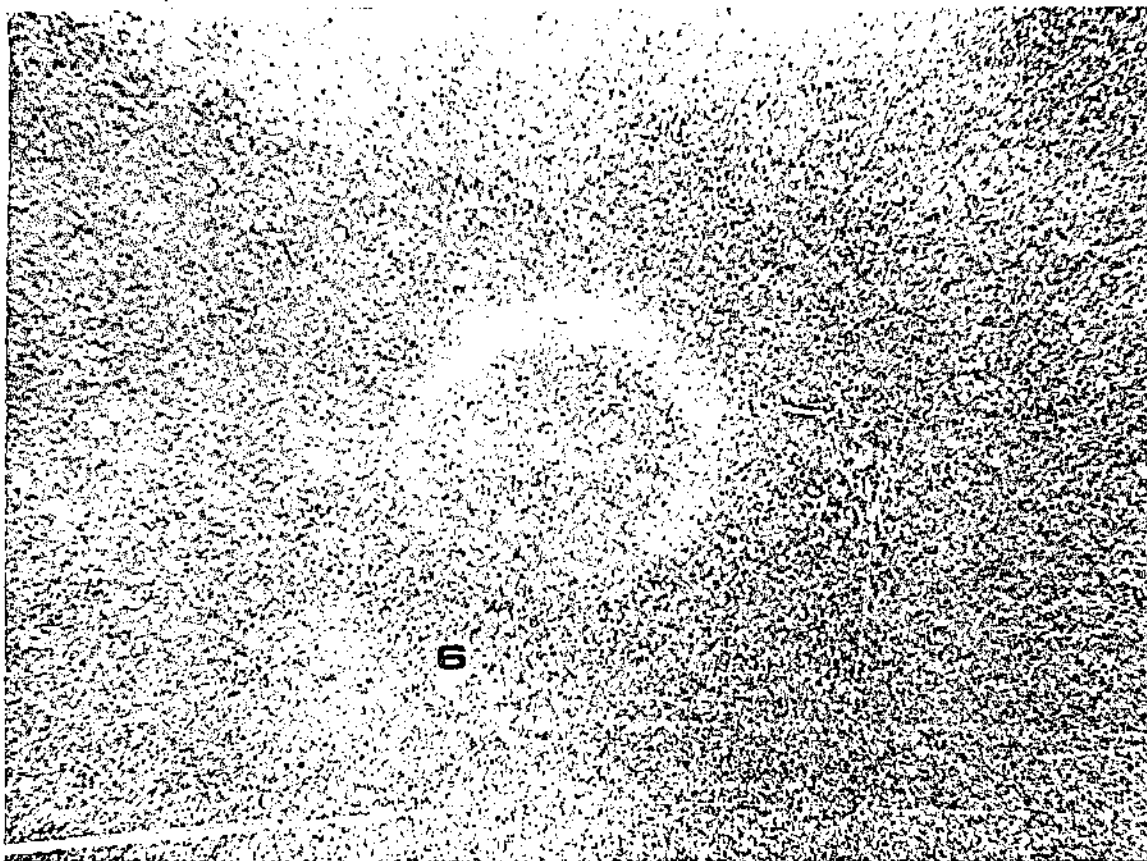


Figura 6. Autorradiografía de una doble inmunodifusión realizada con el antígeno --
 $\text{DNP}_{24}\text{HSA-}^{125}\text{I}$ y anticuerpos antiDNP puros. En el pozo central se colocaron los
anticuerpos y en los pozos exteriores se colocó al antígeno a distintas concen-
traciones. Se observa banda de precipitación radioactiva en todos los pozos -
conteniendo antígeno iodinado menos en el pozo que contiene antígeno sin mar--
car (pozo #6). Los resultados demuestran que se logró iodinarse al $\text{DNP}_{24}\text{HSA}$ sin
lesionar su capacidad de reaccionar con los anticuerpos antiDNP.

llada por Englander (43):

$$\frac{H_t}{\text{molécula P}} = \frac{110.8}{1.21} \times \frac{\epsilon_m}{A_t} \times \frac{T_t}{T_0}$$

donde 110.8 se refiere a la cantidad en miligramos de hidrógeno por gramo de agua; 1.21 a una constante que corrige la ligera preferencia de las -- proteínas por el tritio en lugar del hidrógeno; ϵ_m al coeficiente de -- extinción molar; T_t son las desintegraciones por minuto del tritio al -- tiempo t; y A_t es la absorbancia de la muestra de proteína al mismo tiempo T, y T_0 son las desintegraciones por minuto de tritio en la mezcla al equilibrio.

6. Técnicas Inmunológicas

a) Microprecipitación en Capilar. Esta técnica permite la -- rápida detección de un antígeno soluble o de anticuerpos precipitantes -- (39). Se coloca cuidadosamente una solución de anticuerpos sobre el antí -- geno de tal manera que se forme una interfase. Los dos componentes difun -- den hasta que se establece una relación óptima para la precipitación. -- Cuando esto ocurre se forma un anillo de precipitado cercano a la interfa -- se. Se usaron concentraciones del antígeno y del anticuerpo de 0.015625 hasta 1.0 mg/ml (diluciones 1:2). Se incubaron volúmenes iguales del an -- tígeno y del anticuerpo en tubos capilares no heparinizados (Microhemato -- crit), a las diferentes concentraciones, a temperatura ambiente y previa -- agitación. Se tomaron lecturas a las 24 horas de incubación para determi --

nar zonas de equivalencia de forma cualitativa.

b) Precipitación Cuantitativa. La precipitación cuantitativa se realizó en tubos de plástico cónicos con capacidad de 0.4 ml. Se incubaron 0.05 ml de solución de antígeno con 0.05 ml de la solución de anticuerpos purificados con una relación Ag:Ac de equivalencia, previamente determinada por precipitación capilar, en presencia de 0.15 ml de suero normal a diluciones en el rango de 1:1.25 a 1:4096. Los controles estaban constituidos por las mismas concentraciones de reactantes pero incubadas con 0.15 ml de PBS en lugar de suero. Los reactantes se incubaron 24 horas a temperatura ambiente y se centrifugaron por un minuto a 16,000 RPM. Los tubos se congelaron en hielo seco pulverizado y se cortaron en dos partes, la inferior conteniendo la fracción precipitada más una porción de la fracción libre, y la superior conteniendo el resto de la fracción libre (Fig. 8). Los estimados de las concentraciones de antígeno "pegado" y "libre" se calcularon por la radioactividad presente en ambas partes del tubo. El antígeno precipitado se calculó simplemente por la sustracción de la radioactividad presente en la parte superior, de la presente en la parte inferior, asumiendo que el volumen del precipitado era insignificante comparado al volumen total de la mezcla de reactantes, ya que la relación precipitado/volumen de reactantes era menor a 1:1000.

c) Capacidad de Fijación del Antígeno a su Anticuerpo acoplado a una Fase Sólida. Las perlas de vidrio cubiertas de anticuerpo se incubaron con 0.1 ml de 12 diferentes concentraciones del antígeno que iban de 3.26×10^{-8} a 9×10^{-6} M, en presencia de varias concentraciones de --

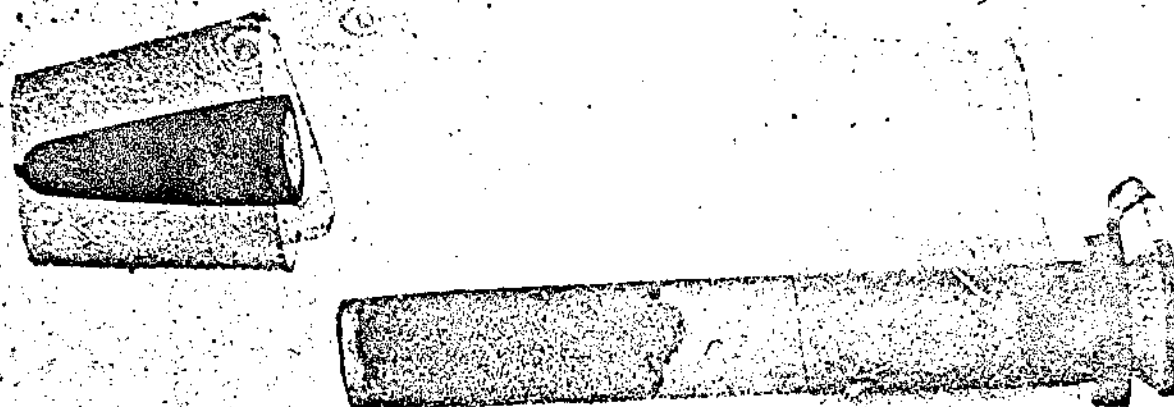


Figura 8. Tubos de plástico cónicos utilizados en la precipitación cuantitativa. Los tubos congelados se seccionaron en dos partes: la parte inferior conteniendo la fracción de antígeno precipitada por el anticuerpo, más una porción del antígeno libre, y la fracción superior solo contiene antígeno libre.

suero normal y de PBS para los controles. El ensayo también se efectuó -- incubando las perlas con diluciones de suero (1:1.25 a 1:4096) en presen- cia de tres diferentes concentraciones de antígeno: a) en equivalencia -- con el anticuerpo ($1.03 \times 10^{-6} \text{ M}$ y $1.56 \times 10^{-6} \text{ M}$ respectivamente); b) 10 -- veces más antígeno; y, c) 10 veces menos antígeno. Los controles se rea- lizaron en las mismas condiciones, pero utilizando PBS en lugar de suero normal. Después de incubar 24 horas a temperatura ambiente, se calculó -- la cantidad de antígeno fijado contando la radioactividad pegada a las -- perlas después de tres lavados exhaustivos con agua destilada. El anti- geno libre se calculó contando alícuotas de 0.1 ml tomadas de la mezcla -- de incubación.

d) Diálisis en Equilibrio. Para estudiar la fijación del -- ligando radioactivo DNP-lis-³H a los anticuerpos antiDNP purificados, me- diante diálisis en equilibrio se utilizó una concentración de anticuerpos de 2.0 mg/ml ($1.33 \times 10^{-5} \text{ M}$) diluída 1:1 en suero normal para obtener una concentración final de 1.0 mg/ml ($6.7 \times 10^{-6} \text{ M}$) o diluído en la misma for- ma en PBS para los controles. Los anticuerpos se dializaron contra 12 -- concentraciones diferentes del hapteno, desde 2.8×10^{-9} hasta $7.06 \times 10^{-6} \text{ M}$, cada una diluída 1:1 en suero normal o en PBS los controles. Los experi- mentos se realizaron en un aparato de multidiálisis a 4°C (Fig. 9). En -- este sistema el equilibrio se alcanzó al séptimo día, cuando se extrajeron 0.05 ml de cada cámara para estimar la concentración de ligando libre y -- del ligando unido a los anticuerpos. Las muestras se contaron en un apa- rato de centelleo líquido, usando como solvente 5 ml de solución de Bray.

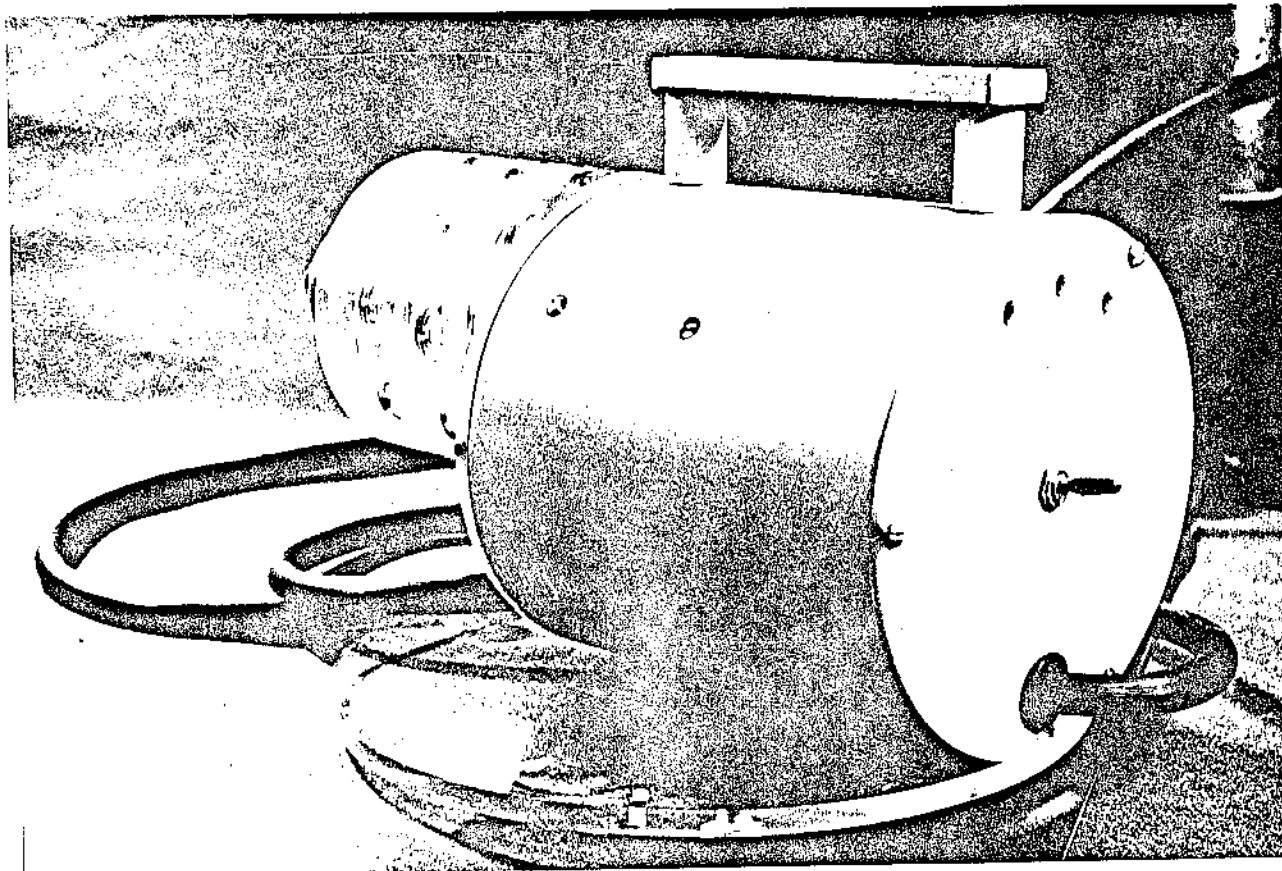


Fig. 9. Aparato multializador utilizado en los experimentos de diálisis en equilibrio. La membrana de diálisis se coloca entre las dos mitades de cada módulo, que son complementarias. En un lado de la cámara se colocan los anticuerpos y en el opuesto, el hapteno marcado radioactivamente. Los orificios de las cámaras se tapan con cinta adhesiva. El aparato gira los módulos y cada mezcla se agita con una pequeña burbuja que contiene cada cámara. Al alcanzar el equilibrio de difusión, se toman muestras de cada cámara para su conteo.

7. Análisis Matemático de los Parámetros de la Reacción.

La concentración molar de sitios de fijación para el antígeno, en el sistema, o capacidad total de fijación (S_0), se estimó por el intercepto en la abscisa de la gráfica de Scatchard (44) que relaciona la concentración molar del antígeno pegado (P) sobre el libre (L) en contra del antígeno pegado

$$\frac{P}{L} = K_0 (S_0 - K(P))$$

Debido a la curvatura que frecuentemente se observa al graficar al modo de Scatchard, se determina la constante de afinidad aparente (K_0), o constante de avidéz, mediante la regresión lineal de la gráfica de Sips (45)

$$\log \frac{r}{1-r} = a \log K_0 + a \log L,$$

donde r es la proporción del antígeno fijado en relación a la capacidad total de fijación del sistema ($(P)/(S_0)$) y a es el índice de heterogeneidad que parte del valor cero y se aproxima a la unidad al reducirse la heterogeneidad de fijación de la reacción.

Modelo Teórico Matemático

Como complemento al trabajo experimental contenido en esta tesis se desarrolló un modelo matemático que permitiera analizar cambios en la fijación del antígeno a su anticuerpo específico debidos a inhibición competitiva o a regulación alostérica (Ver Apéndice).

Las ecuaciones se basaron en la derivación que hizo Langmuir (46) de la ley de acción de masas (Isoterma de Langmuir), posteriormente adoptada por Klotz (47)

$$r = \frac{n K (A)}{1 + K(A)} = \frac{\text{moles de ligando fijado}}{\text{moles de proteína total}} \quad (1)$$

o en su forma inversa:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1}{n K (A)} \quad (2)$$

que permite el análisis gráfico

En presencia de un inhibidor competitivo la ecuación (2) se modifica en su pendiente:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1 + K_i (I)}{n K_a (A)} \quad (3)$$

En cambio, en presencia de un regulador alostérico la ecuación (2) se modifica tanto en la pendiente como en el intercepto:

$$\frac{1}{r} = \frac{1 + K_i (I)}{n} + \frac{1 + K_i (I)}{n K_a (A)} \quad (4)$$

Se probó experimentalmente la validez del modelo mediante la técnica de diálisis en equilibrio. Se utilizó como ligando a la DNP-lis-³H y anticuerpos antiDNP purificados por cromatografía de afinidad. Como -- inhibidor competitivo se utilizó DNP-lis no marcada y como regulador alostérico al clorhidrato de guanidina, compuesto desnaturizante que al romper los enlaces de hidrógeno desdobla las moléculas de proteína hasta su estructura secundaria (48). Se utilizó una concentración de inhibidor -- competitivo de 6×10^{-5} M, concentración capaz de inhibir la reacción en un 65% y por tanto permitía su análisis gráfico. El clorhidrato de guanidina se utilizó a la concentración de 6M, ya que a esta concentración se reporta la desnaturización de la gamaglobulina (49).

Como se observa en la Tabla 2 y en la Figura 10 el inhibidor competitivo produce alteración en la pendiente de la curva y el regulador alostérico afecta tanto la pendiente como el intercepto de la curva, tal y como lo predicen las ecuaciones teóricas.

TABLA 2

	Intercepto X 10 ⁻²	Pendiente X 10 ⁴	Coef. correlación lineal
Control PBS	2.88	0.642	0.98
Inhibidor competitivo DNP-lisina	2.39	3.70	0.99
Regulador alostérico Clorhidrato de guanidina	15.1	4.61	0.93

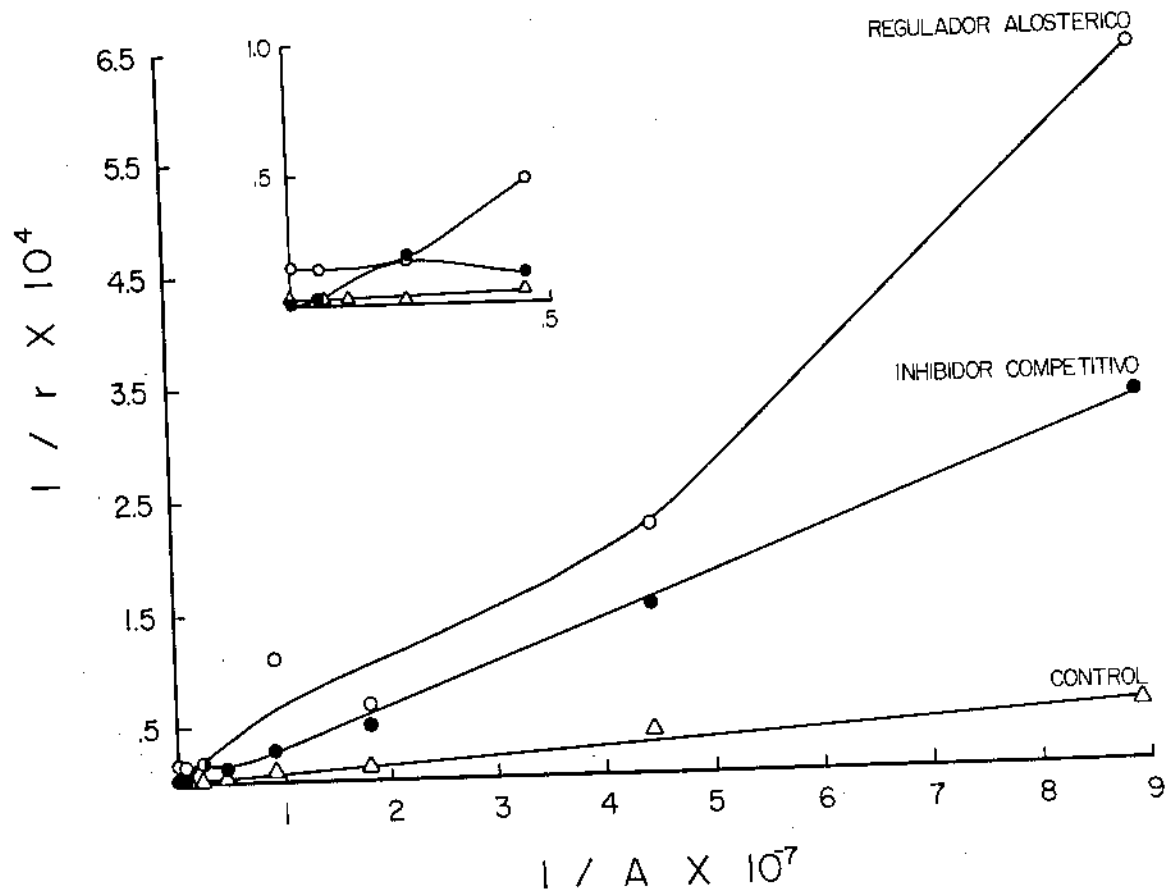


Figura 10. Curva que representa el efecto que tienen un inhibidor competitivo y un regulador alostérico sobre la reacción antígeno-anticuerpo. El recuadro muestra la diferencia en interceptos producida al ensayarse la reacción con un regulador alostérico. Es notorio el cambio tan importante de pendiente causado por ambos, el inhibidor y el regulador.

III. RESULTADOS

La Tabla 3 muestra los experimentos que se realizaron para probar la hipótesis de la regulación de la reacción antígeno-anticuerpo por componentes no inmunes del suero. En esta tabla se resume el planteamiento de los experimentos, el sistema antigénico empleado y la metodología utilizada en cada uno de los ensayos con el fin de hacer más clara la exposición de los resultados.

1. Efecto Modulador del Suero Normal Homólogo sobre la Reacción Antígeno-Anticuerpo.

Se estudió el efecto del suero normal homólogo sobre los tres sistemas antígeno-anticuerpo utilizados: DNP-antiDNP de borrego, DNP-antiDNP de cerdo, GAT-antiGAT de conejo. El ensayo se realizó primero en fase sólida, incubando las perlas de vidrio previamente acopladas con el anticuerpo, con su antígeno específico marcado radioactivamente con ^{125}I , ambos a concentraciones constantes, en presencia de diluciones del suero homólogo no-inmune, utilizando como control perlas incubadas en presencia de PBS en lugar de suero. Se observó una marcada inhibición de la fijación del antígeno a su anticuerpo acoplado a la fase sólida al aumentar la concentración de suero, llegando a fijarse únicamente 61.55% del antígeno en el sistema antiDNP de cerdo y 25.22% en el sistema antiDNP de borrego, comparados al control (PBS = 100%), en contraste, el sistema GAT no se alteró por la presencia del suero homólogo no-inmune, obteniéndose

TABLA 3

Resultados	Sistema	Método
I. Efecto modulador del suero normal homólogo sobre la reacción Ag-Ac	DNP- borrego DNP- cerdo GAT- conejo	Precipitación cuantitativa y Fase sólida
II. Determinación de los parámetros de la reacción Ag-Ac	DNP- borrego GAT- conejo	Fase sólida
III. Variables que afectan el efecto modulador del suero normal sobre la reacción Ag-Ac		
A) tiempo	DNP- borrego	Fase sólida
B) afinidad	DNP- borrego	Precipitación cuantitativa
C) complejo de diversa relación antígeno-anticuerpo	DNP- borrego DNP- cerdo GAT- conejo	Fase sólida
D) efecto de sueros heterólogos	DNP- cerdo GAT- conejo	Precipitación cuantitativa y Fase sólida
IV. Fracción sérica responsable	DNP- borrego	
A) efecto de macro y micromoléculas		Fase sólida
B) efecto de IgG normal y albúmina		Fase sólida
C) efecto de complemento		Precipitación cuantitativa
D) efecto de calcio		Fase sólida y Precipitación cuantitativa
V. Efecto alostérico del suero	DNP- borrego	
A) cinética de intercambio de hidrógeno		Intercambio H ⁺
B) aplicación del modelo matemático		Fase sólida
VI. Efecto modulador del suero sobre la reacción hapteno-anticuerpo	DNP- borrego	Diálisis en equilibrio

una fijación del antígeno del 107.08% (Fig. 11).

Este fenómeno es muy reproducible como se aprecia en la Figura 12, ya que el porcentaje de inhibición obtenido al ensayar cinco sueros diferentes de borregos no-inmunes variaron únicamente en un 0.5%.

Para descartar que este fenómeno sea debido exclusivamente a un fenómeno de impedimento estérico por una simple adsorción de las proteínas séricas a la fase sólida que resultara en un encubrimiento de los anticuerpos, se repitieron los experimentos para los tres sistemas antígenicos utilizando el método de precipitación cuantitativa. Se realizaron precipitaciones del antígeno marcado radioactivamente con ^{125}I por su anticuerpo, ambos a concentraciones constantes e incubados en presencia de diluciones seriadas de suero. En estos experimentos se encontró un marcado aumento de la precipitación en el sistema GAT, hasta cuatro veces los valores control (PBS = 100%) mientras que en ambos sistemas DNP se encontró una curva bifásica: aumento de la precipitación a concentraciones séricas de 1:8 hasta 1:64, seguido de una inhibición que aumentó al aumentar la concentración sérica, llegando a una inhibición final del 33.77% para el suero de borrego y de hasta 70.82% para el suero de cerdo (Fig. 13).

También se probó el efecto del suero no-inmune sobre curvas de precipitación cuantitativa, variando la concentración de anticuerpos puros. Este experimento se realizó utilizando el sistema DNP-antiDNP de borrego, manteniendo la concentración del antígeno constante, y ensayando

tres concentraciones diferentes de suero: 1:1.25, 1:16 y 1:1000; además se ensayó en presencia de PBS como control. Nótese (Fig. 14) nuevamente la inhibición de la precipitación debida a altas concentraciones del suero y la facilitación de la precipitación utilizando suero diluído 1:16. Es interesante notar que las curvas de precipitación llegan a su equivalencia a una concentración de anticuerpos entre 3.5 y 4.5 mg/ml al ensayarse en PBS o suero diluído 1:1000, mientras que al ensayarse a las concentraciones altas de suero, no se alcanza la equivalencia ni aún a concentraciones de anticuerpos de 5.5 mg/ml.

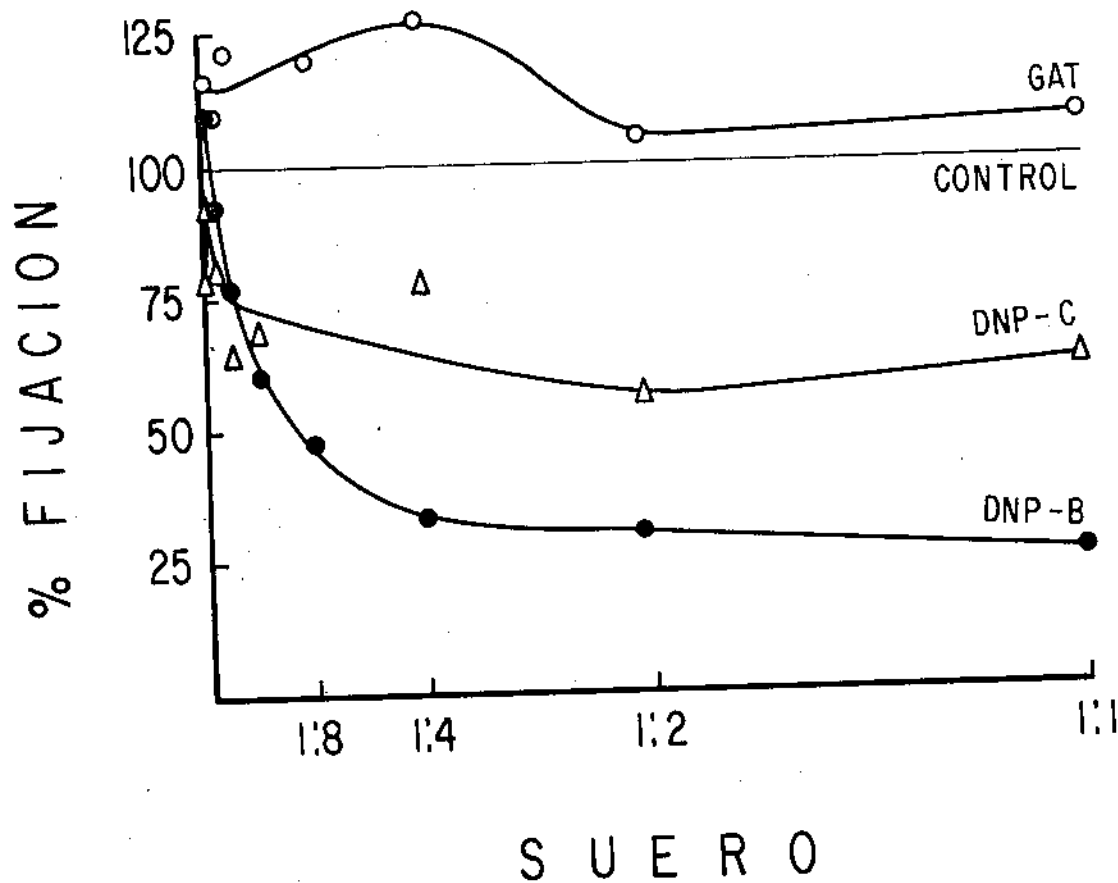


Figura 11. Curva de fijación de los antígenos DNP y GAT a sus anticuerpos específicos -- acoplados a una fase sólida. Nótese la inhibición obtenida en ambos sistemas DNP, de borrego y de cerdo, comparados al control, y el ligero efecto facilitador que se encuentra en el sistema GAT. Cada punto representa el promedio de triplicados.

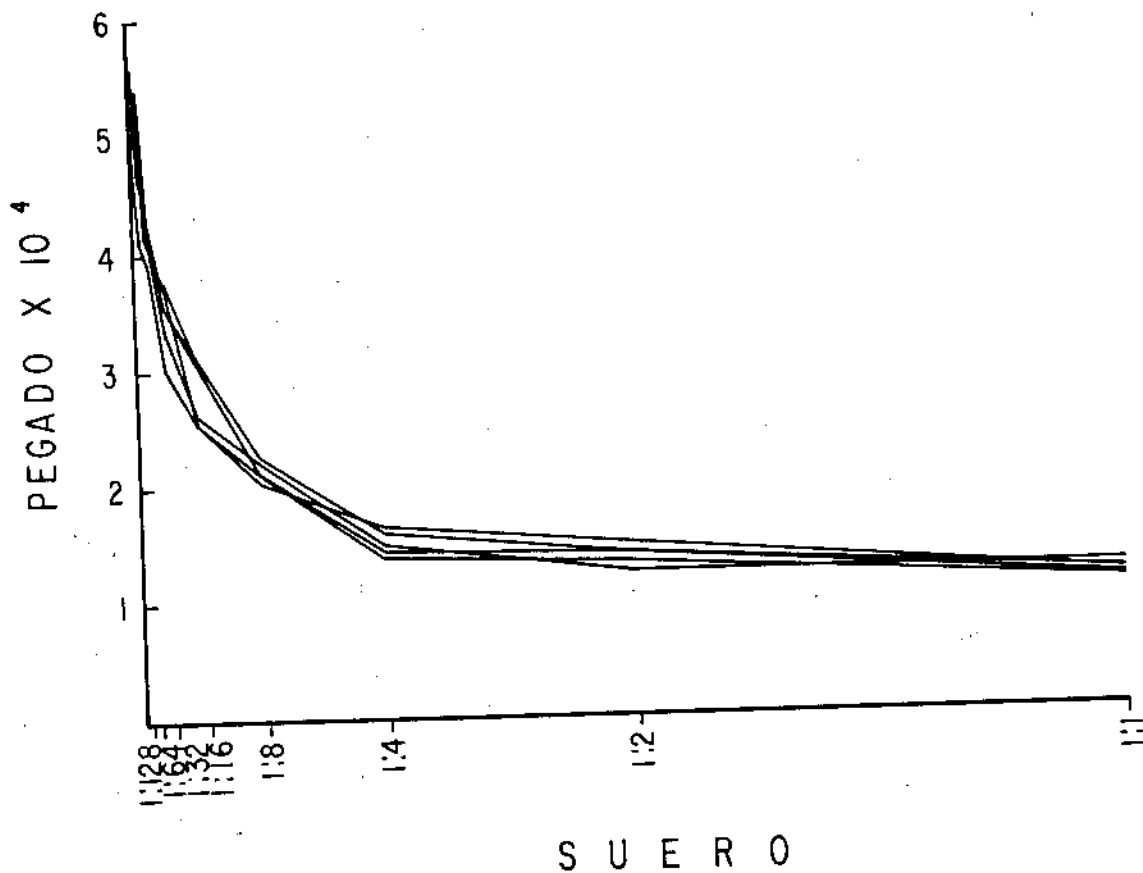


Figura 12. Curva de fijación del antígeno DNP₂₄HSA a su anticuerpo específico acoplado a una fase sólida. Cada inflexión representa el promedio de triplicados y cada curva representa a un suero de borrego no-inmune diferente. Nótese la gran reproductibilidad del fenómeno, y la gran inhibición que se alcanza con este sistema, que llega a ser del 75% aproximadamente.

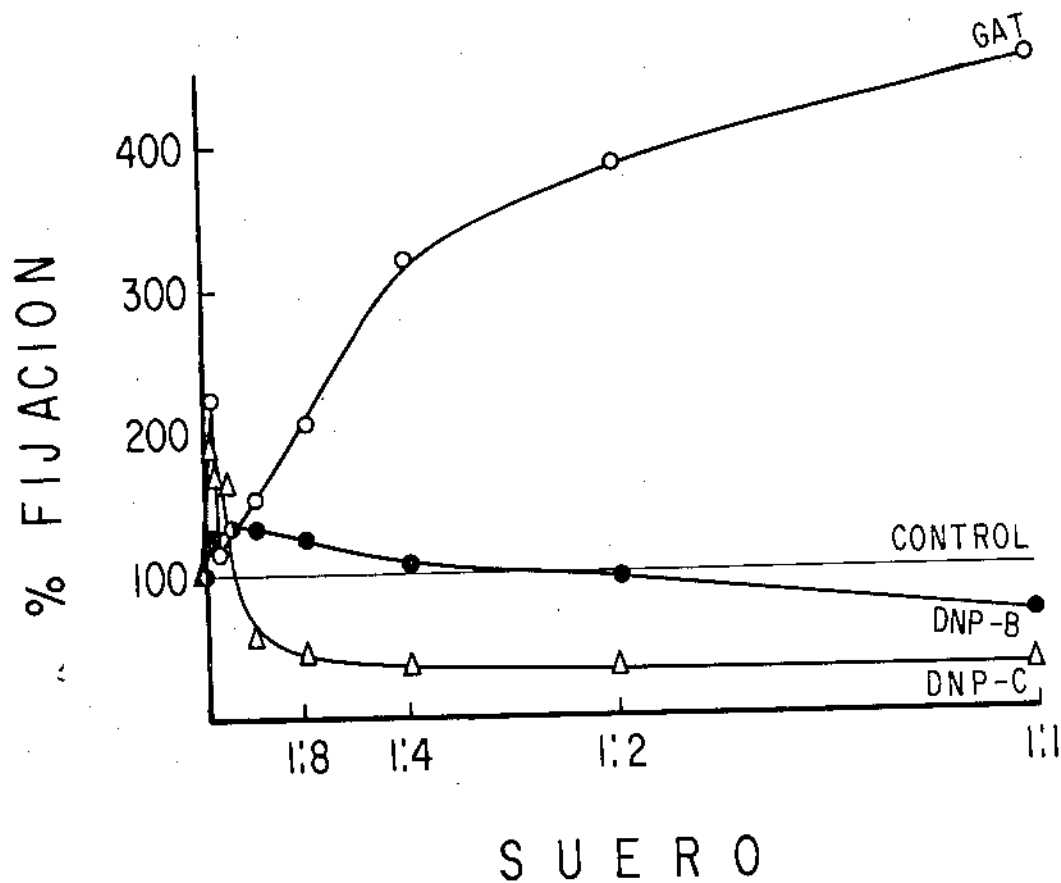


Figura 13. Curva de precipitación de los antígenos DNP y GAT por sus anticuerpos específicos en presencia de diluciones seriadas de suero homólogo no-immune. Llama la atención la gran facilitación de la precipitación para el sistema GAT, de hasta cuatro veces los valores controles, que contrastan con la inhibición obtenida en ambos sistemas DNP. También es interesante observar que las curvas de los dos sistemas DNP siguen un comportamiento bifásico, con facilitación de la precipitación de hasta dos veces el valor control a diluciones de suero bajas, y la inhibición a concentraciones mayores de suero. Cada punto representa promedio de triplicados.

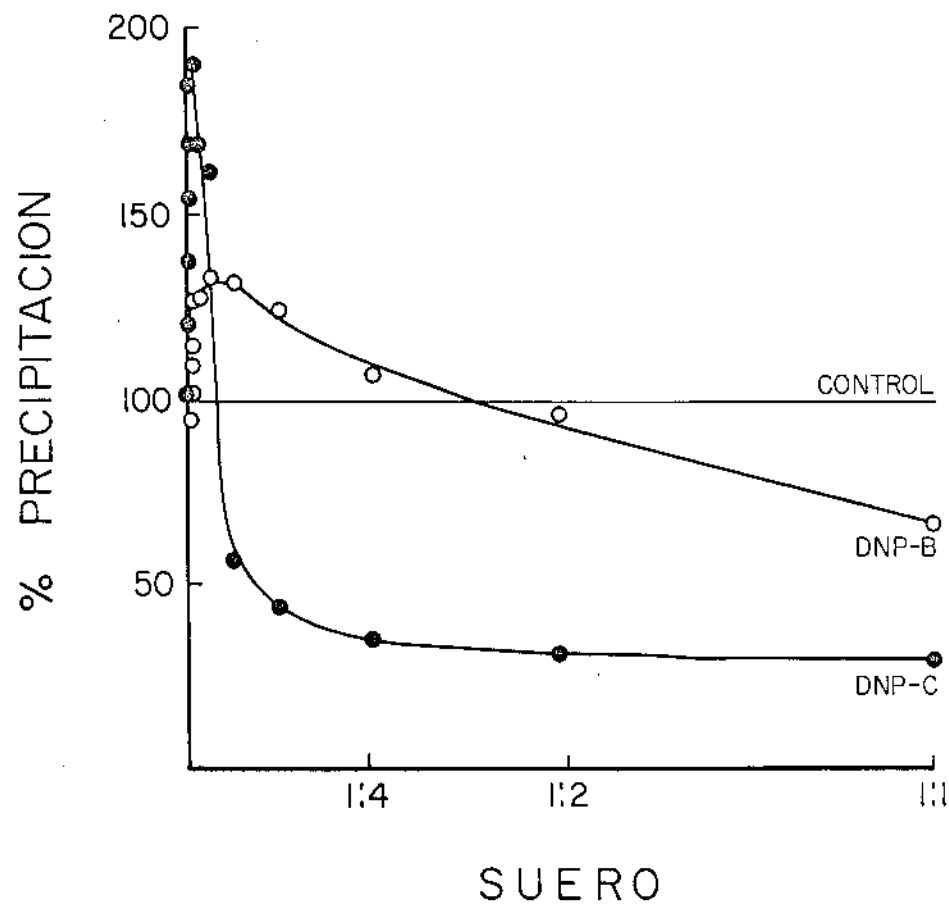


Figura 13'. Amplificación de las curvas de precipitación de los sistemas DNP-antiDNP de borrego y DNP-antiDNP de cerdo donde se observa el efecto facilitador a con centraciones bajas de suero.

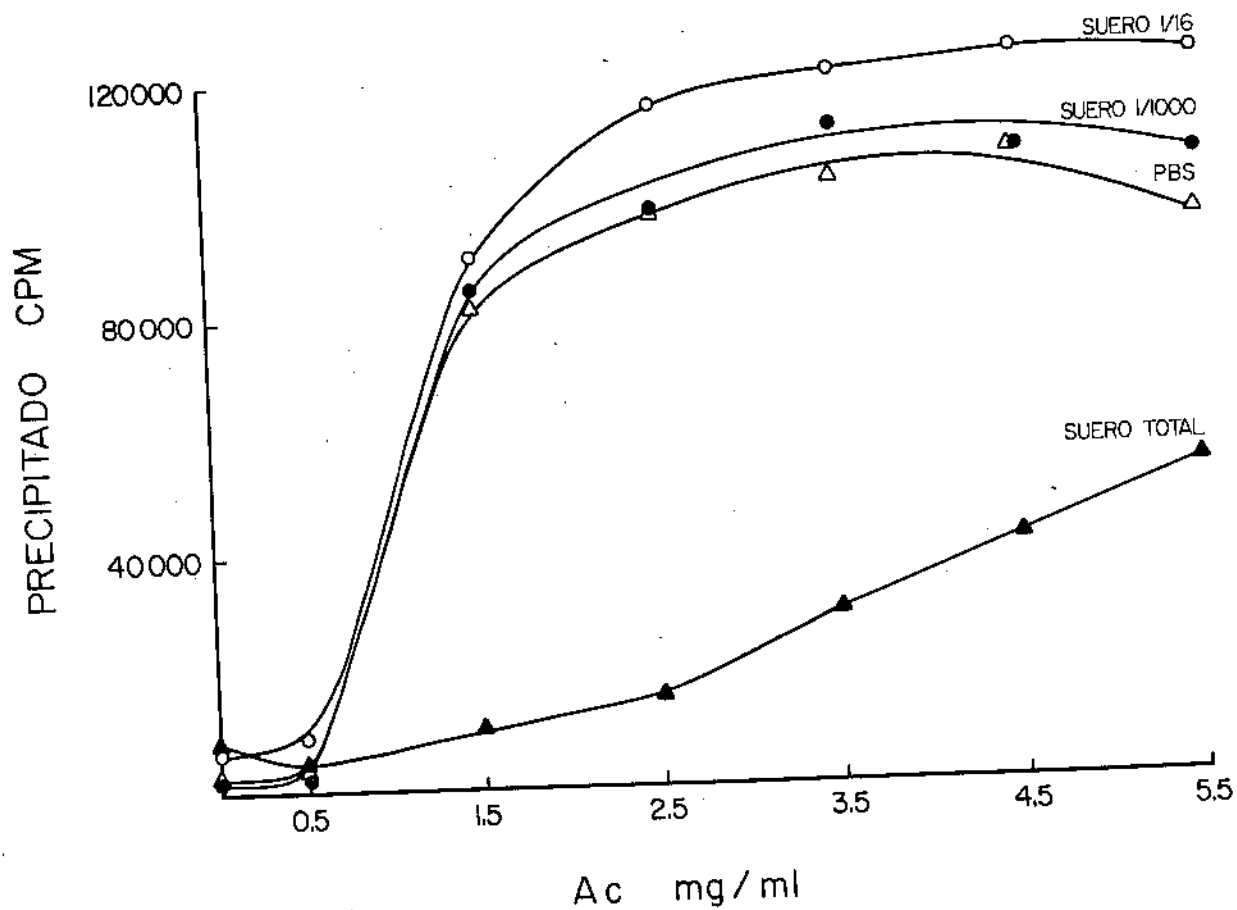


Figura 14. Efecto de suero no-inmune sobre una curva de precipitación cuantitativa en el sistema DNP-antiDNP de borrego. Nuevamente se observa la inhibición en altas concentraciones de suero y la facilitación a concentraciones de suero de 1:16. Obsérvese que a las concentraciones más altas de suero, se desplaza la zona de equivalencia hacia la derecha; indicando que se requiere un mayor número de anticuerpos para precipitar al antígeno. Cada punto representa el promedio de triplicados.

2. Determinación de la Constante de Afinidad (K_0), el Número de Sitios de Fijación (S_0) y el Índice de Heterogeneidad (a) de la Reacción Antígeno-Anticuerpo.

Para analizar de forma más fina el efecto modulador del suero normal sobre la reacción antígeno-anticuerpo se realizaron experimentos en los cuales se utilizaron concentraciones crecientes de los antígenos (GAT o DNP) marcados radioactivamente con ^{125}I y se ensayó su fijación a su anticuerpo específico acoplado a una fase sólida en presencia de tres diferentes concentraciones del suero normal homólogo: 1:1.25, 1:16, 1:1000 y en presencia de PBS como control. Además se repitió este diseño utilizando gamaglobulina no-inmune (a la misma concentración de los anticuerpos puros) acoplada al vidrio como medida de la fijación inespecífica a la fase sólida, fijación que fué restada posteriormente a los valores experimentales. Para determinar los parámetros de la reacción: la constante de afinidad aparente o promedio (K_0), el número de sitios de fijación (S_0) y el índice de heterogeneidad (a), se analizaron los resultados a la manera de Scatchard y de Sips. Nótese el efecto tan importante del suero normal sobre la reacción antígeno-anticuerpo en las gráficas de Scatchard cuando se ensaya el sistema DNP (Fig. 15), ya que al aumentar la concentración del suero se nota una franca distorsión de la pendiente, que prácticamente llega a ser horizontal, indicativo de una drástica reducción en la constante de afinidad; así mismo es notoria la modificación en el intercepto del eje de las abscisas indicativo de una disminución en el número de sitios activos de la reacción, datos que se corroboran nuevamente en el análisis de Sips (Tabla 4). Aunque en la Figura 15 solo se -

ejemplifican los datos obtenidos al ensayar al sistema DNP-antiDNP de --- borrego, los resultados obtenidos en el sistema DNP-antiDNP de cerdo son muy similares.

En el sistema GAT-antiGAT (Fig. 16) se observa una discreta - reducción en el valor P/L máximo que da por resultado una leve reducción en la constante de afinidad y cambios en el intercepto de la abscisa ind cativo de una disminución en el número de sitios activos en un 50% (Tabla 5). La Figura 17 analiza los cambios en los parámetros de la reacción de ambos sistemas, en forma gráfica.

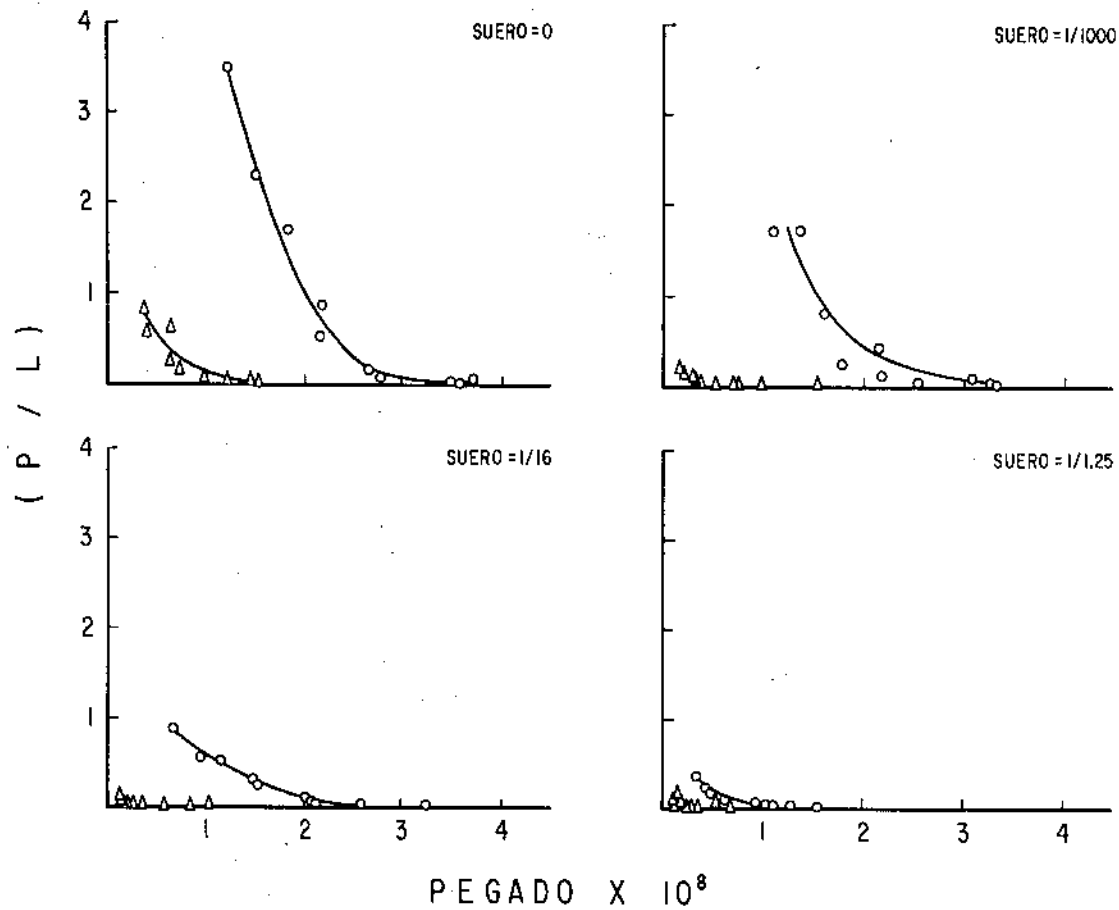


Figura 15. En esta figura se observa el efecto del suero no-inmune sobre los parámetros de la reacción, en la fijación del $DNP_{24}HSA$ a su anticuerpo puro acoplado a una fase sólida. Los círculos indican la fijación del antígeno a su anticuerpo y los triángulos indican la fijación del antígeno a gamaglobulina no-inmune, como un estimado de la fijación inespecífica. Obsérvese la distorsión que sufre la curva de Scatchard conforme se aumenta la concentración de suero en los ensayos: la pendiente (K_0) tiende a cero y el intercepto (S_0) disminuye. Se ejemplifica solo uno de los 3 ensayos realizados.

TABLA 4
SISTEMA DNP-antiDNP DE BORREGO

	$S_0 \times 10^8$	log K	$K^0 \times 10^{-8}$	a
PBS	1.739	8.549	3.54	.814
	1.7	8.83	6.76	.455
	1.75	9.01	10.23	.706
1/1000	2.094	8.854	7.14	.469
	2.179	8.84	6.91	.404
	1.83	8.82	6.60	.509
1/16	1.868	7.754	0.56	.937
	1.521	7.59	0.39	.588
	1.65	7.67	0.46	.469
1/1.25	0.93	6.38	0.024	.542
	0.608	5.3	0.002	.186
	0.797	6.65	0.044	.649

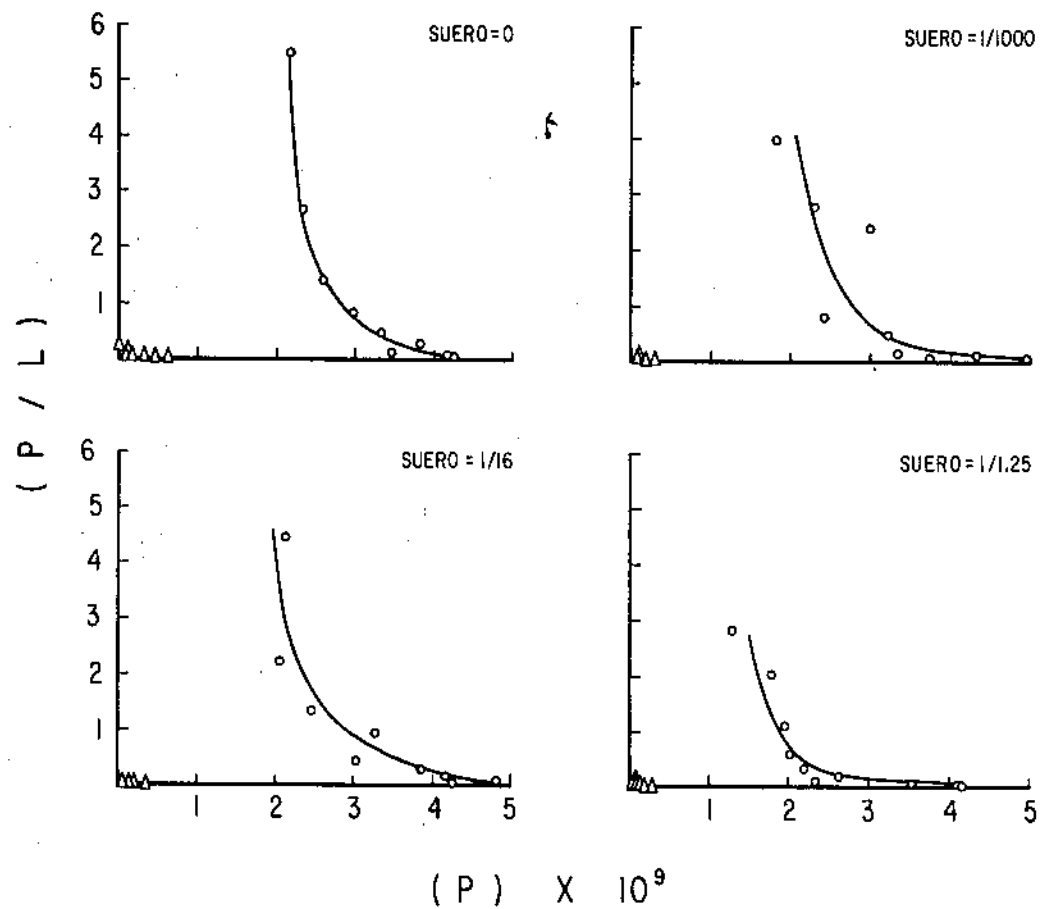


Figura 16. En esta figura se observa el efecto del suero no-inmune sobre los parámetros de la reacción, en la fijación de GAT- ^{125}I a su anticuerpo puro acoplado a una perla de vidrio. Los círculos indican la fijación del antígeno a su anticuerpo y los triángulos indican la fijación del antígeno a gamaglobulina no-inmune, como un estimado de la fijación inespecífica. Obsérvese el efecto que concentraciones crecientes de suero tienen sobre el número de sitios de fijación de la reacción (disminución del 40%). El efecto del suero sobre la constante de afinidad es menor en el sistema GAT, ya que solo reduce discretamente la pendiente. Se ejemplifica solo uno de los 3 ensayos realizados.

TABLA 5
SISTEMA GAT-antiGAT DE CONEJO

	$S^{\circ} \times 10^8$	log K	$K^{\circ} \times 10^{-8}$	a
PBS	3.70	8.34	2.18	.717
	3.02	8.31	2.04	.751
	3.31	8.58	3.80	.669
1/1000	3.52	8.47	2.95	.635
	3.21	8.81	6.45	.582
	3.55	8.28	1.90	.905
1/16	3.29	9.24	17.37	.342
	3.31	9.47	29.51	.474
	3.22	8.72	5.24	.588
1/1.25	2.26	7.55	0.35	.249
	2.27	7.88	0.75	.453
	2.36	7.81	0.64	.503

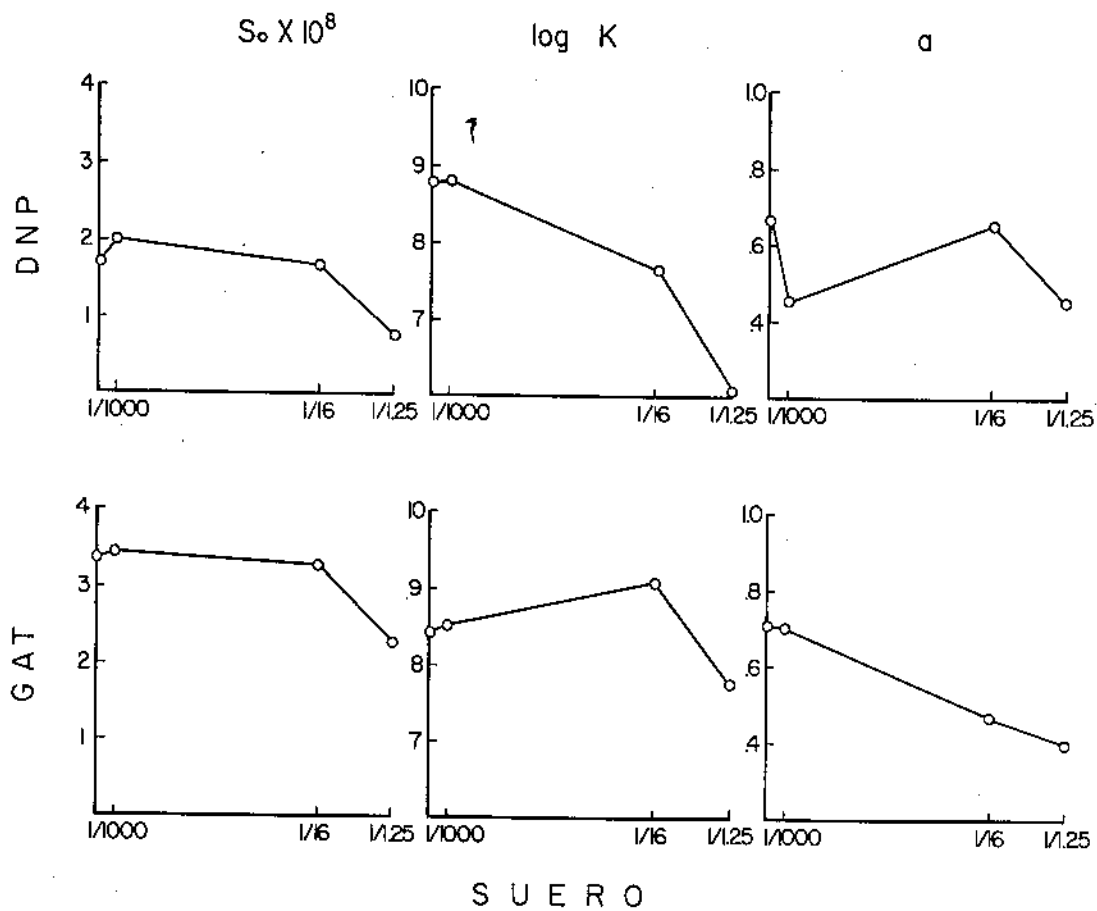


Figura 17. Efecto del suero no-inmune sobre los parámetros de la reacción en los sistemas DNP y GAT. Nótese los efectos tan notorios del suero sobre el sistema DNP en (S_o) y en (K_o) en contraste al efecto menor que tiene el suero, aún a altas -- concentraciones, sobre el sistema GAT, exceptuando su efecto sobre el índice de heterogeneidad (α).

3. Variables que Influyen Sobre el Efecto Modulador del Suero No-Inmune en la Reacción Antígeno-Anticuerpo

a) Tiempo

Para determinar si el suero normal afecta la cinética de fijación del antígeno a su anticuerpo específico acoplado a una fase sólida, se incubaron las perlas cubiertas con anticuerpo puro antiDNP de borrego con $\text{DNP}_{24}^{\text{HSA-}^{125}\text{I}}$, ambos a concentraciones constantes, en presencia de altas concentraciones del suero no-inmune. Se tomaron muestras a diferentes tiempos: 1 hora, 3 horas, 21 horas y 5 días, y se contó la radioactividad pegada a las perlas. Este mismo ensayo se realizó incubando en PBS como control. En la Figura 18 se observa la franca disminución de la fijación del antígeno al incubarse en presencia de suero, con respecto a los valores control, y esta inhibición no se modificó en los cinco días que se continuó el ensayo, demostrando la estabilidad del fenómeno.

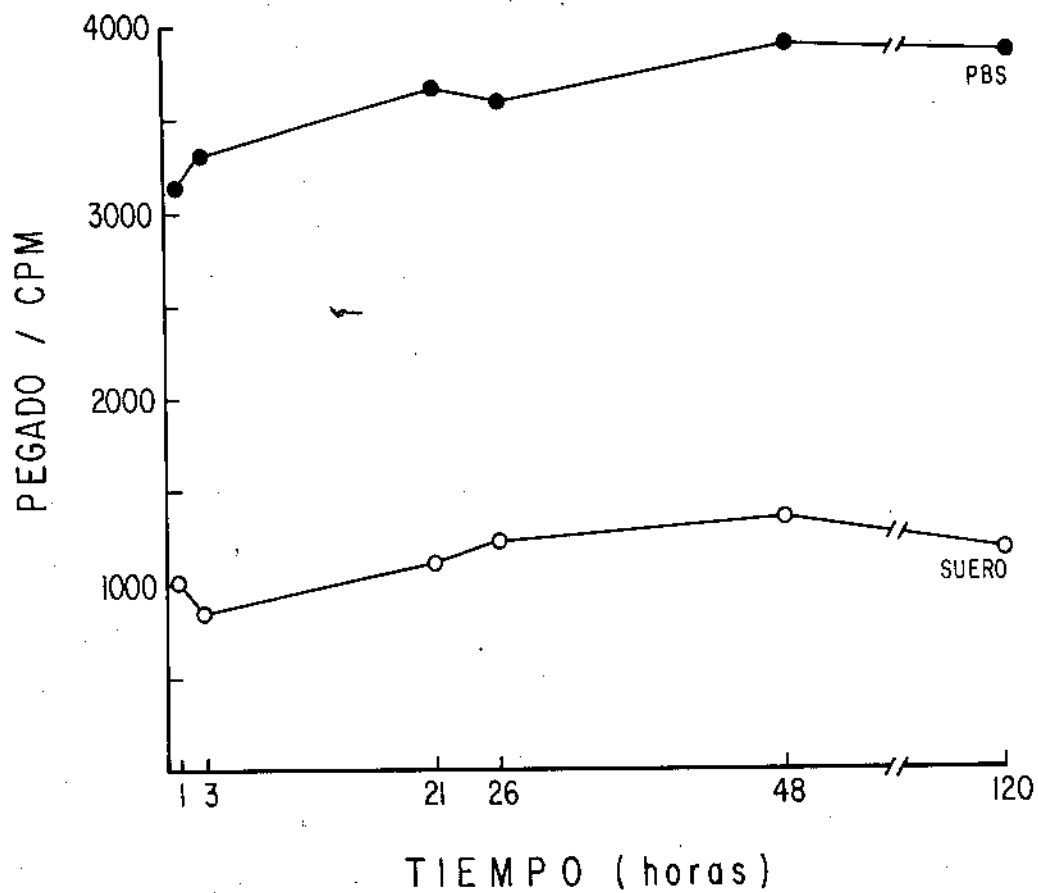


Figura 18. Cinética de fijación del antígeno, DNP₂₄HSA a su anticuerpo acoplado a una fase sólida. Obsérvese la reducción en la ²⁴ fijación al ensayarse en presencia de suero. La reacción es muy rápida, casi alcanzando el máximo antes de una hora y luego asciende mínimamente hasta las 48 horas para ya no alterarse significativamente hasta las 120 horas. Cada punto representa el promedio de triplicados.

b) Afinidad

Para probar si los efectos moduladores del suero afectan dife-
rentemente a anticuerpos de diversa afinidad, se ensayaron dos poblacio-
nes de anticuerpos mediante precipitación cuantitativa, la primera con --
una constante de afinidad aparente de 1.31×10^6 , y la segunda, con una -
constante de afinidad aparente de 1.7×10^4 , ambas a la misma concentra-
ción de 0.5 mg/ml (3.125×10^{-6} M). Los anticuerpos se incubaron en pre-
sencia de concentraciones constantes del antígeno, $\text{DNP}_{24}\text{HSA}^{125}\text{I}$ ---
(0.05 mg/ml, 1.11×10^{-6} M), y de diluciones seriadas de suero no-immune.
El valor control se obtuvo incubando el antígeno y los anticuerpos en pre-
sencia de PBS. Nótese (Figura 19) que la precipitación del antígeno por
el anticuerpo de baja afinidad, aumenta conforme se aumenta la concentra-
ción del suero, hasta un 140% (PBS = 100%). En cambio, al ensayarse la -
población de anticuerpos de alta afinidad, primero se advierte una facili-
tación de la precipitación hasta del 200% a concentraciones bajas de sue-
ro, seguido de una inhibición de hasta el 35% a concentraciones altas de
suero.

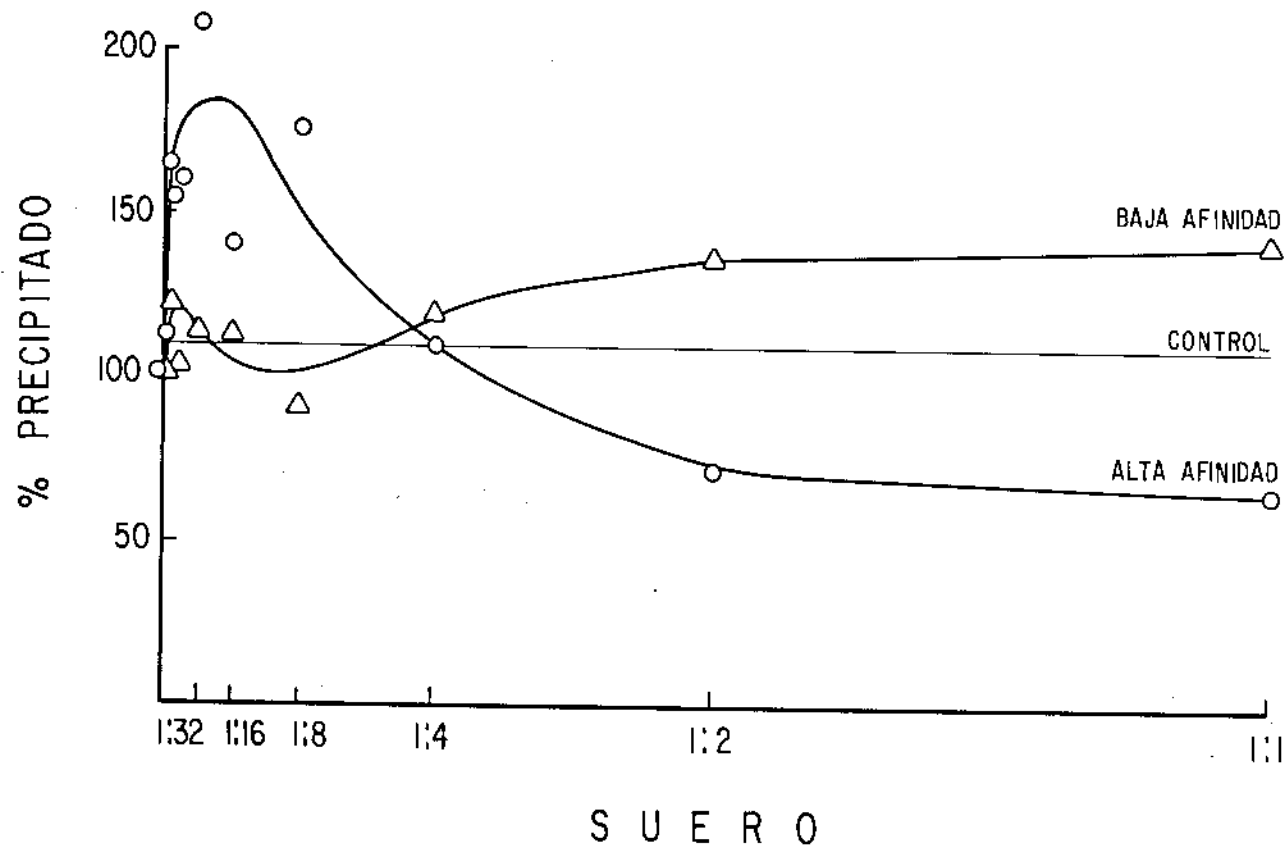


Figura 19. Efecto del suero no-inmune sobre la precipitación del antígeno DNP, por dos poblaciones de anticuerpos puros de distinta afinidad. Nótese que en presencia de la población de anticuerpos de menor afinidad (K_0 de $1,7 \times 10^4$) concentraciones crecientes de suero aumentan la precipitación del antígeno, en cambio, al ensayarse la población de anticuerpos de alta afinidad (K_0 de $1,31 \times 10^6$) primero se advierte una facilitación de la precipitación del antígeno a concentraciones bajas de suero, seguido de una inhibición a concentraciones altas de suero. Cada punto representa el promedio de triplicados.

c) Complejos Formados en Diversas Relaciones de Reactantes

Se ensayó el efecto modulador del suero sobre complejos antígeno-anticuerpo de diferente estructura, preparados con diversas relaciones Ag:Ac: a) en equivalencia con el anticuerpo, b) 10 veces más antígeno, y c) 10 veces menos antígeno. Este experimento se realizó con los tres sistemas antigénicos: DNP-antiDNP de borrego, DNP-antiDNP de cerdo y GAT-antiGAT de conejo. En los dos sistemas DNP se encontró que el grado de inhibición producido por el suero aumentó al disminuir la concentración de antígeno utilizada. En la Figura 20 se ilustra el ensayo realizado con el sistema DNP-antiDNP de borrego. En el sistema GAT-antiGAT se encontró el efecto opuesto, aumento de la inhibición con el aumento de la concentración del antígeno (Fig. 21).

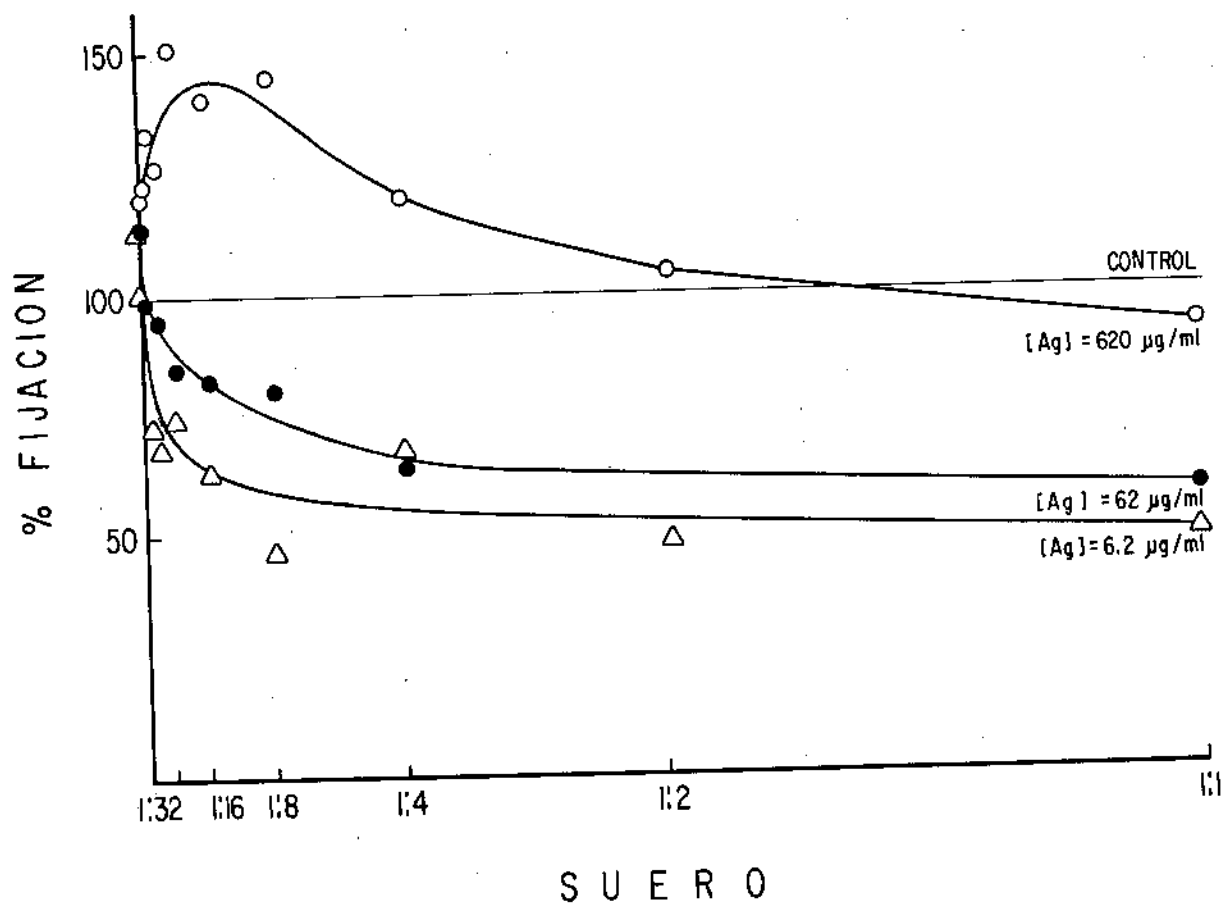


Figura 20. Efecto del suero no-inmune sobre las reacciones antígeno-anticuerpo, en distintas concentraciones relativas de antígeno y de anticuerpo, en el sistema DNP de borrego. Como se observa en la gráfica, el efecto inhibitorio del suero es mayor a -- bajas concentraciones de antígeno, para prácticamente desaparecer a altas concentraciones de antígeno. Cada punto representa el promedio de triplicados.

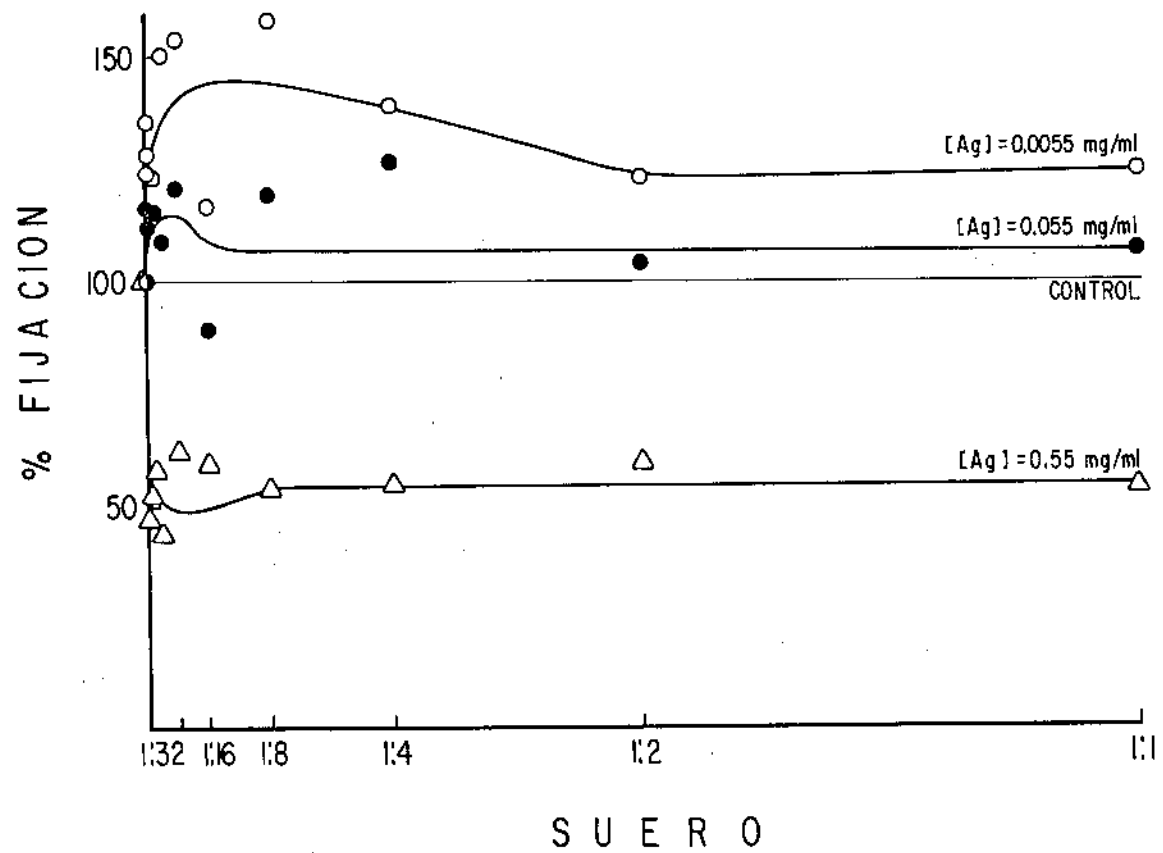


Figura 21. Efecto de suero no-inmune sobre las reacciones antígeno-anticuerpo, en distintas concentraciones relativas de antígeno y de anticuerpo, en el sistema GAT de conejo. La gráfica nos muestra el efecto inhibitorio del suero a altas -- concentraciones del antígeno y el efecto facilitador a concentraciones bajas del antígeno. Cada punto representa el promedio de triplicados.

d) Efecto de Sueros Heterólogos

Se probó el efecto de sueros heterólogos sobre los sistemas DNP-antiDNP de cerdo y GAT-antiGAT de conejo, ensayados mediante precipitación cuantitativa. El efecto inhibitorio del suero en el sistema DNP también se observó utilizando sueros heterólogos (borrego y conejo), aunque de menor magnitud, ya que de un 82.5% de inhibición para el suero homólogo, se redujo a un 64.53% para el suero heterólogo de borrego y un 53.12% para el suero heterólogo de conejo (Fig. 22). En cambio en el sistema GAT-antiGAT el efecto facilitador de la precipitación observado con el suero homólogo (del 456.32%), se conservó de la misma magnitud con el suero heterólogo de borrego (422.96%) (Fig. 23).

Los experimentos realizados en fase sólida también mostraron similitud de efectos entre el suero homólogo (cerdo) y el suero heterólogo (borrego) en el sistema DNP (Fig. 24), con disminución del número de sitios de fijación (S_0), de la constante de afinidad aparente (K_0) y del índice de heterogeneidad (a) comparados al control (PBS). En el sistema GAT (Fig. 25) también disminuyó el número de sitios de fijación (S_0) tanto con el suero homólogo (conejo) como con el suero heterólogo (borrego), y se observó diferencia en la constante de afinidad aparente (K_0), con incremento en la afinidad de una orden de magnitud usando el suero heterólogo (de borrego) y disminución en la afinidad de una orden de magnitud con el suero homólogo, comparados al control.

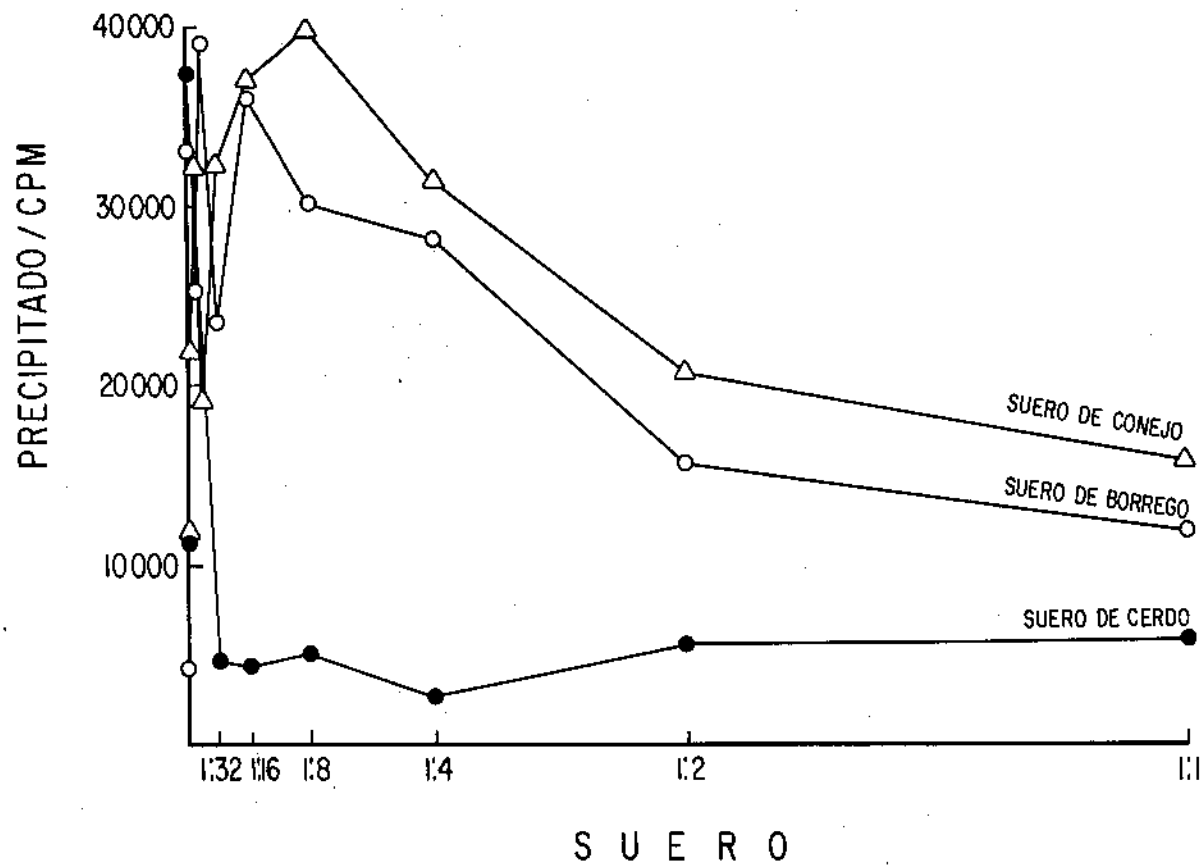


Figura 22. Efecto de sueros heterólogos sobre la reacción antígeno-anticuerpo en el sistema DNP. Se observa inhibición de la precipitación, tanto con los sueros heterólogos (conejo y borrego) como con el suero homólogo (cerdo). Obsérvese que la inhibición mayor se obtiene con el suero homólogo. Cada punto representa el promedio de triplicados.

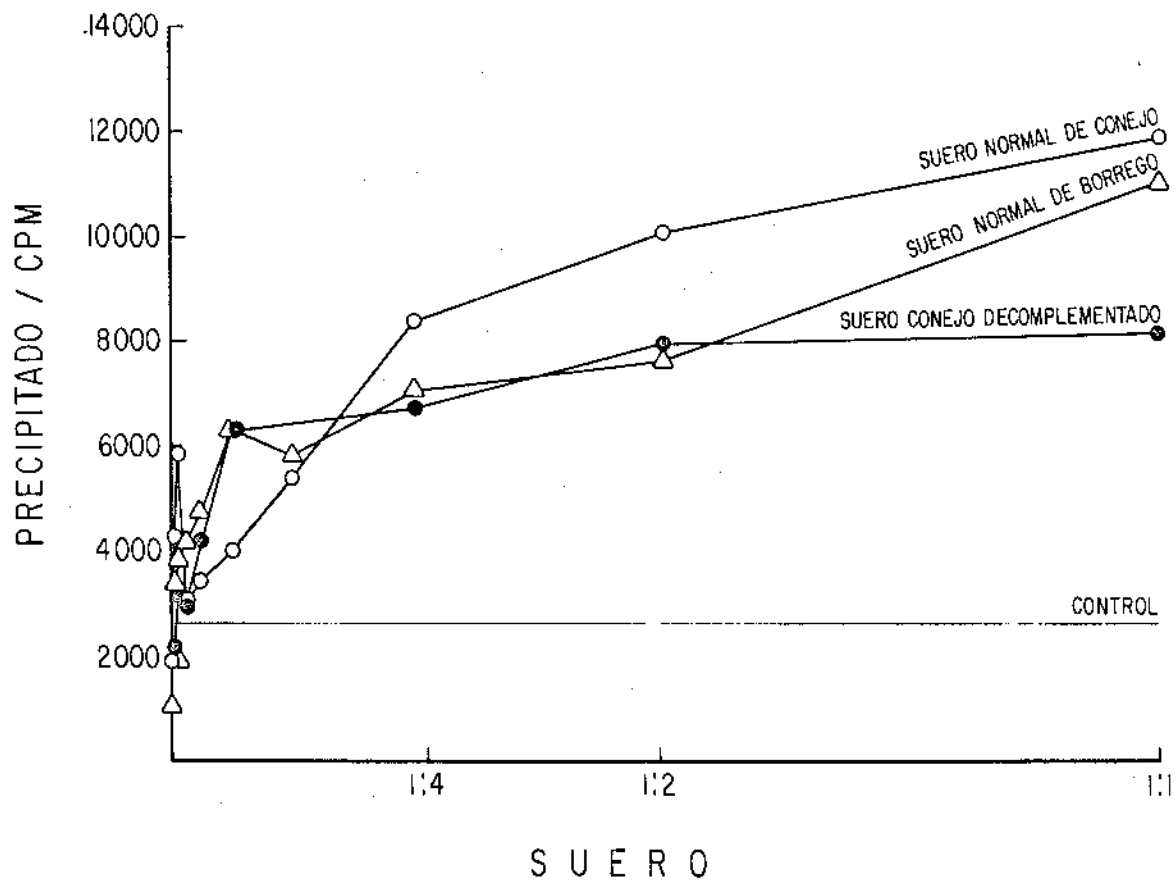


Figura 23. Efecto del suero heterólogo sobre la reacción antígeno-anticuerpo en el sistema GAT. Nótese el efecto facilitador de la precipitación utilizando el suero heterólogo. También se ilustra el efecto del suero homólogo de-complementado sobre la precipitación del antígeno. Este ensayo se discute en la siguiente sección. Cada punto representa el promedio de triplicados.

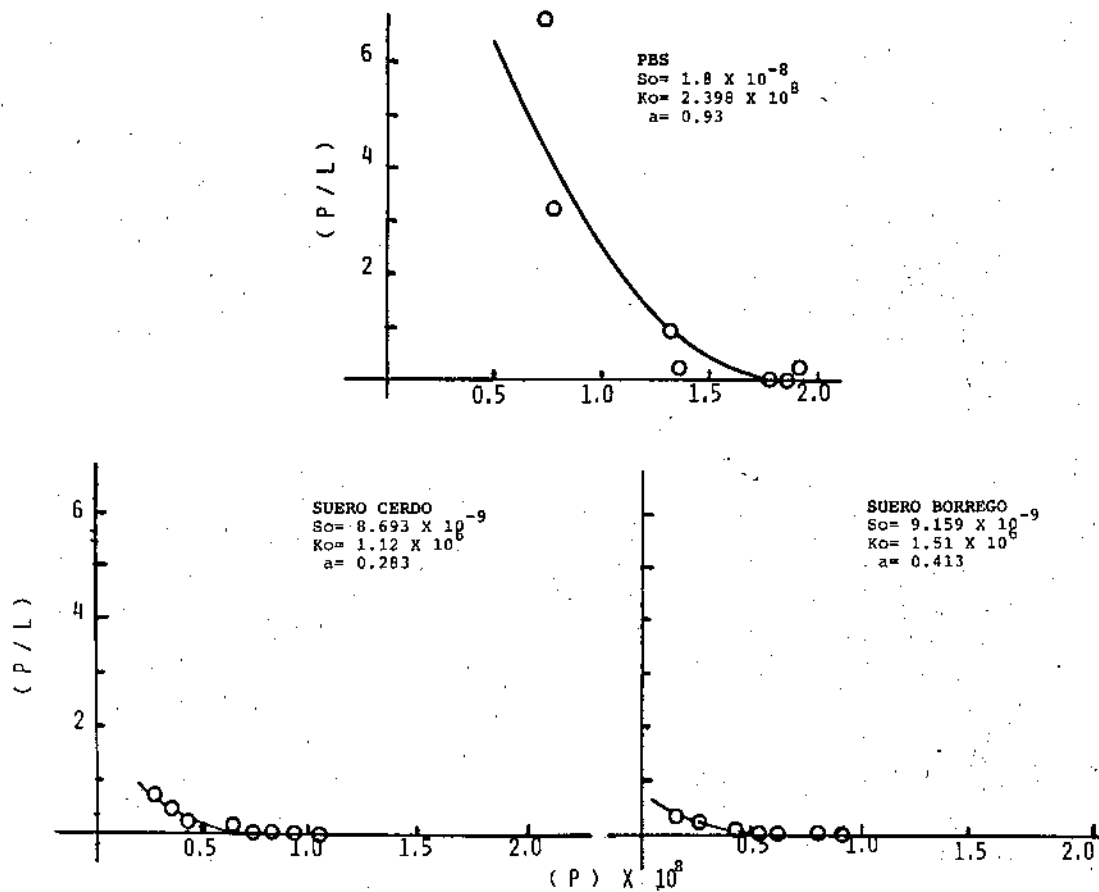


Figura 24. Efecto de sueros homólogo y heterólogo en la fijación del $DNP_{24}HSA$ a su anti-cuerpo acoplado a una fase sólida. En este sistema ambos sueros disminuyen el número de sitios de fijación (S_o) y la constante de afinidad aparente de la reacción (K_o).

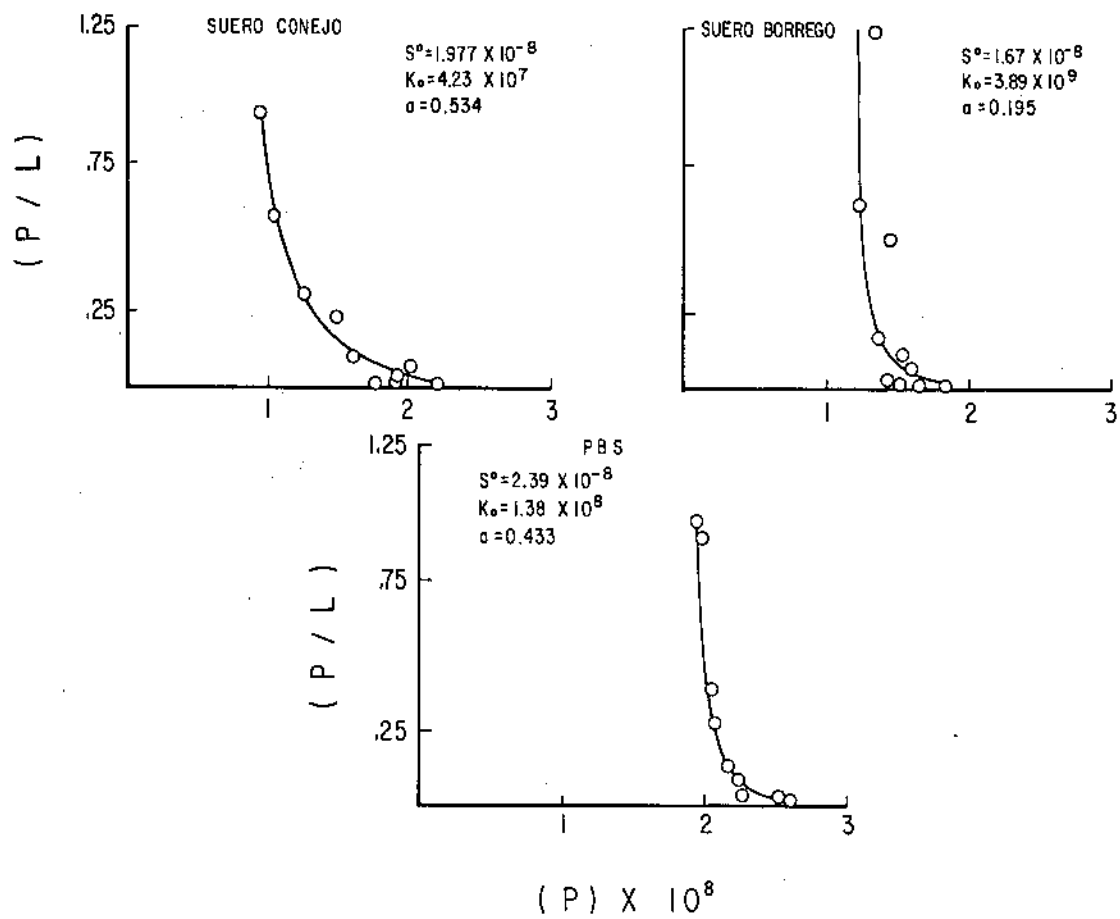


Figura 25. Efecto de sueros homólogo y heterólogo en la fijación del antígeno GAT a su anticuerpo acoplado a una fase sólida. En este sistema se observa que ambos sueros disminuyen el número de sitios de fijación (S_0) de la reacción; el suero heterólogo (borrego) aumenta el valor de la constante de afinidad aparente en un orden de magnitud y el suero homólogo lo disminuye, también en un orden de magnitud, comparados al control.

4. Fracción Sérica Responsable de la Modulación de la Reacción Antígeno-Anticuerpo

a) Efecto de Macromoléculas y Micromoléculas

Se fraccionó suero no-inmune de borrego en sus componentes macromoleculares (P.M. > 700) y micromoleculares (P.M. < 700) (Fig. 26) -- mediante cromatografía en Sephadex G-10 y se ensayó el efecto de ambas -- fracciones sobre el sistema DNP-antiDNP en fase sólida. El ensayo en fase sólida que se ilustra en la Figura 27 muestra que tanto los componentes macromoleculares como los micromoleculares tienen efecto inhibitorio sobre la reacción antígeno-anticuerpo y esta inhibición no es de carácter aditivo.

Se analizó el efecto de las fracciones macro y micromoleculares sobre los parámetros de la reacción. Como se observa en la Figura 28, al ensayar la fracción micromolecular se disminuyó el número de sitios de fijación (S_0) en un 30% y la afinidad aparente de la reacción en un orden de magnitud comparados al control (PBS). Al ensayar la fracción macromolecular, también se encontró disminución en el número de sitios de fijación, ahora de un 50%, y la constante de afinidad aparente disminuyó en aproximadamente tres órdenes de magnitud comparado al control. El efecto de la fracción macromolecular resultó ser muy semejante al efecto encontrado al ensayar suero concentrado.

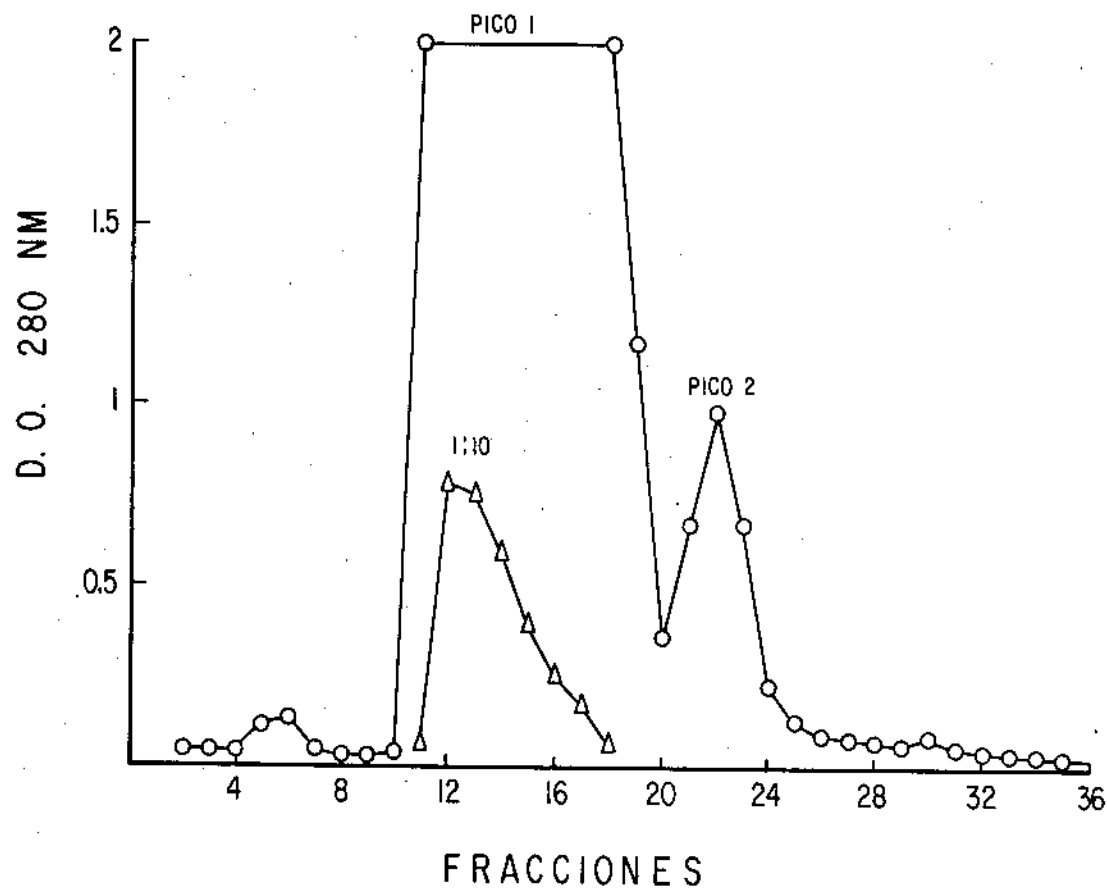


Figura 26. Fraccionamiento de suero no-inmune de borrego mediante cromatografía en Sephadex G-10. Se obtienen dos picos, el primero corresponde a las macromoléculas y el segundo a las micromoléculas. La dilución del primer pico revela un perfil de elución sin mayores accidentes, indicando una aceptable resolución entre las fracciones macro y micromoleculares.

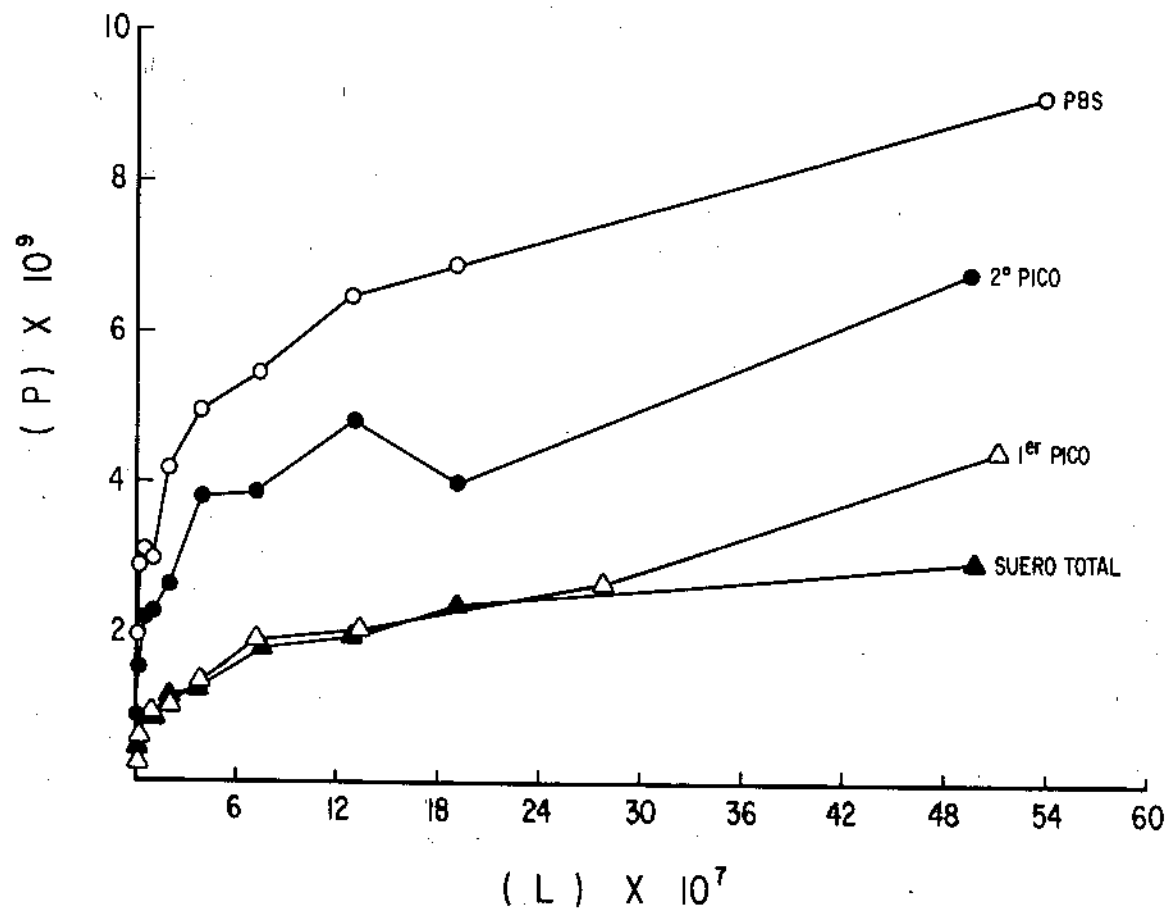


Figura 27. Efecto de las fracciones macro y micromoleculares de suero no-inmune sobre la reacción antígeno-anticuerpo. Nótese que ambas fracciones ejercen efecto inhibitor sobre la fijación del DNP a su anticuerpo en fase sólida. El efecto mayor es causado por la fracción macromolecular. Llama la atención que el efecto de ambas fracciones no sea aditivo.

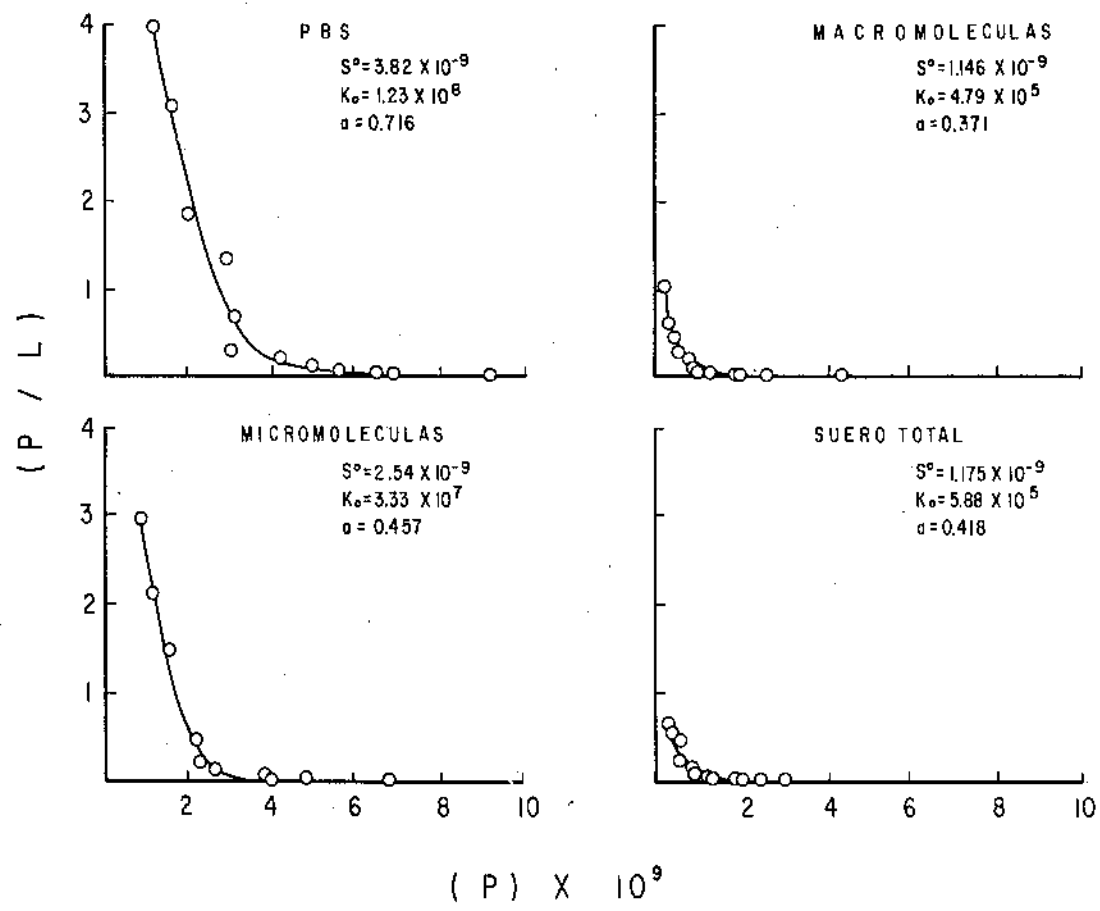


Figura 28. Efecto de las fracciones macro y micromoleculares sobre los parámetros de la reacción. La fracción micromolecular produce disminución en el número de sitios de fijación de un 30% y disminución en la constante de afinidad aparente de la reacción en un orden de magnitud, comparado al control. La fracción macromolecular (cuyo efecto se asemeja al efecto del suero sin fraccionar) disminuye el número de sitios de fijación en un 50% y la constante de afinidad aparente en aproximadamente tres órdenes de magnitud comparado al control.

b) Efecto de Gamaglobulina No-Immune y de Albúmina sobre la Reacción --
Antígeno-Anticuerpo

Como los experimentos anteriores mostraron que tanto macromoléculas como micromoléculas ejercían efecto modulador sobre la reacción antígeno-anticuerpo, se decidió iniciar el estudio del efecto de componentes individuales séricos con el objeto de identificar los principales factores séricos moduladores. Como representantes de la fracción macromolecular se ensayaron gamaglobulina no-immune, albúmina y complemento y como representante de la fracción micromolecular, se estudió al calcio.

Al ensayar el efecto de gamaglobulina no-immune y de albúmina sobre la fijación de $\text{DNP}_{24}\text{HSA}^{125}\text{I}$ a su anticuerpo específico acoplado a una fase sólida, se encontró que al aumentar la concentración de gamaglobulina (Fig. 29) disminuyó el número de sitios de fijación (S_0) en un 65%, disminuyó la constante de afinidad aparente (K_0) en dos ordenes de magnitud y disminuyó el índice de heterogeneidad (α) en un 15%. El efecto de concentraciones crecientes de albúmina, en cambio, fué más leve (Fig. 30), ya que la disminución en el número de sitios de fijación fué del 30%, la disminución de la constante de afinidad aparente fué de un orden de magnitud y su efecto sobre el índice de heterogeneidad fué variable de acuerdo a las concentraciones de albúmina ensayada (Fig. 31).

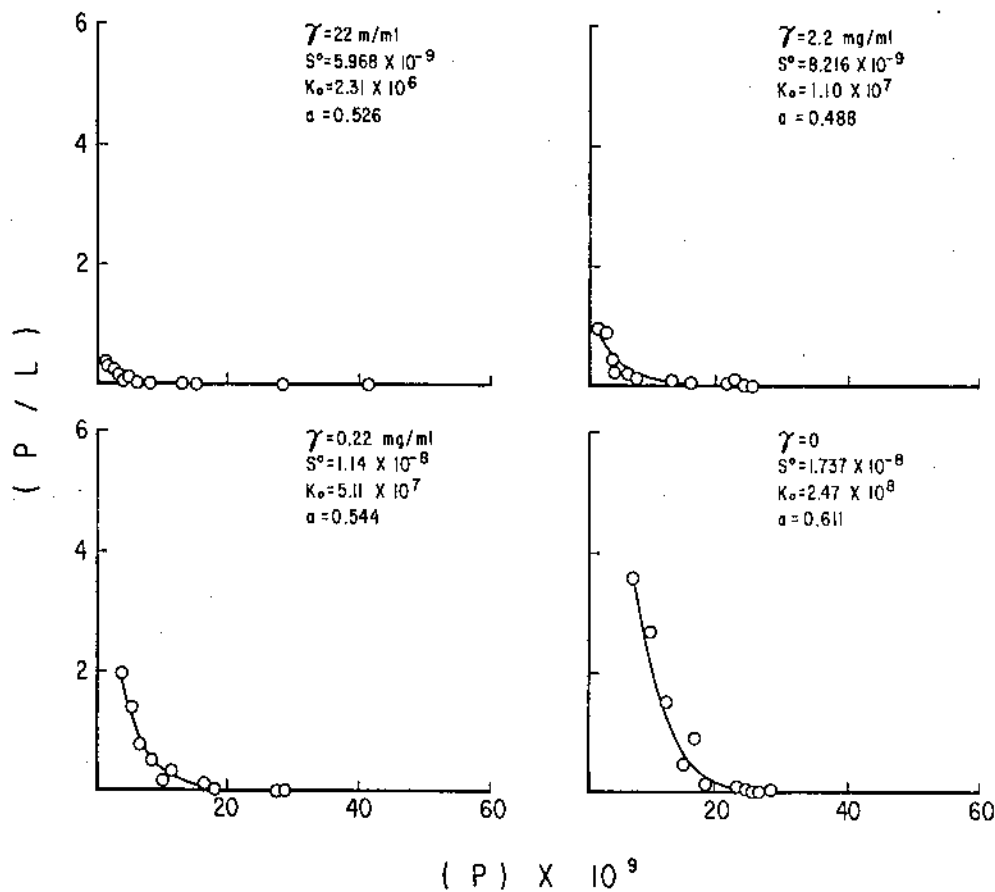


Figura 29. Efecto de gamaglobulina no-inmune sobre la fijación de $\text{DNP}_{24}\text{HSA}$ a su anticuerpo acoplado a una fase sólida. Obsérvese que al aumentar la concentración de gamma globulina disminuyen el número de sitios de fijación y la constante de afinidad aparente de la reacción.

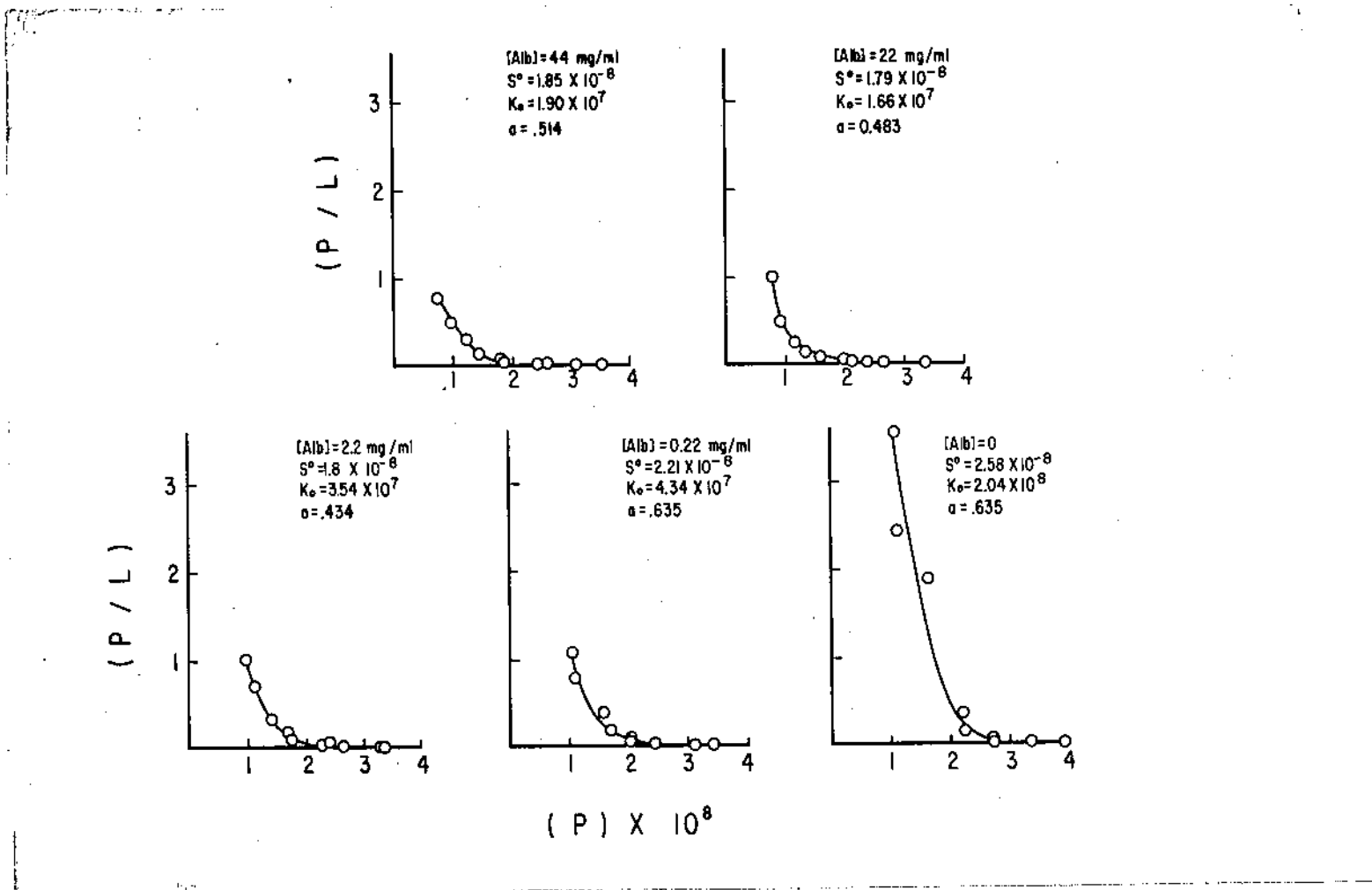


Figura 30. Efecto de albúmina sobre la fijación de DNP₂₄ HSA a su anticuerpo acoplado a -- una fase sólida. Con concentraciones crecientes de albúmina se observa disminución en el número de sitios de fijación y de la constante de afinidad aparente de la reacción.

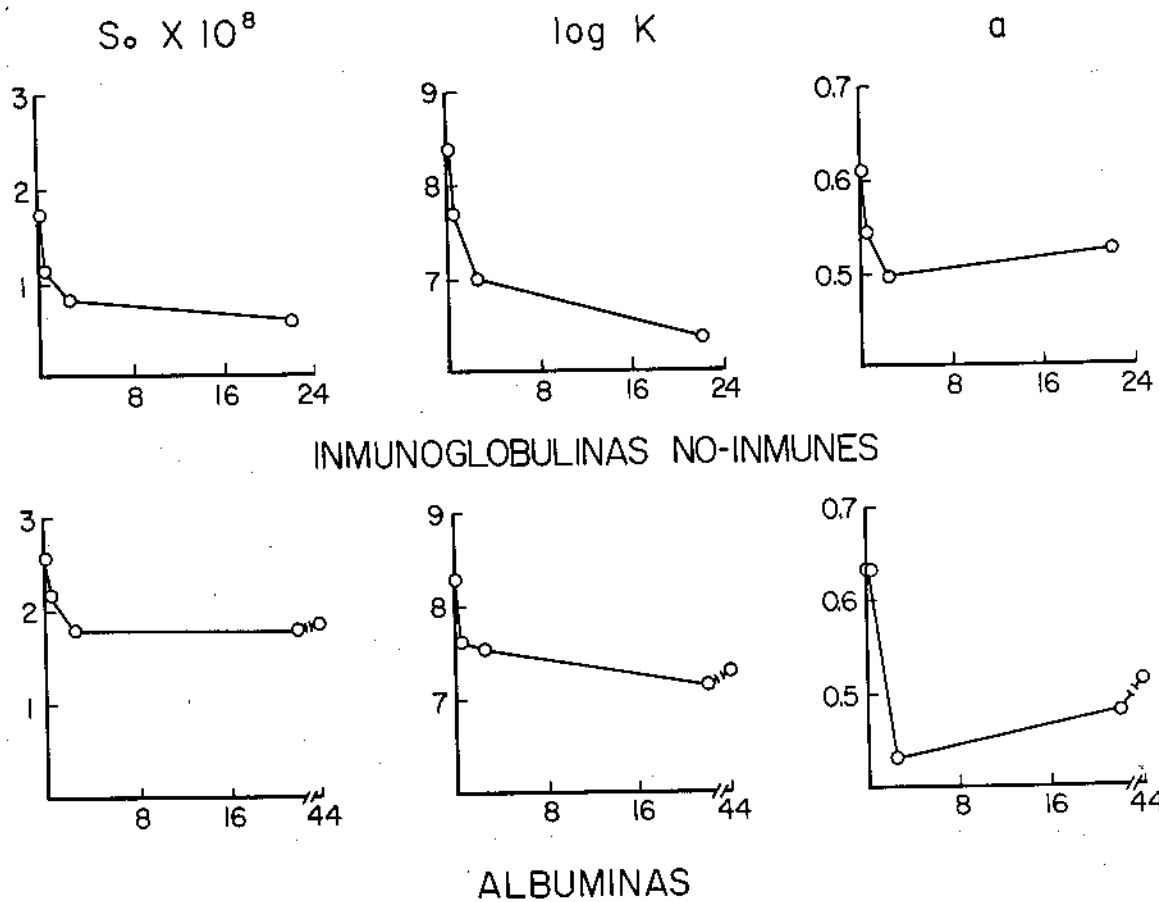


Figura 31. Efecto de gamaglobulina no-inmune y de albúmina sobre los parámetros de la -- reacción antígeno-anticuerpo. La concentración creciente de ambas proteínas -- disminuyen los parámetros de la reacción (S_0 , K_0 y a) siendo mayor el efecto -- de la gamaglobulina no-inmune que el de la albúmina.

63

BIBLIOTECA
JUAN A. ESCOBARTE M.
UNIDAD ACADÉMICA DE
LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO / CCH
U N A M

c) Efecto del Complemento

Se estudió el efecto de sueros decomplementados por calor -- (56° por 30 minutos) comparados al efecto de sueros no-decomplementados. Estos ensayos se realizaron con los sistemas DNP-antiDNP de borrego y -- GAT-antiGAT de conejo, mediante precipitación cuantitativa, en presencia de diluciones seriadas de ambos tipos de suero. Como se ilustra en la -- Figura 32, en el sistema GAT el efecto del suero decomplementado es si-- milar al efecto del suero no-decomplementado, pues ambos facilitan la -- precipitación del antígeno por su anticuerpo específico pero en diferen-- te magnitud, ya que el suero decomplementado aumenta la precipitación en un 312.6% y el suero no-decomplementado hasta en un 456.32%. En cambio, en el sistema DNP se observa una importante inhibición de la precipita-- ción del antígeno, hasta del 86%, al ensayarse en presencia del suero -- no-decomplementado, contrastando con el efecto de suero decomplementado, el cual no altera la precipitación del antígeno por su anticuerpo. --- (Figura 33).

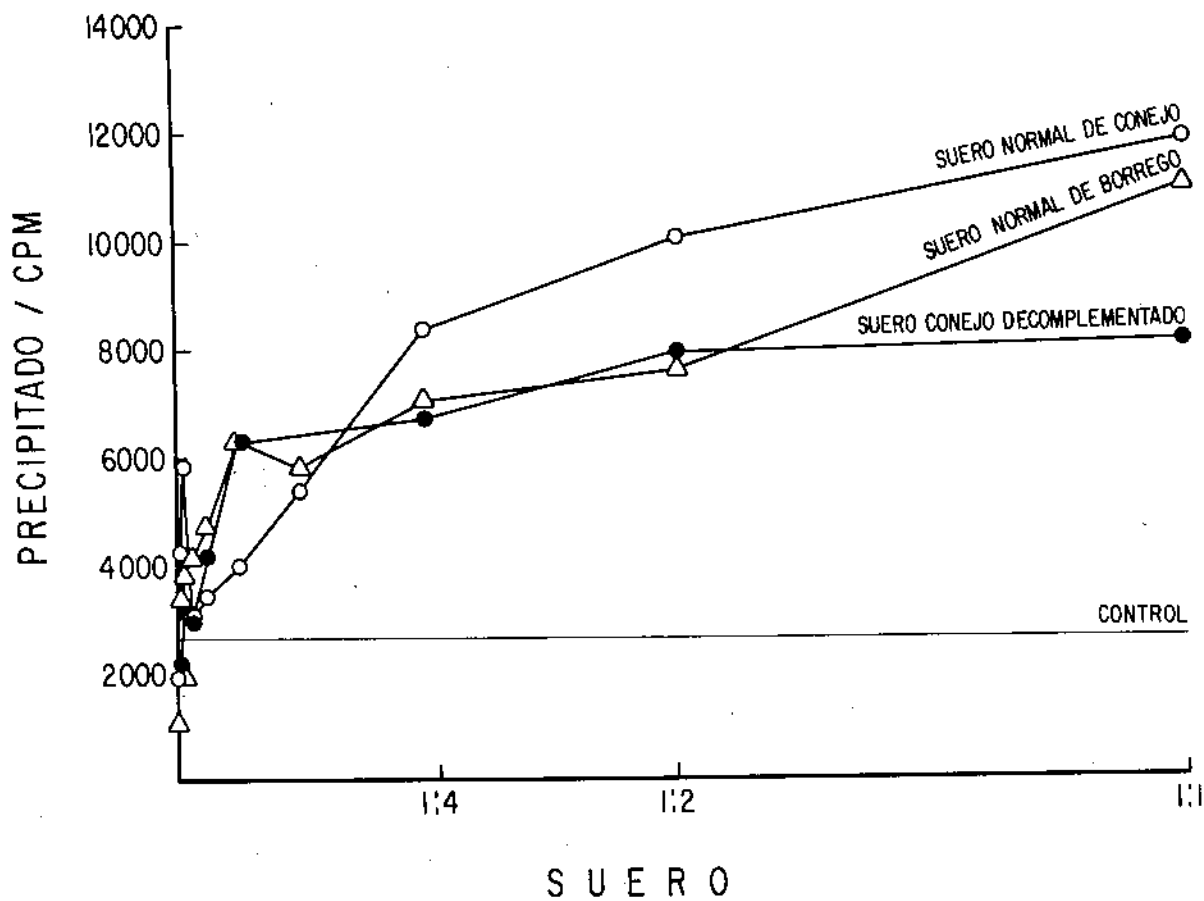


Figura 32. Efecto de sueros de-complementados y no-de-complementados sobre el sistema GAT. En este sistema el efecto del suero de-complementado es similar al efecto del suero no-de-complementado, observándose en presencia de ambos un aumento de la precipitación del antígeno por su anticuerpo específico. En esta gráfica también se ilustra el efecto facilitador de un suero heterólogo (borrego) sobre la reacción GAT-antiGAT. Cada punto representa el promedio de triplicados.

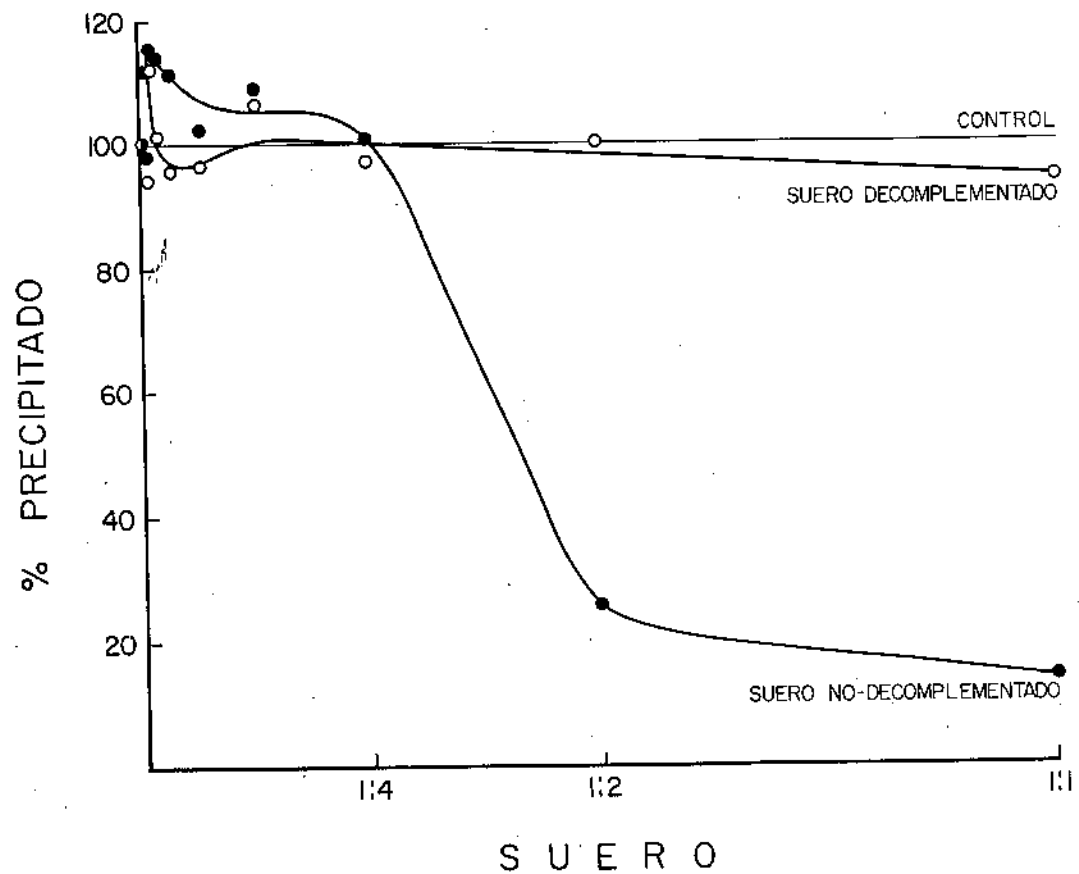


Figura 33. Efecto de sueros de-complementados y no-de-complementados sobre el sistema DNP. - En este sistema se observa gran sensibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo al efecto de altas concentraciones de suero no-de-complementado, pues inhibe fuertemente la precipitación del antígeno por su anticuerpo puro. En cambio, no se observa cambio en la precipitación del antígeno al ensayar sueros de-complementados. Cada punto representa el promedio de triplicados.

d) Efecto del calcio sobre la Reacción Antígeno-Anticuerpo

Se estudió el efecto del calcio, como representante de la -- fracción micromolecular del suero, en el sistema DNP-antiDNP de borrego.

Al utilizar PBS en los ensayos del efecto del calcio sobre - la reacción antígeno-anticuerpo, se observó precipitación del fosfato, - aún a concentraciones bajas de calcio. Por esta razón, todos los ensayos que estudian el efecto del calcio se realizaron utilizando como solución amortiguadora al Hepes (N-2-hidroxietilpiperazina, N-2-ácido etansulfónico) (Hepes 0.01M, NaCl 0.15M).

Se estudió el efecto del calcio sobre la precipitación del - antígeno, DNP₂₄HSA-¹²⁵I por su anticuerpo específico y se observó (Figura 34) que concentraciones crecientes de calcio aumentaron la precipitación del antígeno hasta 2.5 veces los valores controles, sin precipitar al antígeno solo.

También se demostró que a concentraciones constantes de calcio 5mM, este ion era capaz de modificar una curva de precipitación cuantitativa, aumentando la cantidad de antígeno precipitado y corriendo la zona de equivalencia a la región de exceso de anticuerpo (Figura 35).

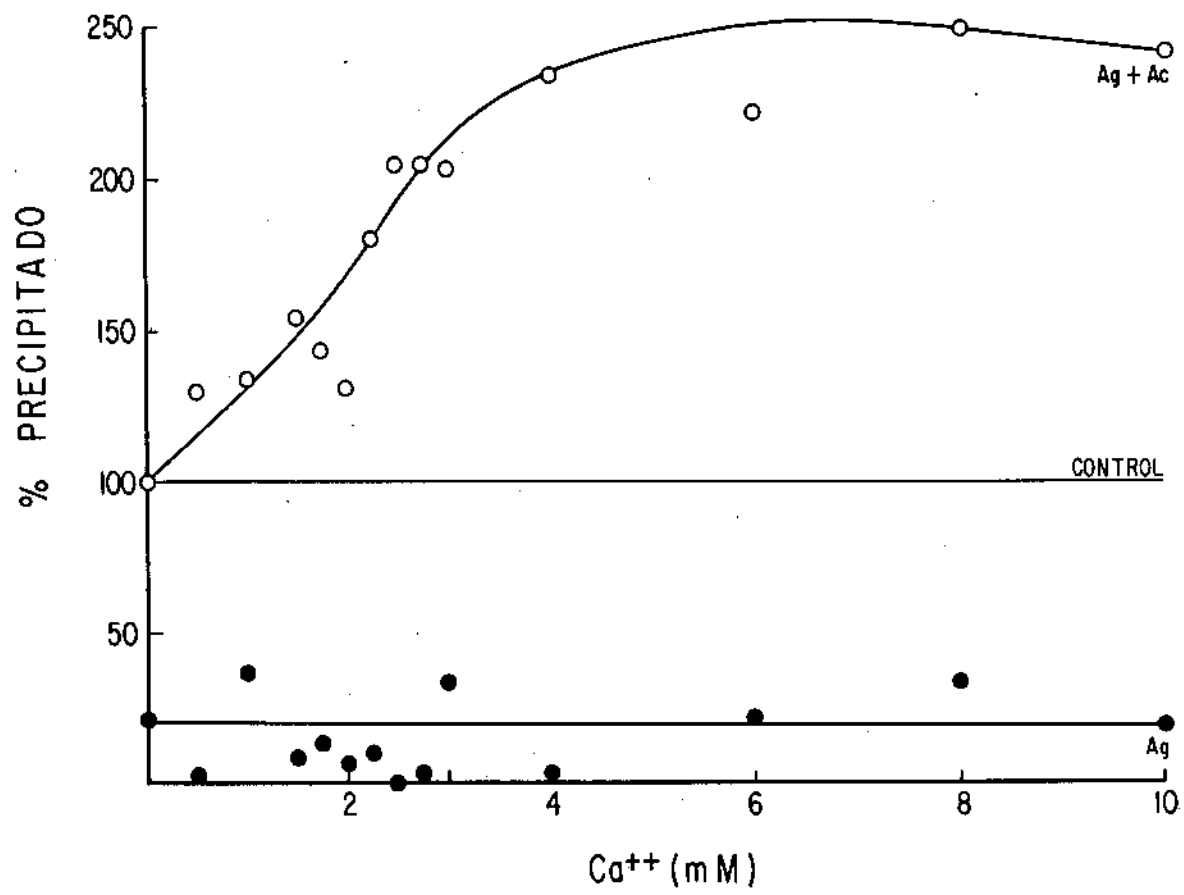


Figura 34. Efecto del calcio sobre la reacción antígeno-anticuerpo. Se observa que el calcio facilita la precipitación del antígeno por su anticuerpo en presencia de -- calcio hasta 2.5 veces los valores control. La precipitación del antígeno solo no es afectada por las concentraciones de calcio estudiadas. Cada punto representa el promedio de triplicados.

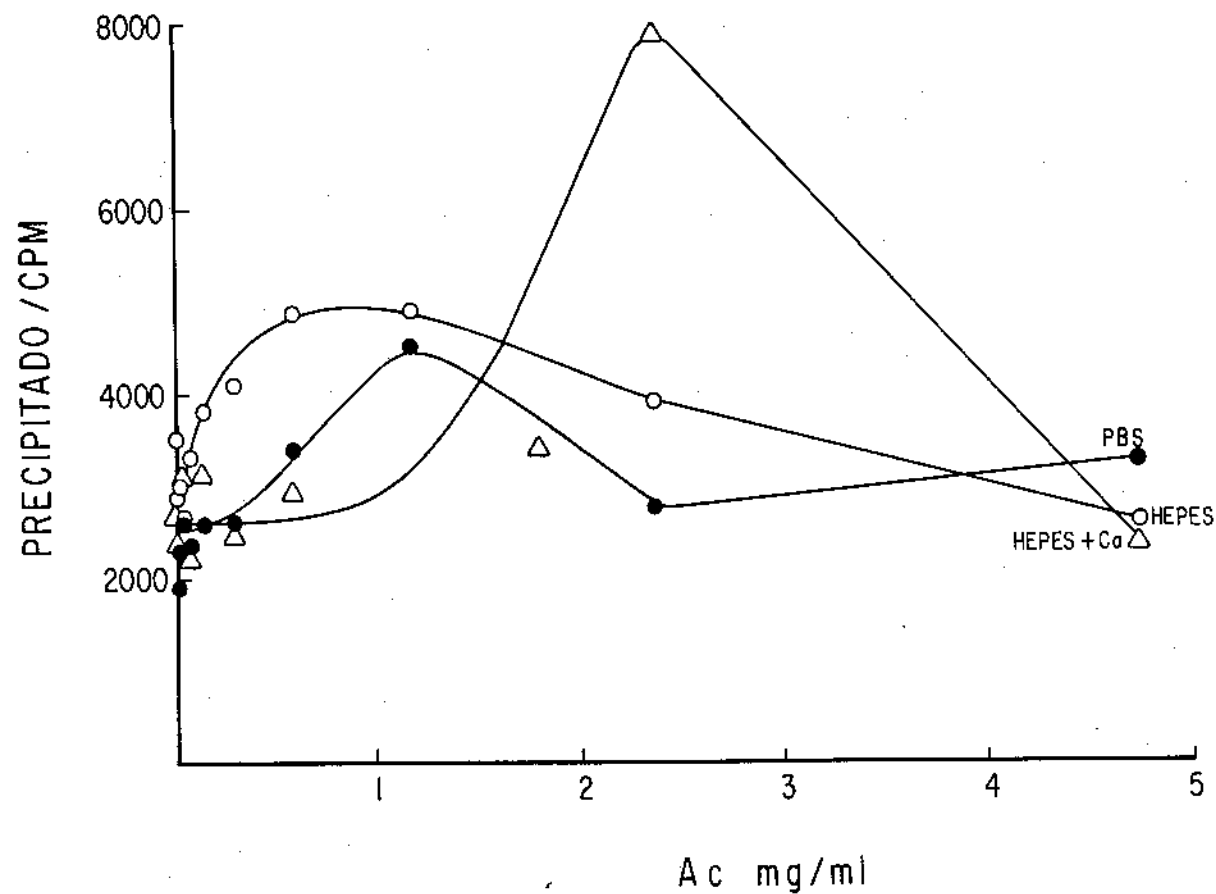


Figura 35. Efecto del calcio sobre una curva de precipitación cuantitativa. El calcio modifica la curva de precipitación, aumentando la cantidad de antígeno precipitado y corriendo la zona de equivalencia hacia la región de exceso de anticuerpos. Cada punto representa el promedio de triplicados.

5. Efecto Alostérico del Suero No-Immune sobre la Reacción Antígeno-Anticuerpo

a) Cinética de Intercambio de Hidrógeno

El intercambio de hidrógeno es un método extremadamente sensible para estudiar cambios conformacionales (32). La técnica se basa en el hecho de que los hidrógenos lábiles de una proteína, como son los hidrógenos unidos al oxígeno, azufre o nitrógeno, pueden intercambiarse con el hidrógeno del solvente. Este método tiene la ventaja de que permite estudiar la conformación total de una proteína o áreas aisladas de ella, en su estado nativo, en solución, con mínimas perturbaciones de su estabilidad o su ambiente natural.

Se utilizó la técnica de intercambio de hidrógenos para determinar si la presencia de suero no-immune homólogo tenía algún efecto sobre la conformación de inmunoglobulinas de borrego. Este experimento se realizó en el laboratorio del Dr. Paul Liberti en Philadelphia. Como se puede apreciar en la Figura 36, la presencia de suero normal claramente afectó a la cinética de intercambio de hidrógenos, siendo 42 hidrógenos por molécula de inmunoglobulina los afectados.

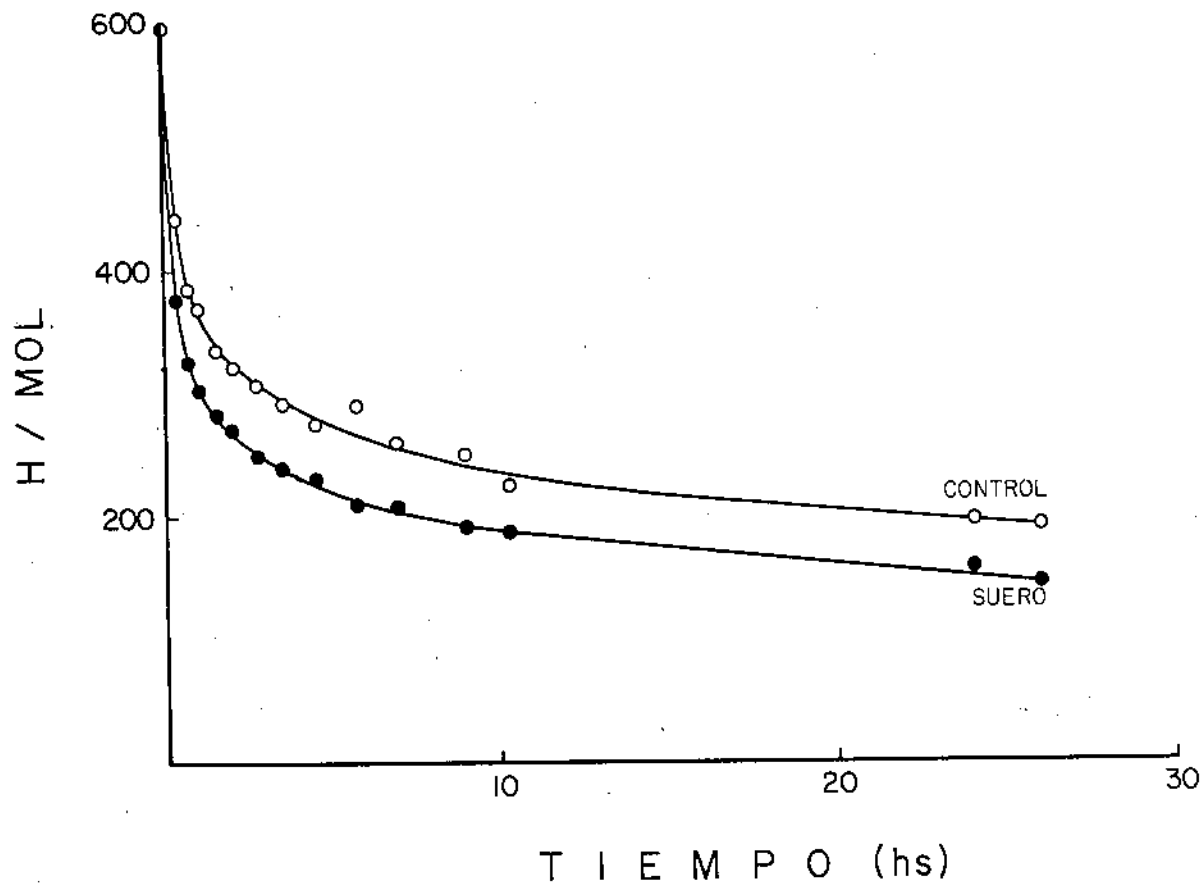


Figura 36. Cinética de Intercambio de Hidrógenos. En la gráfica se muestra el efecto del suero no-immune sobre el equilibrio del intercambio de protones de las inmunoglobulinas de borrego con el solvente. En presencia del suero no se intercambian 42 hidrógenos por molécula de inmunoglobulina. Cada punto representa el promedio de triplicados.

b) Aplicación del Modelo Teórico Matemático

Habiendo demostrado con la técnica de cinética de intercambio de hidrógeno que el suero homólogo no-immune produce cambios conformacionales en las moléculas de inmunoglobulinas, compatible con alosterismo, se examinaron los efectos del suero no-immune con el modelo matemático teóricamente capaz de distinguir alosterismo de competencia.

Para el análisis matemático se utilizaron los datos generados del experimento descrito en la página 37, que estudia el efecto del suero no immune sobre los parámetros de la reacción antígeno-anticuerpo en el sistema DNP-antiDNP de borrego.

Los datos se regraficaron como $1/r$ (la inversa de la relación de antígeno pegado a concentración total de proteína) contra $1/A$ (la inversa de la concentración del antígeno) para evaluar si el suero modifica el intercepto y/o la pendiente de las curvas (Véanse ecuaciones (3) y (4) de la página 25). El análisis de la gráfica (Figura 37) indica que el suero immune homólogo produce cambios tanto en la pendiente de la curva ($1/nK(a)$) como en el intercepto ($1/n$), cambios compatibles con una regulación de tipo alostérico. Nótese que la gráfica no presenta líneas rectas como lo predicen las ecuaciones, sino curvas con una zona de inflexión que permite suponer la existencia de dos poblaciones de anticuerpos, unos de alta afinidad y otros de baja afinidad. Conforme aumenta la concentración del suero no-immune, decrece la población de anticuerpos de alta afinidad.

Se graficaron nuevamente los datos, separando las poblaciones de anticuerpos de alta afinidad (Figura 38) de la población de anticuerpos de baja afinidad (Figura 39). Se analizaron las tres gráficas con el método de regresión lineal. Nótese (Tabla 6) que la pendiente de la curva solo se alteró con los anticuerpos de baja afinidad, mientras que el intercepto se afectó con ambas poblaciones de anticuerpos.

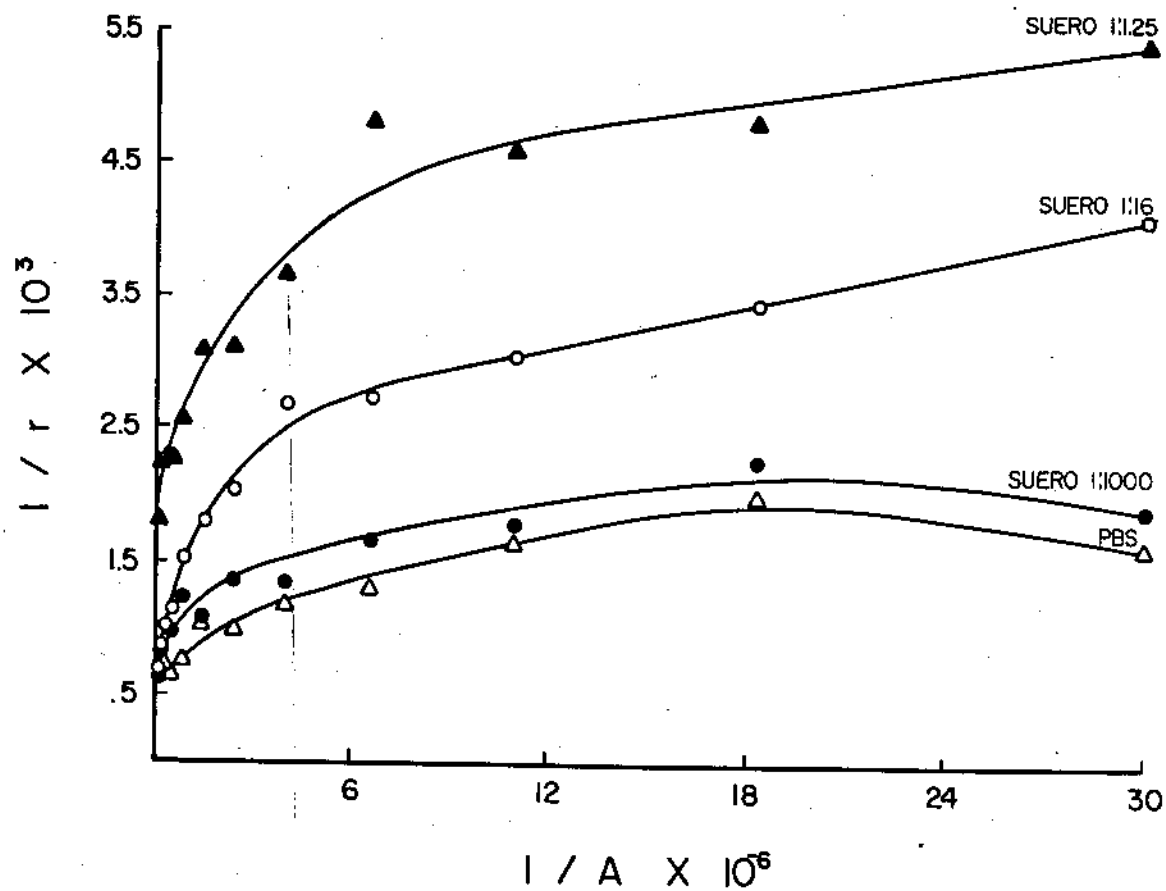


Figura 37. Efecto alostérico del suero sobre la reacción antígeno-anticuerpo. Obsérvese - que con concentraciones crecientes de suero se obtienen cambios de pendiente y de intercepto compatibles con regulación de tipo alostérico. También se observa una inflexión en cada curva, sugestivo de la existencia de dos poblaciones - distintas de anticuerpos, de alta y baja afinidad.

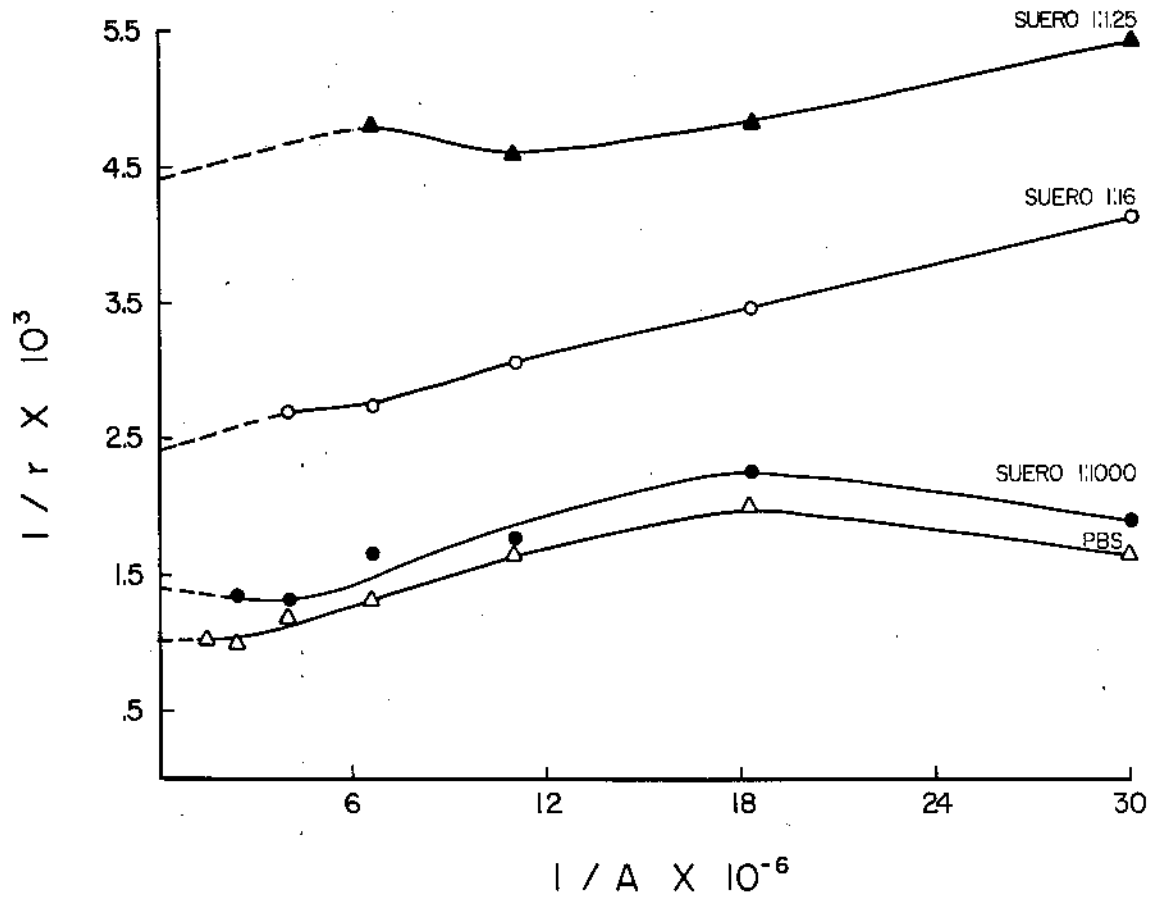


Figura 38. Efecto regulador del suero sobre la población de anticuerpos de alta afinidad. Nótese que el efecto del suero incide principalmente sobre el intercepto de -- las curvas.

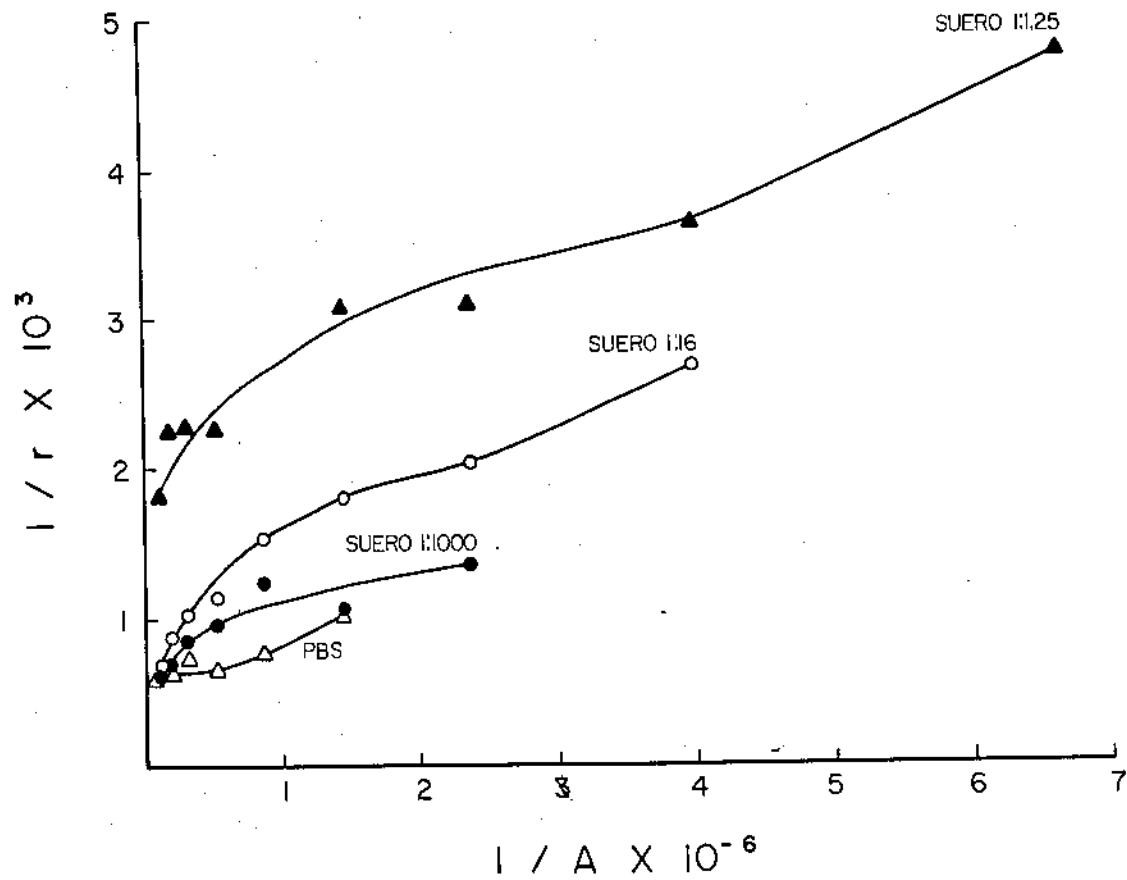


Figura 39. Efecto regulador del suero sobre la población de anticuerpos de baja afinidad. Nótese que el efecto del suero incide tanto en la pendiente como en el intercepto de las curvas.

TABLA 6

POBLACION TOTAL DE ANTICUERPOS

	Intercepto $\times 10^{-3}$	Pendiente $\times 10^{10}$	r
PBS	0.84	0.41	0.82
1:1000	1.03	0.43	0.81
1:16	1.43	1.05	0.88
1:1.25	2.64	1.14	0.85

POBLACION DE ANTICUERPOS DE ALTA AFINIDAD

	Intercepto $\times 10^{-3}$	Pendiente $\times 10^{10}$	r
PBS	1.06	0.517	0.839
1:1000	1.4	0.25	0.747
1:16	2.4	0.573	0.998
1:1.25	4.41	0.305	0.873

POBLACION DE ANTICUERPOS DE BAJA AFINIDAD

	Intercepto $\times 10^{-3}$	Pendiente $\times 10^{10}$	r
PBS	0.564	2.93	0.942
1:1000	0.727	2.83	0.861
1:16	0.877	4.83	0.97
1:1.25	2.12	4.11	0.979

6. Efecto Modulador del Suero No-Immune sobre la Reacción Hapteno-Anti--
cuerpo

Para determinar si el efecto del suero está dirigido al sitio activo de los anticuerpos, se realizaron diálisis en equilibrio utilizando como hapteno DNP-lis-³H y anticuerpos puros antiDNP producidos en --- borrego. Como primer paso se estudió el equilibrio de la difusión del -- hapteno en presencia de suero. Se colocó el hapteno diluído 1:1 en suero concentrado no-immune de un lado de la membrana y en el lado opuesto de - la membrana se colocó suero normal de borrego diluído 1:1 en PBS. Se tomaron muestras a los siguientes tiempos: 1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 4 días y 7 días. Como se observa en la figura 40, el equilibrio - de la difusión se alcanzó a los 7 días, en cambio el equilibrio de la difusión en ausencia de sueros se alcanzó a las 18 hs.

Para probar si el suero normal afectaba al sitio activo de los anticuerpos, se realizaron diálisis en equilibrio utilizando de un lado - de la membrana el anticuerpo diluído 1:1 en suero y en el lado opuesto el hapteno radioactivo, también diluído 1:1 en suero. Obsérvese (Figura 41) que en presencia de suero se distorsionan las gráficas de Scatchard, aunque es clara la disminución de la pendiente, que llega a ser prácticamente horizontal o positiva, indicativa de una disminución de la constante - de afinidad aparente de la reacción, y posiblemente un aumento en el número de sitios de fijación, pero difícil de determinar por ser una línea -- asíntota al eje de las abscisas. No nos sentimos muy tranquilos con los datos obtenidos mediante diálisis en equilibrio, ya que al dializar las - muestras durante 7 días se produce, por una parte, contaminación de algu-

nas de las muestras, y por otra parte, evaporación. Sin embargo, los ensayos mostraron tener un patrón repetitivo.

Se probó también el efecto de algunos de los componentes séricos (gamaglobulina no-inmune, albúmina y calcio) sobre la reacción hapteno-anticuerpo.

Para estudiar el efecto de los componentes protéicos, se dializaron anticuerpos puros antiDNP a una concentración de 2 mg/ml diluidos 1:1 en gamaglobulina no-inmune o en albúmina, a la misma concentración de 2 mg/ml. Los controles consistieron en anticuerpos puros, albúmina o gamaglobulina no-inmune, todos a las mismas concentraciones anteriores. Todos los grupos se dializaron contra el mismo hapteno, DNP-lis³H, a concentraciones de 1.12×10^{-8} a 1.76×10^{-6} M. Los controles de gamaglobulina no-inmune y albúmina en ausencia de anticuerpos, no fijaron al ligando. La gráfica de la figura 42 nos muestra que las combinatorias de gamaglobulina no-inmune más anticuerpo o de albúmina más anticuerpo fueron más eficientes para fijar al ligando que el anticuerpo antiDNP solo.

Al ensayar el efecto del calcio, también se encontró aumento de la fijación del hapteno en presencia de este ion, conforme aumentó la concentración de ligando (Figura 43). Al analizar el efecto del calcio sobre los parámetros de la reacción se observó aumento en el número de sitios de fijación en un 30%, disminución de la constante de afinidad aparente de la reacción en un 25% y aumento en el índice de heterogeneidad del 0.5%.

También se analizaron los datos obtenidos mediante diálisis - en equilibrio de acuerdo al modelo teórico matemático propuesto. Se observa (Figura 44) nuevamente que al utilizar suero cambia la pendiente y el intercepto de la curva, comparado al control compatible con una regulación de tipo alostérico. Pero en este caso, ambos parámetros disminuyen en contraste al experimento realizado en fase sólida (Figura 37), en el que el suero aumenta tanto a la pendiente como al intercepto. La Tabla 7 nos muestra los resultados del análisis realizado mediante regresión lineal.

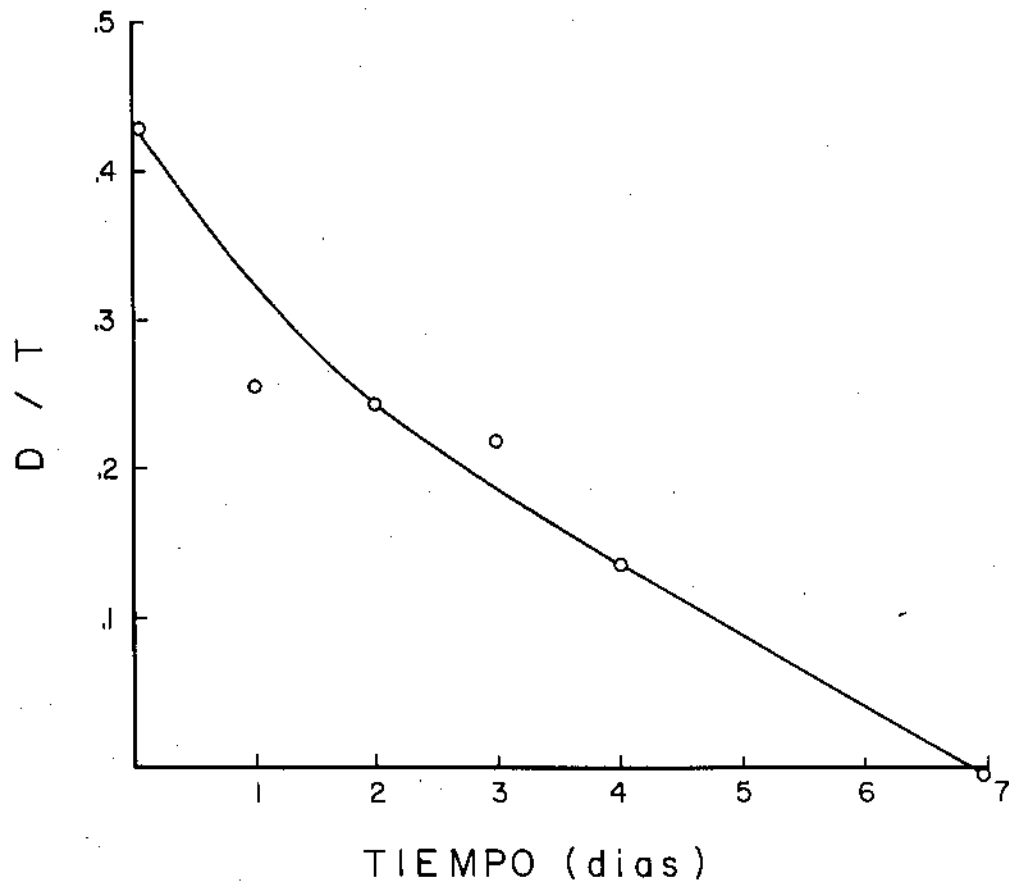


Figura 40. Cinética de la difusión del hapteno DNP-lis-³H en presencia de suero no-inmune. Se grafica la diferencia (D) de CPM presente en ambas cámaras, relacionado al total (T) de cuentas, en contra del tiempo. Cada punto representa el promedio de las diferencias de tres cámaras en oposición. Como se observa, el equilibrio de la difusión se alcanza hasta el séptimo día.

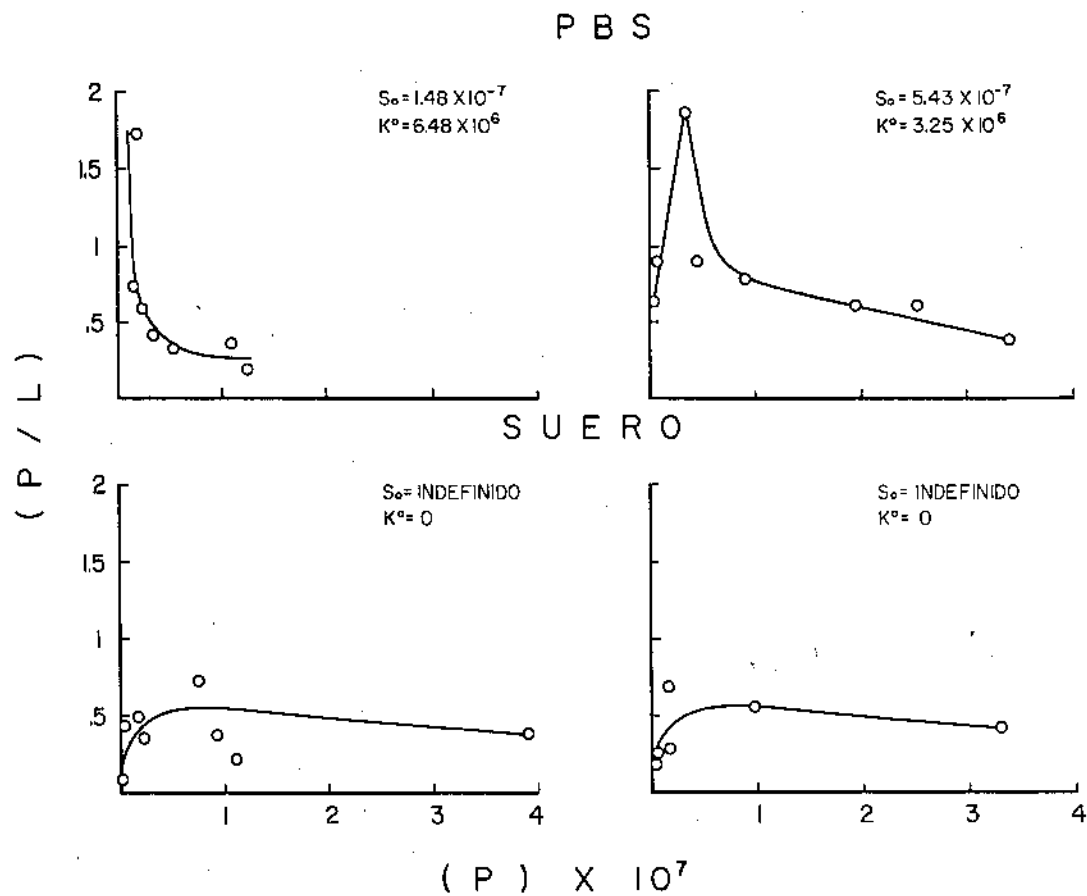


Figura 41. Gráficas de Scatchard en las que se muestra el efecto del suero no-inmune -- sobre la reacción hapteno-anticuerpo. Como se observa, las gráficas se encuentran distorsionadas, aunque es claro que en presencia de suero disminuye la pendiente de la curva (disminución en la constante de afinidad aparente de la reacción) y aumenta el intercepto en las abscisas (aumento en el número de sitios de fijación).

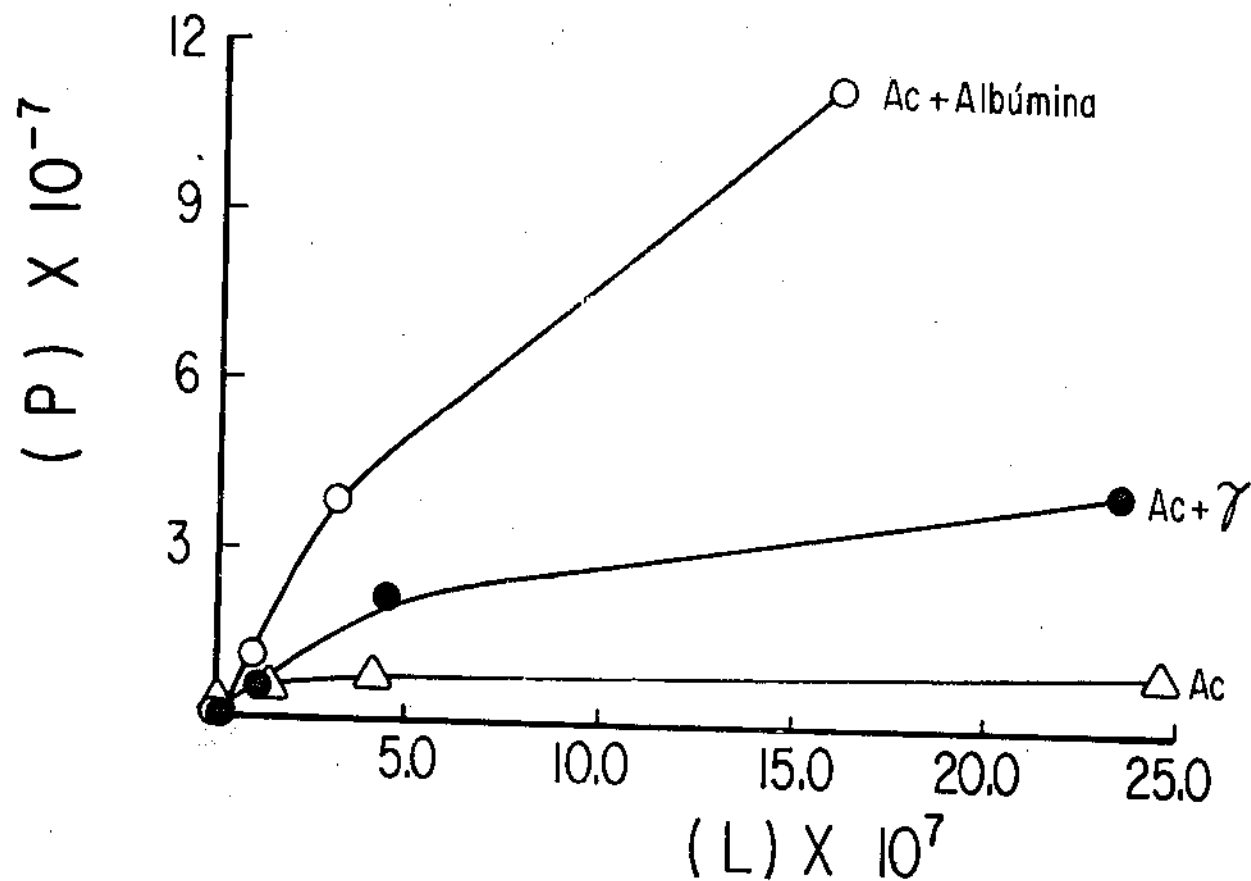


Figura 42. Efecto de gamaglobulina no-inmune y albúmina sobre la reacción hapteno-anticuerpo. Nótese que la fijación es mayor al utilizar anticuerpos puros contaminados con gamaglobulina no-inmune y aún mayor al contaminarlos con albúmina, que al ensayar los anticuerpos puros solos. Los controles, albúmina y gamaglobulina no-inmune sin anticuerpos, no fijaron al hapteno.

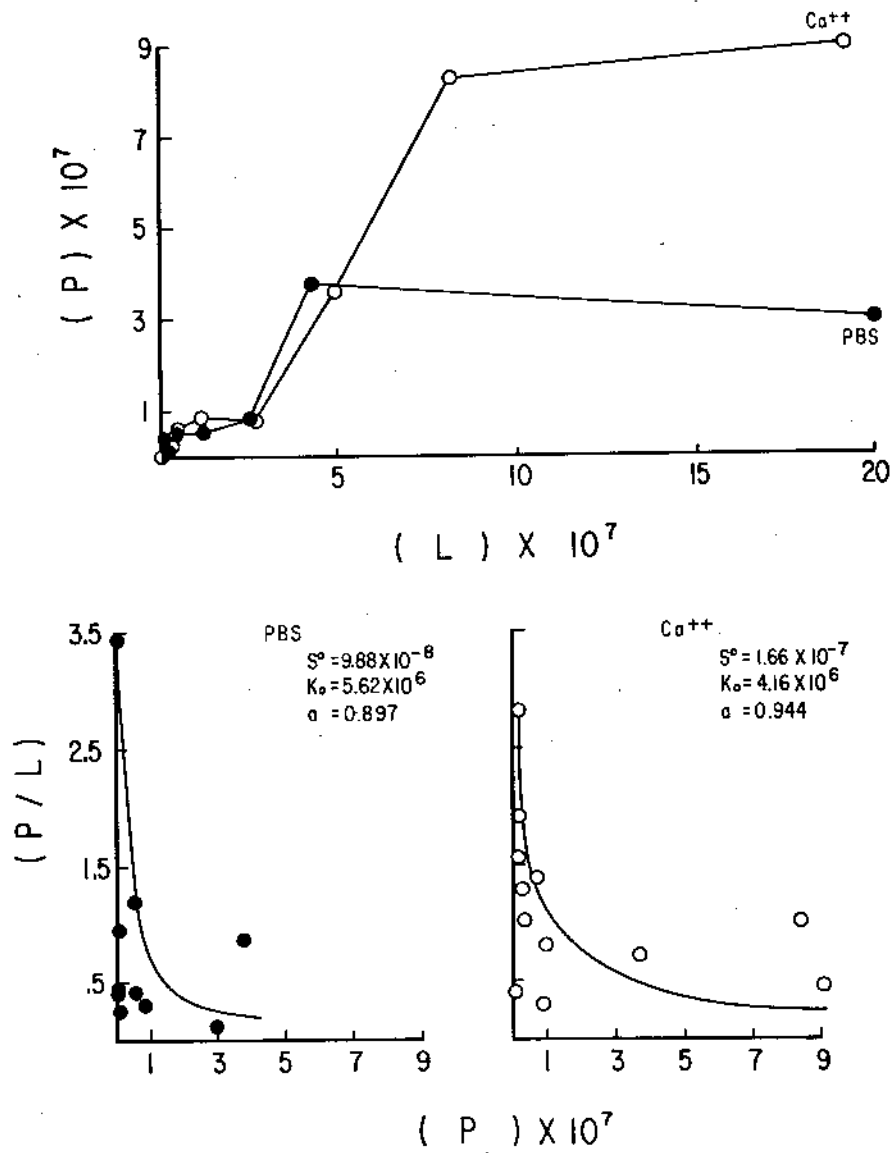


Figura 43. Efecto del calcio sobre la reacción hapteno-anticuerpo. En presencia de calcio aumentó el número de sitios de fijación, disminuyó la constante de afinidad aparente de la reacción y aumentó el índice de heterogeneidad.

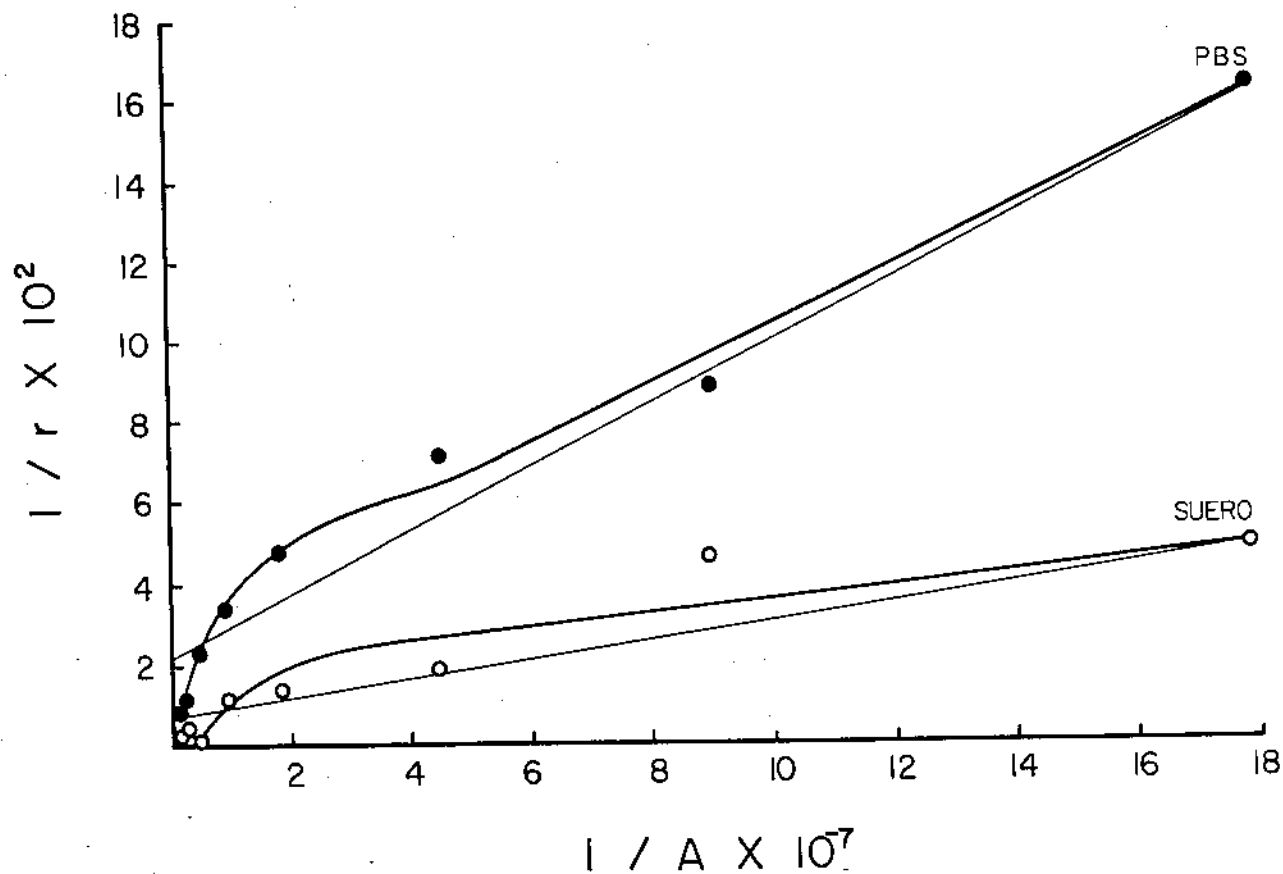


Figura 44. Efecto alostérico del suero sobre la reacción hapteno-anticuerpo. Al ensayar la reacción hapteno-anticuerpo en diálisis en equilibrio, se analizaron los datos obtenidos de acuerdo al modelo matemático propuesto. Se encontró que el suero produce cambios en la pendiente y en el intercepto de la curva compatibles con una regulación de tipo alostérico. Cada punto representa el promedio de CPM obtenidos de dos experimentos diferentes.

TABLA 7

	Intercepto	Pendiente $\times 10^6$	Coefficiente de correlación lineal
PBS	205.15	8.15	0.98
Suero	59.45	2.85	0.93

DISCUSION

Los resultados muestran la gran sensibilidad de los sistemas DNP-antiDNP y GAT-antiGAT a la presencia de componentes del suero en la reacción.

El sistema DNP-antiDNP es inhibido hasta en un 75% por altas concentraciones de suero y facilitado hasta en un 30% por bajas concentraciones. Que el grado de inhibición sea mayor cuando el anticuerpo se encuentra acoplado a perlas de vidrio que cuando el anticuerpo se encuentra en solución sugiere impedimento estérico de los sitios activos del anticuerpo, debido quizá a la adsorción de componentes séricos a la superficie de la fase sólida. Sin embargo, el encontrar un efecto inhibitorio similar en el sistema DNP cuando ambos reactantes se encuentran en solución, y la ausencia de inhibición del sistema GAT-antiGAT en fase sólida, indican que el impedimento estérico no es el único fenómeno responsable de la inhibición.

El efecto del suero depende de otras condiciones del ensayo; sobre todo en lo que se refiere a las concentraciones absolutas de los reactantes, a la relación de concentraciones del antígeno y del anticuerpo, y a la concentración del suero. El efecto facilitador de las bajas concentraciones de suero sobre la precipitación parece afectar principalmente a los anticuerpos de baja afinidad pues desplaza la zona de equivalencia a la derecha y aumenta la cantidad total de antígeno precipitado -

indicativo de la participación de una mayor cantidad de anticuerpos. La fijación de $\text{DNP}_{23}\text{HSA}$ a anticuerpos acoplados a la fase sólida es aumenta da solo en altas concentraciones de antígeno, también indicativo de que el efecto incide en poblaciones de anticuerpos de baja afinidad. Por --- otro lado, las propiedades inhibitorias del suero son más aparentes a con-- centraciones bajas del antígeno, condiciones en las que participan prin-- cipalmente anticuerpos de alta afinidad, lo que indicaría que los anticuer-- pos de mayor afinidad son los únicos sensibles a la inhibición. Que los anticuerpos de alta afinidad son los principalmente inhibidos por el sue-- ro se apoya también en los efectos de concentraciones crecientes de suero sobre las gráficas de Scatchard: en las que se observa una disminución, - tanto en la capacidad de fijación del antígeno (S_0), como en la constante de afinidad aparente de la reacción (K_0). Si todos los anticuerpos se -- vieran igualmente afectados por el suero se esperaría el decremento de S_0 pero sin alteración apreciable de K_0 . Esta proposición se comprobó al ana-- lizar dos poblaciones de anticuerpos de distinta afinidad observándose -- que, efectivamente, el suero favorece la precipitación de anticuerpos de baja afinidad e inhibe a los de alta afinidad, según se ilustra en la -- Figura 19.

Al ensayar el sistema GAT-antiGAT en precipitación cuantitati-- va se observa una gran facilitación de la precipitación, hasta cuatro ve-- ces los valores controles, cuando se utilizan altas concentraciones de -- suero. En fase sólida no se modifica sensiblemente la fijación del GAT - a su anticuerpo acoplado a las perlas de vidrio, ni aún en presencia de -

altas concentraciones de suero. En fase sólida los parámetros de la reacción en el sistema GAT se modifican muy discretamente con la adición de suero: el número de sitios de fijación (S_0) disminuye en aproximadamente 40% comparado al control y la constante de afinidad aparente (K_0) aumenta en un 10%, al utilizar suero diluído 1:16, para volver a disminuir en un 10%, al utilizar suero a altas concentraciones.

Los efectos facilitadores del suero sobre la precipitación -- del sistema GAT contrastan con los principalmente inhibitorios del sistema DNP, según se ilustra en la Figura 13. Tal dualidad en los efectos -- del suero apunta a su gran capacidad para regular, tanto positiva como negativamente, la extensión y la afinidad de las reacciones antígeno-anticuerpo dependiendo de propiedades intrínsecas al sistema inmune empleado (DNP, GAT, etc.) y de propiedades extrínsecas (concentración del suero).

Se comprobó la generalidad del fenómeno regulador del suero -- al estudiar sueros heterólogos. El que los sueros heterólogos ejerzan -- efectos moduladores sobre la reacción Ag-Ac similares a los efectos de -- los sueros homólogos indican que él o los componentes del suero con capacidad reguladora son comunes a por lo menos algunas especies de mamíferos (borrego, conejo, cerdo).

Los ensayos de diálisis en equilibrio exploran si el efecto -- del suero va dirigido a la reacción entre el determinante antigénico y el sitio activo de los anticuerpos y/o afecta a otras regiones de las moléculas que interaccionan de manera secundaria. Los resultados obtenidos in-

dican que efectivamente el suero afecta al reconocimiento del ligando por el sitio activo del anticuerpo, ya que la constante de afinidad aparente es prácticamente nula y la fijación total del ligando aumenta, aunque -- difícil de cuantificar, ya que la pendiente de la curva es positiva. Al probar los efectos de algunos componentes proteicos aislados del suero -- (gamaglobulina no-inmune y albúmina) se repite la disminución de K_o y aumento en S_o . Los efectos del suero sobre la reacción sitio activo-hapteno son consistentes con varias explicaciones: a) que el suero inhiba a los anticuerpos de alta afinidad, lo que explicaría la disminución de K_o pero no el aumento en S_o ; b) que active a anticuerpos de baja afinidad, lo que explicaría la disminución en K_o por ser ésta una constante promedio que se vería disminuída al ingresar anticuerpos de baja afinidad a la reacción, y también explicaría el aumento en S_o ; y c) ambas cosas, una -- inhibición de los anticuerpos de alta afinidad y una activación de los de baja afinidad, lo que también explicaría la disminución de K_o y el aumento de S_o . Recordando los fenómenos de precipitación y absorción a una fase sólida, en los que sobresale el efecto inhibitor del suero sobre anticuerpos de alta afinidad y facilitación sobre los anticuerpos de baja afinidad nos inclinamos a pensar que ambos fenómenos están ocurriendo tam--bién en la fijación del hapteno. Sin embargo, los estudios en diálisis -- en equilibrio requieren comprobaciones ulteriores para ser definitivos, -- en vista de que aún hay problemas de orden técnico dependientes de la alta viscosidad del suero, que de alguna manera retrasa el equilibrio de la difusión hasta ocho días, posiblemente porque se adhiere a la membrana o a las paredes de los pozos, impidiendo el paso adecuado del ligando. Ade

más, el aumento en el tiempo de diálisis favorece la contaminación bacteriana del sistema por lo que necesariamente deben descartarse algunas -- muestras, quedando los ensayos incompletos. Sin embargo, nos tranquiliza el que la mayor parte de los ensayos sigue un comportamiento similar. De todos modos, los experimentos realizados en diálisis en equilibrio serán repetidos cuando logremos salvar los inconvenientes técnicos.

La complejidad de la interacción de la ecología molecular circundante sobre la reacción antígeno-anticuerpo se evidencia cuando al -- fraccionar el suero normal en sus componentes macro y micromoleculares se demostró que ambos ejercen efectos notorios sobre la reacción, pero dicho efecto no es de tipo aditivo. Estos resultados podrían indicar la interacción de los diversos componentes del suero entre sí y entre dichos componentes y los reactantes inmunológicos.

Llama la atención el efecto del complemento sobre las propiedades de la reacción de precipitación ya que en el sistema DNP, sueros no -- decomplementados inhiben la precipitación del Ag hasta un 75%, no encontrándose ningún tipo de efecto al ensayarse sueros decomplementados. Parecería que en este sistema la presencia de complemento, y/o algún otro -- componente del suero termolábil a 56°C, es un factor muy importante en -- la regulación de la precipitación del sistema DNP-antiDNP. En cambio, el complemento no mostró ser un elemento regulador tan importante en el sistema GAT-antiGAT, ya que tanto en la presencia o ausencia de C' el suero facilitó la precipitación, si bien menos notablemente cuando se decomplementó.

Uno de los componentes micromoleculares que encontramos influye notoriamente sobre las propiedades de la reacción antígeno-anticuerpo es el ion calcio, sobre todo en el fenómeno de precipitación del complejo inmune. El efecto del calcio sobre la precipitación podría deberse a la estabilización de los complejos antígeno-anticuerpo al favorecer la formación de compuestos similares a los quelatos (50). El calcio podría ocupar sitios cargados electronegativamente y por tanto disminuir la interacción del antígeno y del anticuerpo con el solvente. También el calcio podría modificar la geometría de los complejos inmunes afectando el grado de polimerización, modificando así la interacción con el solvente al cambiar las superficies expuestas, y por lo tanto favorecer la precipitación. Otra explicación más, al efecto facilitador de la precipitación por el calcio, es la fijación del calcio a la albúmina que se emplea como acarreador de la molécula de DNP, ya que conocemos la avidez del calcio para fijarse a esta proteína (51). Sin embargo, el ensayo que se ilustra en la Figura 34 descarta esta posibilidad, ya que el calcio no afecta la precipitación del antígeno en ausencia de su anticuerpo específico.

Los efectos que el suero normal ejerce sobre las propiedades de la reacción antígeno-anticuerpo son explicables como producto de:

a) Modificación de los equilibrios establecidos entre las superficies de los reactantes y el solvente. La fijación de un antígeno a su anticuerpo puede ser analizada como un fenómeno de partición competitiva del ligando entre la solución y los sitios de fijación del anticuerpo, los cuales son hidrofóbicos (52). La participación de moléculas

de agua en el proceso de formación del complejo antígeno-anticuerpo puede representarse como la modificación de una ecuación termodinámica que expresa la combinación de un anticuerpo con su hapteno o antígeno



y sería la siguiente:



en donde el número de moléculas de agua que se vuelven parte de la masa del solvente como resultado de la formación del complejo, está dado por (x+y). El cambio de energía libre que resulta de la liberación del agua "pegada" se incluye en la medición del valor ΔF junto con la contribución resultante de la formación del complejo. Los compuestos aromáticos (como el DNP) son intrínsecamente hidrofílicos, con una ΔH de + 3 a + 6 Kcal/mol, y los compuestos alifáticos (como el GAT) son ligeramente hidrofóbicos con una ΔH de ^{-1 a} -3 Kcal/mol. De aquí la importancia del solvente y su contribución a la energía libre de los sistemas antigénicos, modificando su carga y solvatación, y por tanto la accesibilidad a su receptor (53).

b) Inhibición estérica por los componentes macromoleculares.

En una fase sólida (como es el caso de receptores unidos a la membrana celular) la formación de enlaces específicos requiere que los centros de las unidades reaccionantes tengan cierta distancia de separación (54). Es posible que las macromoléculas existentes en el suero se interpongan entre los reactantes, aumentando la distancia entre ellos y por tanto dificultan

do la fijación.

c) Trastornos de la difusión. Para la fijación del antígeno por su anticuerpo específico en solución, es importante la existencia de colisiones efectivas. Se sabe que la frecuencia de encuentros entre un ligando y su receptor depende claramente de la velocidad de difusión, así como la concentración de los reactantes y la viscosidad del medio (54). La alta viscosidad del suero podría disminuir significativamente las constantes de difusión de los reactantes, disminuyendo así el número de colisiones y de complejos formados, cuando menos para la velocidad de difusión de DNP-lisina, el suero mostró su capacidad de retardar el equilibrio (Figura 40).

d) Presencia de grupos competitivos. Al analizar los ensayos de precipitación del sistema DNP, en los que se observa una curva difásica, inhibición de la precipitación a concentraciones altas de suero y facilitación de la precipitación a concentraciones bajas de suero, uno se inclinaría a sospechar la presencia de inhibidores competitivos cuyo efecto a bajas concentraciones es el de facilitación de la respuesta. Este es un fenómeno que también se observa en enzimología (55) donde la presencia de un inhibidor competitivo en un sistema con enzimas que tienen dos sitios activos, induce los mismos cambios conformacionales que el sustrato. A concentraciones muy bajas del sustrato específico y del inhibidor, el inhibidor puede facilitar la reacción ya que al fijarse al primer sitio el cambio conformacional producido disminuye la constante de disociación de este sitio y aumenta la constante de asociación del sitio vacante.

En estas condiciones el inhibidor actúa como un ligando cooperativo. A altas concentraciones del inhibidor se obtiene la clásica inhibición enzimática, tal y como lo vemos nosotros en la curva de precipitación.

e) Existencia de uno o varios reguladores alostéricos entre los componentes séricos que modifiquen la capacidad de reacción de los determinantes antigénicos y/o los sitios activos de los anticuerpos.

Los efectos alostéricos se describieron por primera vez en --enzimología (56), al observar que ciertas enzimas no seguían un comportamiento clásico, ya que su actividad catalítica se alteraba por la fijación de "compuestos modificadores" a sitios específicos diferentes a los sitios catalíticos o activos (sitios de fijación del sustrato). Dependiendo del tipo de "modificador" la enzima es capaz de aumentar o disminuir su actividad catalítica. Para distinguir los efectos de los "modificadores" sobre las enzimas, de los efectos del sustrato sobre el sitio activo (efectores isostéricos), se les llamó efectores alostéricos. La hipótesis propuesta es que la interacción alostérica es la consecuencia reversible de una alteración, inducida por el efector alostérico, sobre la estructura cuaternaria de la enzima que involucra cambios en los sitios activos y por tanto modifica la fijación del sustrato. El descubrimiento del fenómeno alostérico ha simplificado el entendimiento de los mecanismos fisiológicos reguladores de las reacciones enzimáticas.

También se ha propuesto alosterismo en algunos fenómenos inmunológicos, pero estas escasas descripciones no proponen la regulación de las propiedades intrínsecas de la reacción antígeno-anticuerpo. Koshland

(57) demostró que la fijación de antígeno a un solo sitio activo de la mo lécula de IgM produce cambios conformacionales de la fracción Fc, con cam bios funcionales como fijación de complemento y la reactivación del poli- péptido J. Hoffmann (58) describe a los anticuerpos como proteínas alo- stéricas y postula que el antígeno se comporta como un regulador alostéri- co (activador) que al fijarse al sitio activo del anticuerpo produce un ca mbio conformacional que permite al primer componente del complemento -- (sustrato) fijarse a la porción Fc, desencadenando la cascada del comple- mento. También se ha descrito que la liberación de histamina es debida a un efecto alostérico (59) ya que los anticuerpos fijados a la membrana de los mastocitos o células cebadas al fijar al antígeno específico cambian la conformación de su fragmento Fc, y se dispara así una acción sobre la membrana de los mastocitos y la subsecuente degranulación. Similares cam bios conformacionales describe Taranta (60), para explicar la anafilaxia cutánea pasiva.

Nosotros proponemos la existencia de alosterismo sobre la -- reacción antígeno-anticuerpo en base a que la reacción se modifica, tanto positiva como negativamente por condiciones no extremas del ambiente, si- no más bién por factores orgánicos, a rangos y en condiciones fisiológi- cas. Nuestra hipótesis de alosterismo se ve fortalecida por el ensayo de la cinética de intercambio de hidrógeno en la que se encontró que la sim- ple presencia de suero normal produce cambios conformacionales en las mo léculas de inmunoglobulinas.

El modelo matemático desarrollado también nos sugiere regulación alostérica, ya que las gráficas muestran cambios tanto en la pendiente como en el intercepto (Figura 37). Si bien el cambio de pendiente también es consistente con inhibición competitiva, la gráfica del experimento que se encuentra en la figura 27 hace difícil sostener la idea de inhibición competitiva, ya que en este tipo de inhibición, a concentraciones constantes del inhibidor, el aumento del ligando debería hacer reversible la inhibición. En la figura 27 se observa que aún al aumentar la concentración del antígeno en varios órdenes de magnitud, persiste la inhibición, sugiriendo que la regulación se debe exclusivamente a alosterismo.

De nuestras observaciones podríamos concluir que las fuerzas que determinan el estado de equilibrio del sistema son reguladas por las condiciones ambientales donde ocurre la reacción. Estas condiciones no son extremas, sino las condiciones reales de una reacción antígeno-anticuerpo: es decir, el compartimento vascular.

La capacidad reguladora del suero sobre la reacción antígeno-anticuerpo incide sobre los campos de la fisiología, la biología, la patología y la tecnología de la respuesta inmune.

Desde el punto de vista fisiológico resulta interesante que en condiciones de ensayo que semejan las reacciones "in vivo", es decir en presencia de suero, se inhibe la participación de los anticuerpos de alta afinidad y se facilita la reacción de los anticuerpos de baja afinidad. Esto implicaría un ahorro de ---

anticuerpo de alta afinidad cuando solo una parte de ellos son suficientes para montar una respuesta inmune adecuada y una magnificación de la reacción de los anticuerpos cuando estos son de menor afinidad. También es interesante notar la disminución en la fijación de antígeno en presencia de concentraciones bajas de antígeno y aumento de la fijación en concentraciones altas de antígeno, nuevamente como mecanismos de ahorro y magnificación respectivamente, que hacen que la respuesta inmune sea más efectiva en desafíos con mucho antígeno y no se consuman todos los anticuerpos cuando una respuesta menor sea suficiente. Este aumento en eficiencia resulta claro para el sistema DNP-antiDNP. Al analizar al sistema GAT-antiGAT, también se observa inhibición de los anticuerpos de alta afinidad en las curvas de Scatchard, por lo que se pudieran tomar conclusiones similares a las tomadas para el sistema DNP. Sin embargo, el análisis del sistema GAT resulta más complicado porque hay disminución de la fijación del Ag cuando las concentraciones del antígeno y del suero son altas; lo que no concuerda con un aumento de eficiencia del sistema. La disimilitud de efectos del suero con respecto a los sistemas GAT y DNP -- posiblemente se relacione con la función básica del sistema inmune de reconocimiento de lo "propio" y de lo "no-propio". Hipotéticamente se podría considerar que el determinante antigénico DNP sea más parecido a determinantes propios que los determinantes del GAT y de ahí que existan -- sistemas reguladores que inhiban la reacción con determinantes similares al DNP y no los haya o existan en menor cantidad para determinantes tipo GAT. La proposición de que los determinantes DNP se parezcan a determinantes propios no es completamente descabellada aunque dista de haber si-

do demostrada. En apoyo de la hipótesis podría considerarse la gran distribución de anticuerpos antiDNP en todas las especies de vertebrados, lo que sugiere una presión selectiva interna en la conservación del gen antiDNP, tal vez proveniente de estímulos internos del propio organismo.

Desde el punto de vista biológico, los resultados muestran la importancia del microambiente circundante como una fuente de variabilidad de la respuesta inmune, no alternativa al determinismo genético sino complementaria a él. Tal variabilidad proporcionaría una mayor flexibilidad al sistema para adaptarse a confrontaciones en el reconocimiento de lo propio y de lo no-propio. La fijación heterogénea del hapteno por anticuerpos altamente purificados, quizá incluso monoclonales, puede deberse en parte a la distribución azarosa de estados energéticos entre las poblaciones de moléculas de anticuerpos (61); distribución que a su vez puede ser afectada por las características físico-químicas del solvente.

No es necesario postular cientos de genes para la fijación heterogénea de un hapteno, si existe la alternativa de que pocos productos de genes diferentes pueden existir en diferentes estados energéticos, algunos de ellos capaces de reaccionar en cierto grado con el hapteno.

Desde el punto de vista evolutivo, esta flexibilidad en el repertorio de los anticuerpos aumentaría la habilidad del organismo de sobrevivir en medios ecológicos cambiantes.

La demostración del efecto regulador, positivo y negativo, del suero sobre la reacción antígeno-anticuerpo, suscita posibilidades

teóricas interesantes en el campo de la inmunopatología. Quizá algunos fenómenos de autoinmunidad sean debidos a la reacción de los anticuerpos con células y/o tejidos, debido a reacciones cruzadas y que de algún modo son magnificados por la presencia de componentes del suero con efecto facilitador. Por otra parte, los efectos moduladores, positivos y negativos del suero, pudieran explicar el que ciertos individuos presenten manifestaciones de hipersensibilidad mientras que otros no. Lo mismo sería aplicable a enfermedades por complejos inmunes en los cuales el efecto inhibidor del suero sobre la reacción antígeno-anticuerpo sería la de disminuir la precipitabilidad de los complejos y por tanto evitar su efecto nocivo. En cambio, cuando el suero actuase favoreciendo la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo y su subsecuente depósito en vasos sanguíneos, glomérulos renales, etc., se manifestaría clínicamente la enfermedad.

El conocimiento del efecto del suero sobre la reacción antígeno-anticuerpo resulta de gran valor al analizar la tecnología inmunológica. Gran parte de las pruebas inmunológicas realizadas "in-vitro" requiere de antisueros, como son las pruebas de precipitación, aglutinación radioinmunoensayo, ELISA, etc. Otras pruebas requieren de suero total como fuente de complemento: fijación de complemento, capacidad hemolítica, capacidad citotóxica, etc., por lo tanto, si el suero afecta a la reacción antígeno-anticuerpo, debe uno ser muy cauto al interpretar y al establecer controles y standards para ensayos tan sensibles como son el radioinmunoensayo y el ELISA. Estos problemas técnicos ya han sido reportados.

Encuestas realizadas en diversos laboratorios utilizando el radioinmunoensayo con muestras standard, han obtenido tal variedad de resultados que los estimados oscilan entre el 17 y el 115% de la concentración del antígeno (62). Nuestras observaciones permiten el entendimiento de estas variaciones y por tanto el establecimiento de controles más estrictos para aumentar la sensibilidad, confiabilidad y reproducibilidad de estas pruebas.

En resumen, hemos descrito la capacidad del suero normal para modular la reacción antígeno-anticuerpo. Postulamos que el efecto regulador del suero no-inmune incide sobre el grado de agregación, solubilidad, composición, arreglo tridimensional y afinidad de los complejos, afectando las interacciones entre los reactantes y el solvente. Entre otros mecanismos factibles avanzamos la hipótesis de una regulación alostérica de los anticuerpos por parte de componentes séricos. La regulación de la reacción antígeno-anticuerpo por componentes no-inmunes implica una reducción en la diversidad de los anticuerpos e incide sobre la fisiología y patología de la respuesta inmune, así como vitaliza las interpretaciones de las técnicas inmunológicas.

Definitivamente las observaciones de la regulación de la reacción antígeno-anticuerpo por componentes séricos están sólidamente consolidados por métodos experimentales, pero su interpretación y significado último para el marco conceptual de la inmunología aún no están establecidos sólidamente y requiere de identificación de los componentes que par-

ticipan y de estudios conformacionales más críticos que los hasta ahora -
realizados. De todas formas el área es de gran interés por sus implica--
ciones teóricas y médicas.

Apéndice # 1

1. Antecedentes Históricos del Efecto del Suero sobre la Reacción Antígeno-Anticuerpo

En la literatura se encuentran algunos ejemplos del efecto de ciertas proteínas (especialmente proteínas séricas) y de iones (llamados iones caotrópicos) sobre la reacción antígeno-anticuerpo. Estos reportes son difíciles de analizar y sacar conclusiones pues los efectos contrarios encontrados pudieran ser debidos a que los experimentos, las proteínas ensayadas, la metodología, las especies animales utilizadas y las condiciones de los ensayos varían de autor a autor, según se aprecia en la Tabla # 1. Sin embargo surgen algunas observaciones interesantes en estos artículos:

1. El suero afecta a la reacción antígeno-anticuerpo, siendo este un fenómeno universal ya que se observa en diversos sistemas Ag-Ac, en mayor o menor grado pero presente con sueros de diferentes especies, y prácticamente con cualquier método inmunológico empleado.
2. Parece no haber efecto de suero normal de recién nacido en la precipitación de gamaglobulinas agregadas, mientras que suero de adultos normales aumenta dicha precipitación (13).
3. El suero actúa sobre el aumento de la fijación de hormonas en radioinmunoensayo, pero este efecto es reversible, desaparece a los pocos días de la incubación (15).
4. Es un fenómeno dependiente de temperatura, efectivo a los 37°C., pero que desaparece al ser ensayado a 25°C (26).

5. El efecto del suero se observa en reacciones de precipitación --- tanto en zonas de equivalencia (20), como en zonas de exceso de Ag (12,20), o en zonas de exceso de Ac (16,20).
6. Al ensayar sueros homólogos y heterólogos al sistema Ag-Ac ensayado, se observó mayor solubilidad de los complejos con los sueros heterólogos (22).
7. Se requiere de la porción Fc de los anticuerpos para que el suero ejerza su poder solubilizador sobre los complejos (22) o facilitador de la hemaglutinación (24).
8. El efecto del suero se ha observado en complejos formados por -- IgA (23) y no solamente por IgG.
9. Se han realizado muchos intentos para tratar de caracterizar la proteína sérica responsable del efecto del suero sobre la reacción Ag-Ac, siendo los resultados en algunos casos contradictorios
 - a) La proteína se encuentra en la fracción euglobulínica del suero (12,17), con movilidad electroforética de gamaglobulina (14).
 - b) Algunos autores encuentran que es una proteína termolábil -- (14,16,17) mientras que otros aducen que es termoestable (24).
 - c) Estudios de ultracentrifugación han demostrado que tiene un coeficiente de sedimentación de 10.5S (13) o de 11.1S (14).
 - d) Algunos autores afirman que es independiente de iones divalentes (13,14,17) y otros afirman su dependencia de iones divalentes (20,26).
 - e) La proteína responsable del efecto del suero varía según los diferentes autores, aunque la mayoría piensa que es alguna -- proteína relacionada con el sistema de complemento como: -- factor de C₁ (pero no C₁) que lo precede en el fenómeno de -- cascada (13,14); C₁ (16); C_{1q} (17); C₃ (20,21); C_{3b} y C₄ (22) -- factores de la vía alterna del complemento (21, 23,25), C₃ -- convertasa (26). Estas hipótesis están basadas en la termolabilidad o termoestabilidad de la proteína, el requerimiento o no de calcio, magnesio o ambos, y el uso de zimosan, y/o de veneno de cobra.

- f) En cambio, otros autores piensan que el efecto del suero es -- debido a una proteína de alto peso molecular independiente -- del sistema del complemento. Se ha involucrado a la IgM o a la α_2 macroglobulina, ya que antisueros preparados contra estas dos proteínas anulan el efecto del suero (18) Nicolaisen (24) encuentra que es una betaglobulina con peso molecular de alrededor de 500,000, solo presente en las aves, y otros autores asumen que el efecto del suero es únicamente debido a la presencia de IgG de diferentes estructuras y diversas afinidades que reacciona en diferente forma con el antígeno utilizado, especialmente cuando se trata de un antígeno proteico (27).

En cuánto a los iones caotrópicos, estos ejercen su efecto -- aumentando la entropía y el efecto lipofílico del solvente (28) y favorecen la transferencia de grupos apolares al agua, por lo que aumenta la solubilidad en agua de proteínas particuladas, por lo tanto se considera que los iones caotrópicos tienen tres efectos principales sobre las moléculas orgánicas y biopolímeros: desnaturalización, despolimerización y aumento de la solubilidad. Dandliker (29) en 1967 demostró el efecto de iones caotrópicos tales como tiocianato, perclorato y iodo sobre la reacción Ag-Ac ya que disociaban los enlaces hidrofóbicos, los enlaces iónicos y los enlaces de hidrógeno, responsables de la interacción de estas moléculas. Esta disociación no afectaba a los reactantes ya que su funcionabilidad podía ser nuevamente probada en nuevos ensayos. Posteriormente Vater (30), utilizando técnicas de radioinmunoensayo, demostró que los iones caotrópicos afectan principalmente a la constante de afinidad pero no al número de sitios de fijación de la reacción. Los aniones más caotrópicos fueron el tiocianato, el iodo y el perclorato, aunque también se encontró efecto de nitratos, bromo y cloro, y entre los cationes, los divalentes (bario, calcio y magnesio) tuvieron un efecto más marcado que los monovalentes. Es -

interesante notar que varios de los iones caotrópicos, tanto los iones reportados por Vater como los reportados por otros autores (ácidos grasos (28), urea y fluor (29)), son componentes habituales de los diversos compartimentos orgánicos.

Como se observa, son varios los componentes del suero que ejercen efecto sobre la reacción antígeno anticuerpo. El tipo de efecto y su extensión también son variables; lo que apuntaría a efectos multifactoriales. Sin embargo, no está explorado el efecto de estos componentes sobre los parámetros de la reacción y por tanto no se explica plenamente la importancia que pudieran tener el microambiente sobre las propiedades de la reacción antígeno-anticuerpo.

Apéndice # II

2. Afinidad y Avidéz

Afinidad se refiere a la fuerza de interacción entre un hapte-
no y un sitio activo de un anticuerpo dirigido contra él, y avidéz a la -
fuerza de interacción entre un antígeno y el sitio activo de su anticuer-
po específico. La afinidad o avidéz es una medida termodinámica de la --
fuerza de interacción hapteno-anticuerpo o antígeno-anticuerpo y se puede
expresar como la constante de equilibrio K_o (litros/mol) o como el cambio
en la energía libre ΔF (Kcal/mól) porque K_o y ΔF se relacionan por la fó-
mula:

$$\Delta F = -RT \ln K_o$$

La interacción hapteno-anticuerpo o antígeno-anticuerpo es de
tipo no covalente, por lo tanto la afinidad o avidéz también se pueden in-
terpretar como la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas de tipo no
covalente que tienen las moléculas situadas a distancias muy pequeñas una
de otra, como son: puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o --
apolares, interacciones iónicas o coulombicas, fuerzas de Van der Waal y
factores estéricos o fuerzas estéricas repulsivas. Esto implica que un -
anticuerpo de alta afinidad o de alta avidéz es el que forma un enlace --
fuerte con el hapteno o antígeno formando un complejo hapteno-anticuerpo o
antígeno-anticuerpo estable, con una tendencia baja a disociarse. Un an-
ticuerpo de baja afinidad o baja avidéz forma un complejo con el hapteno

o el antígeno menos estable que requiere menos energía para disociarse. --
Por lo tanto, entre más alta sea la afinidad o avidez del anticuerpo mayor
será la cantidad de hapteno o de antígeno unido al anticuerpo en el equili
brio (63).

En esta tesis se usó el término afinidad como sinónimo de avi
dez, por implicar el mismo cambio en energía libre, y se empleó tanto en -
la reacción hapteno-anticuerpo como en la reacción antígeno-anticuerpo, --
tomando en consideración que al utilizar antígeno intervienen más fuerzas
de interacción que al utilizar hapteno.

Apéndice # III

3. Deducción de las ecuaciones de Scatchard, y de Sips

Las ecuaciones de Scatchard (45) y Sips (46) estiman los valores del número total de sitios activos (S_0) de una población de receptores y su constante de afinidad aparente (K_0) cuando no hay interacción -- entre los sitios.

La interacción entre un solo sitio activo del anticuerpo (S) y un hapteno monovalente (A) con constantes de asociación y disociación - K' y K'' respectivamente se puede representar al equilibrio como:



donde AS es el producto de la reacción. La ley de acción de masas relaciona la velocidad de formación del complejo con la concentración de los reactivos. En el equilibrio las velocidades de asociación y disociación serán iguales:

$$K_0 = \frac{k'}{k''} = \frac{[AS]}{[A][S]} \quad (III, 2)$$

donde K_0 es la constante de afinidad al equilibrio, reorganizando los términos de la ecuación (2), tendremos:

$$[AS] = K_0 [S][A] \quad (III, 3)$$

y si consideramos que:

$$[S] = [S]_0 - [AS] \quad (III, 4)$$

donde $(S)_0$ es la cantidad inicial o total de sitios activos, sustituyendo la ecuación (4) en la ecuación (3), tendremos:

$$[AS] = K[A] ([S]_0 - [AS]) \quad (III, 5)$$

y reorganizando nuevamente:

$$\frac{[AS]}{[A]} = K_0 [S]_0 - K [AS] \quad (III, 6)$$

La ecuación de Sips parte de la ecuación de Scatchard, al dividir la ecuación (6) entre $(S)_0$

$$\frac{[AS]}{[A][S]_0} = \frac{K_0 [S]_0}{[S]_0} - \frac{K_0 [AS]}{[S]_0} \quad (III, 7)$$

y si consideramos que:

$$r = \frac{[AS]}{[S]_0} \quad (III, 8)$$

al sustituir "r", tendremos

$$\frac{r}{[A]} = K_0 - K_0 r \quad (III, 9)$$

y finalmente, la ecuación de Sips, se expresa como:

$$\frac{r}{1-r} = (K_0 [A])^a \quad (III, 10)$$

y en su expresión logarítmica como:

$$\log \frac{r}{1-r} = a \log K_0 + a \log [A]$$

(III, 11)

donde "a", representa al índice de heterogeneidad de la afinidad de los --
sitios activos del anticuerpo por su ligando.

Apéndice IV

4. Deducción de la Ecuación de Langmuir-Klotz

La ecuación de Langmuir (46), llamada "Isoterma de Langmuir", también conocida como la ecuación de Klotz (47) que relaciona la cantidad de ligando fijado en relación a la concentración total de proteína, también se deriva de la Ley de Acción de Masas.

Partiendo de la ecuación (III, 5) del Apéndice III tenemos -

$$[AS] = K [A] ([S]_0 - [AS]) \quad (\text{III, 5})$$

resolviendo y reorganizando

$$[AS] + K [A] [AS] = K [A] [S]_0 \quad (\text{IV, 1})$$

factorizando:

$$[AS] (1 + K [A]) = K [A] [S]_0 \quad (\text{IV, 2})$$

resolviendo:

$$\frac{[AS] (1 + K [A])}{[S]_0} = K [A] \quad (\text{IV, 3})$$

y:

$$\frac{[AS]}{[S]_0} = \frac{K [A]}{1 + K [A]} \quad (\text{IV, 4})$$

si $r = \frac{(AS)}{(SO)}$, de la ecuación (III, 8) del Apéndice III

sustituimos,

$$r = \frac{K (A)}{1 + K (A)} \quad (IV, 5)$$

cuando se trata de la interacción de una molécula bivalente con dos ligandos se aplica la ecuación

$$r = \frac{n K (A)}{1 + K (A)} \quad (IV, 6)$$

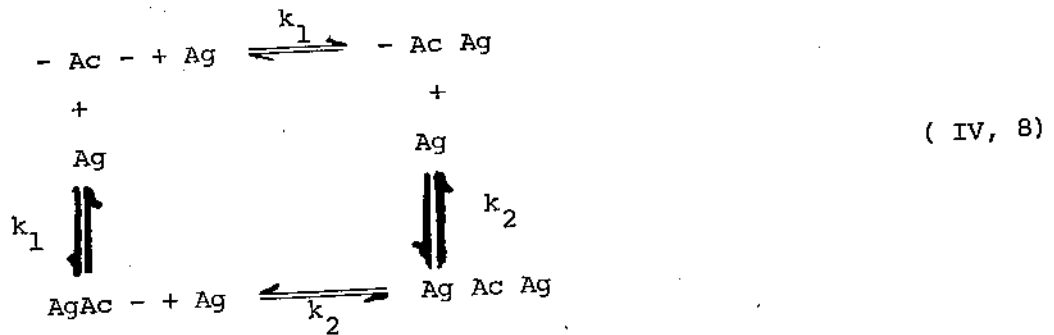
Esta ecuación indica que si se tienen "n" sitios independientes de fijación por molécula, la fijación total será el de "n" veces el de un sólo sitio con la misma constante intrínseca "K".

Esta ecuación también se conoce en su forma equivalente:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{nK} \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{n} \quad (IV, 7)$$

que al establecer una relación lineal, permite el análisis gráfico de las constantes "n" y "K". Esto se puede aplicar a la reacción antígeno-anticuerpo.

La ecuación al equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo, donde el anticuerpo es una proteína bivalente, será



si representamos al anticuerpo por "P" y al ligando por "A"

$$r = \frac{k_1 (P) (A) + 2 k_1 k_2 (P) (A)^2}{P + k_1 (P) (A) + k_1 k_2 (P) (A)^2}
 \quad (\text{ IV, 9})$$

al dividir tanto numerador como denominador entre "P", tendremos:

$$r = \frac{k_1 (A) + 2 k_1 k_2 (A)^2}{1 + k_1 (A) + k_1 k_2 (A)^2}
 \quad (\text{ IV, 10})$$

si los dos sitios del anticuerpo tienen la misma afinidad intrínseca por A, se pueden sustituir las constantes individuales k_1 y k_2 por la constante de afinidad intrínseca, mediante la relación

$$k_i = \frac{n - i + 1}{i} K
 \quad (\text{ IV, 11})$$

por lo tanto en la ecuación general de 2 sitios de fijación

$$r = \frac{n K(A) + \frac{2n(n-1)}{2!} K^2 (A)^2}{1 + n K(A) + \frac{n!}{n!} K^n (A)^n}
 \quad (\text{ IV, 12})$$

substituyendo, tendremos:

$$r = \frac{2 K(A) + 2 K^2 (A)^2}{1 + 2 K(A) + K^2 (A)^2}
 \quad (\text{ IV, 13})$$

nótese que el denominador es la expansión del binomio $(1 + K(A))^2$ y el numerador es la derivada del denominador con respecto a A una vez factorizada

A:

$$\text{numerador} = (A) \frac{\partial (1 + K(A))^2}{\partial A} = (A) [2K (1 + K(A))] \quad (\text{IV}, 14)$$

sustituyendo en "r", tendremos

$$r = \frac{(A) 2K (1 + K(A))}{(1 + K(A))^2} = \frac{2 K(A)}{1 + K(A)} \quad (\text{IV}, 15)$$

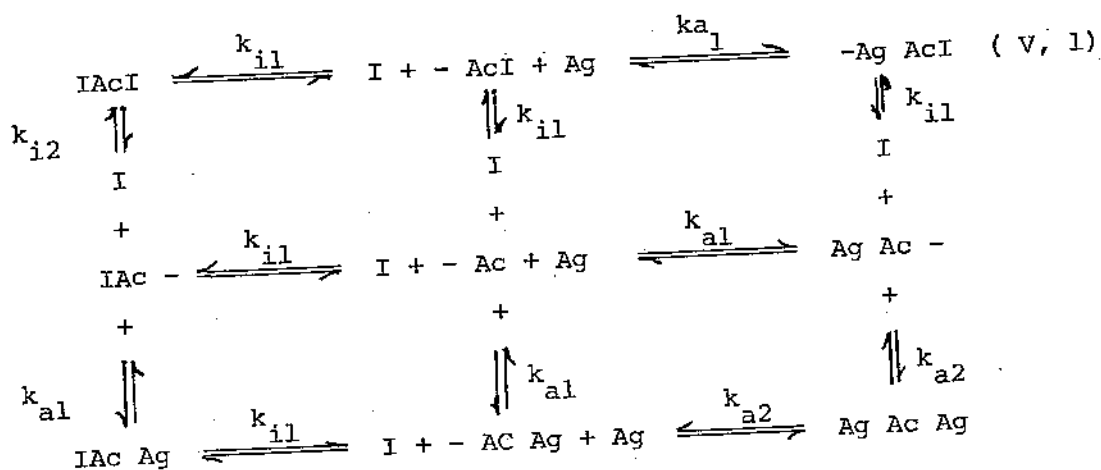
o en su forma general

$$r = \frac{n K(A)}{1 + K(A)} \quad (\text{IV}, 16)$$

Apéndice V

5. Inhibición Competitiva

Si se agrega un inhibidor competitivo a la reacción antígeno-anticuerpo, donde el inhibidor y el ligando se excluyen mutuamente, la ecuación al equilibrio será:



la ecuación de Klotz, que determina el grado de fijación, donde k_a es la constante de afinidad del ligando y k_i es la constante de afinidad del inhibidor

$$r = \frac{2 K_a (A) + 2 K_a^2 (A)^2 + 2 K_a (A) K_i (I)}{1 + 2 K_a (A) + K_a^2 (A)^2 + 2 K_a (A) K_i (I) + 2 K_i (I) + K_i^2 (I)^2}$$

(V, 2)

el denominador se puede sustituir por la expresión general del binomio

$$1 + K_a (A) + K_i (I)^2$$

(V, 3)

y el numerador se puede sustituir por la derivada del denominador con respecto a "A", una vez factorizado este:

$$\text{numerador} = \frac{\partial [1 + K_a(A) + K_i(I)]^2}{\partial (A)} = A [2K_a(1 + K_a(A) + K_i(I))] \quad (V, 4)$$

sustituyendo en "r"

$$r = \frac{2 K_a(A) [1 + K_a(A) + K_i(I)]}{[1 + K_a(A) + K_i(I)]^2} \quad (V, 5)$$

resolviendo

$$r = \frac{2 K_a(A)}{1 + K_a(A) + K_i(I)} \quad (V, 6)$$

en su expresión general

$$r = \frac{n K_a(A)}{1 + K_a(A) + K_i(I)} \quad (V, 7)$$

y en su forma inversa

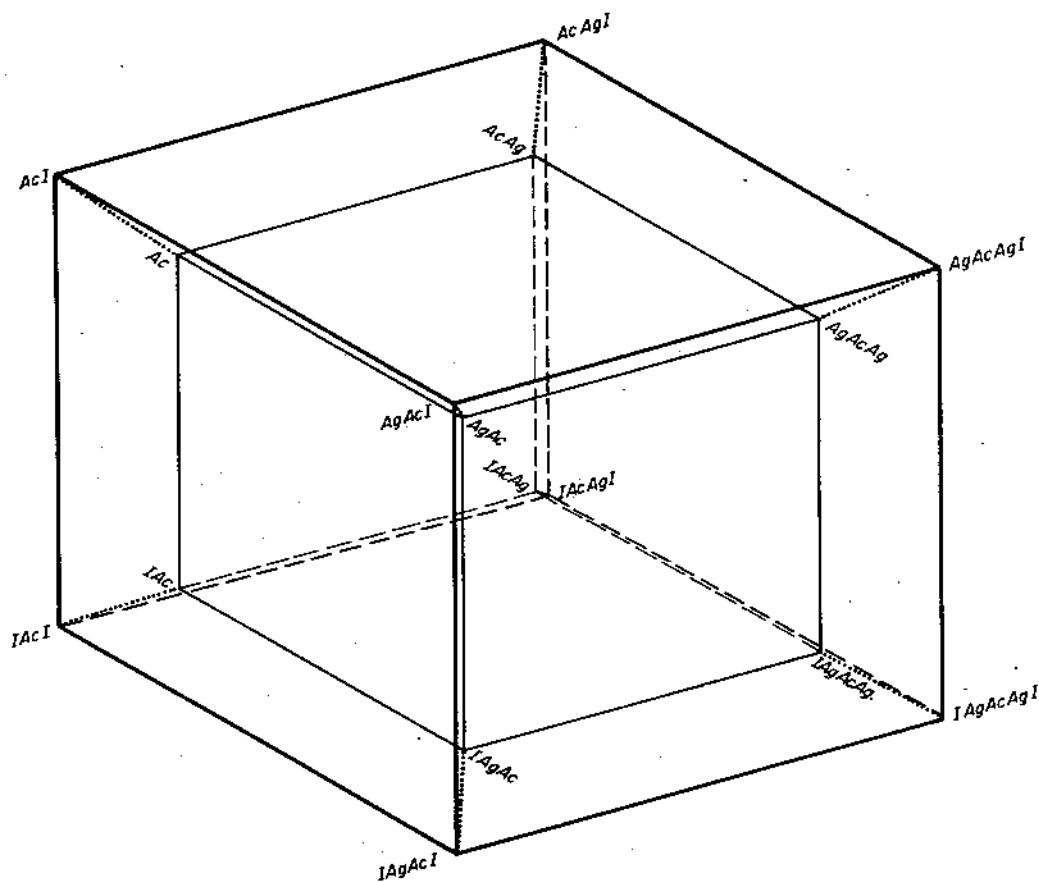
$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1 + K_i(I)}{n K_a(A)} \quad (V, 8)$$

Esta ecuación nos indica que en presencia de un inhibidor competitivo, habrá cambios en la pendiente de la curva.

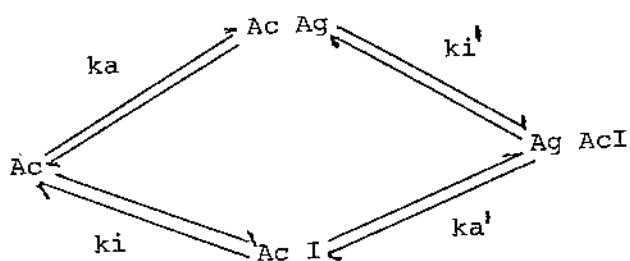
Apéndice VI

6. Regulación Alostérica

Si suponemos la presencia de un regulador alostérico en la --
reacción antígeno-anticuerpo, que cambie la conformación del anticuerpo, de
tal forma que la constante de afinidad del anticuerpo para el ligando se --
altere, tendríamos la siguiente ecuación al equilibrio.



Las constantes de afinidad modificadas, tanto para el ligando como para el regulador alostérico, una vez que se ha fijado el primero de ellos al anticuerpo, se interrelacionan entre sí, por el principio termodinámico de reversibilidad microscópica (64).



(VI, 1)

despejando las constantes

$$k_a = \frac{(Ac\ Ag)}{(Ac)(Ag)}$$

$$k_a' = \frac{(Ag\ Ac\ I)}{(AcI)(Ag)} \quad (VI, 2)$$

$$k_i = \frac{(Ac\ I)}{(Ac)(I)}$$

$$k_i' = \frac{(Ag\ AcI)}{(Ac\ Ag)(I)}$$

de la ruta superior se desprende que

$$Ac = \frac{Ac\ Ag}{k_a\ Ag} = \frac{Ag\ Ac\ I}{k_a\ Ag\ k_i\ I} \quad (VI, 3)$$

y de la ruta inferior

$$Ac = \frac{Ac\ I}{k_i\ I} = \frac{Ag\ AcI}{k_i\ I\ k_a\ Ag} \quad (VI, 4)$$

por lo tanto, la equivalencia de ambas rutas indica que

$$\frac{k_a'}{k_a} = \frac{k_i'}{k_i} \quad (VI, 5)$$

o

$$\frac{k_a'}{k_i'} = \frac{k_a}{k_i} \quad (VI, 6)$$

la extensión de la fijación será

$$r = \frac{2 Ka(A) + 2 Ka^2(A)^2 + 2 Ka(A)Ki(I) + 2 Ka(A)^2 Ki(I)}{1 + 2 Ka(A) + Ka^2(A)^2 + 2 Ki(I) + Ki^2(I)^2 + 4 Ka(A) Ki(I) + 2Ka^2(A)^2 Ki(I) + 2 Ka(A) Ki^2(I)^2 + Ka^2(A)^2 Ki^2(I)^2} \quad (VI, 7)$$

el denominador se puede sustituir por su expresión binomial reducida

$$\left[1 + Ka(A) + Ka(A) Ki(I) + Ki(I)\right]^2 \quad (VI, 8)$$

y el numerador por la derivada del denominador con respecto a "A"

$$A \frac{\partial \left[1 + Ka(A) + Ka(A) Ki(I) + Ki(I)\right]^2}{\partial A} = A \left[2Ka(1 + Ka(A) + Ki(I) + Ka(A) Ki(I))\right] \quad (VI, 9)$$

sustituyendo en "r"

$$r = \frac{2Ka(A) \left[1 + Ka(A) + Ki(I) + Ka(A) Ki(I)\right]}{\left[1 + Ka(A) + Ki(I) + Ka(A) Ki(I)\right]^2} \quad (VI, 10)$$

resolviendo

$$r = \frac{2 Ka(A)}{1 + Ka(A) + Ki(I) + Ka(A) Ki(I)} \quad (VI, 11)$$

en su expresión general

$$r = \frac{n Ka(A)}{1 + Ka(A) + Ki(I) + Ka(A) Ki(I)} \quad (VI, 12)$$

y en su forma inversa,

$$\frac{1}{r} = \frac{1 + Ki(I)}{n} + \frac{1 + Ki(I)}{n Ka(A)} \quad (VI, 13)$$

que indica el cambio en pendiente y en intercepto de la curva cuando existe un regulador alostérico en el sistema.

BIBLIOGRAFÍA

1. Landsteiner, K.: The Specificity of Serological Reactions, 2a. -
Edición Revisada. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
1945.
2. Jerne, N.K.: The Somatic Generation of Immune Recognition. Europ.
J. Immunol. 1: 1, 1971.
3. Pressman, D.,; Roholt, O.A., and Grossberg, A.L. Chemical and
Structural Differences Between Antibodies Capable of Binding
a Particular Hapten Group: Evidence for Limited Heterogeneity
Ann. N.Y. Acad. Sci. 169, 65 (1970).
4. Cameron, D. J., y Erlanger, B.F.: Evidence for Multispecificity of
antibody molecules. Nature 268: 763, 1977.
5. Williamson, A.R.; Zitron, I.M., y McMichael, A.J.: Clones of B
Lymphocytes: their Natural Selection and Expansion: Fed.
Proc. 35: 2195, 1976.
6. Richards, F.F.; Konigsberg, W.H., Rosenstein, R.W., y Varga, J. M.:
On the Specificity of Antibodies. Science 187: 130, 1975.
7. Bretscher, P.A.: The Evolution of the Immune System and the Generation
of Diversity, En: The Generation of Antibody Diversity. A
New Look. Academic Press, N. Y. 1976.
8. Steward, M.W., y Glynn, L.E.: Immunochemistry: An Advanced Textbook
John Wiley & Sons, Londres, 1977.
9. Weigert, M.; Gatmaitan, L.; Loh, E.; Schilling, J., y Hood, L.:
Rearrangement of Genetic Informacion may Produce Immunoglobulin
Diversity. Nature 276: 785. 1978.

10. Brack, C.; Hiram, M.; Lenhard-Schuller, R., y Tonegawa, S.: A Complete Immunoglobulin Gene is Created by Somatic Recombination. Cell, 15: 1, 1978.
11. Ben-Sasson, S.A.: Immunoglobulin Differentiation is Dictated by Repeated Recombination Sequences Within the V Region Prototype Gene: A Hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4598, 1979.
12. Weigle, W., y Maurer, P.H.: The Effect of Complements on Soluble Antigen-Antibody Complexes. J. Immun. 79: 211, 1957.
13. Taranta, A.; Weiss, H. S., y Franklin, E.C.: Precipitating Factor for Aggregated gamaglobulins in normal Human Sera. Nature 89: 239, 1961.
14. Muller-Eberhard, H.J., y Kunkel, H.G.: Isolation of a Thermolabil Serum Protein which Precipitates Gamaglobulin Aggregates and Participates in Immune Hemolysis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106: 291, 1961.
15. Cerasi, E.; Della Casa, L.; Luft, R., y Roovete, A.: Determination of Human Growth Hormone (HGH) in Plasma by a Double Antibody Radioimmunoassay. Acta Endoc. 53: 101, 1966.
16. Paul, W.E., y Benacerraf, B.: Problems Encountered in Double Diffusion Analysis in Agar of Hapten Specific Immune Systems. J. Immun. 95: 1067, 1966.
17. Burr, I., M.; Grant, D. B.; Sizonenko, P.C.; Kaplan, S.L., y Grumbach, M.M.: Some Critical Factors in Double Antibody Radioimmunoassay Systems Utilizing Sheep Anti-Rabbit Precipitating sera for Measurement of Human Serum LH, FSH and HGH. J. Clin. Endocr. 29: 948, 1969.

18. Reuter, A. M.; Hendrick, J.C.; Sulon, J., y Franchimont, P.: Interference by Serum Proteins with LH Radioimmunoassay Using Immunosorbent. Acta Endocr. 72: 235, 1973.
19. Hunter, W.M.; Bennie, J.G.; McLaren, H., y Thistlethwaite, D.: Non-Specific Interference in Radioimmunoassays for Plasma H-LH and H-FSH. Acta Endocr. (Kbh). Suppl. 177; 97, 1973.
20. Miller, G.W., y Nussenzweig, V.: A New Complement Function: Solubilization of Antigen-Antibody Aggregates. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 418, 1975.
21. Miller, G. W.; Steinberg, A.D.; Green, I., y Nussenzweig, V.: Complement-Dependent Alterations in the Handling of Immune Complexes by NZB/W mice. J. Immun. 114: 1166, 1975.
22. Czop, J., y Nussenzweig, V.: Studies on the Mechanism of Solubilization of Immune Precipitates by Serum: J. Exp. Med. 143: 615, 1976.
23. Miller, G.W.: Solubilization of IgA Immune Precipitates by Complement: J. Immun. 117: 1374, 1976.
24. Nicolaisen, E.M.; Koch, C.; Hala, K., y Simonsen, M.: Antigen-Antibody Complex Binding Serum Proteins in the Chicken. Folia Biologica (Praha) 23: 426, 1977.
25. Miller, G. W.: Complement-Mediated Dissociation of Antibody from Immobilized Antigen. J. Immun. 119: 488, 1977.
26. Takahashi, M.; Tack, B.F., y Nussenzweig, V.: Requirements for the Solubilization of Immune Aggregates by Complement. Assembly of a Factor B-Dependent C3-Convertase on the Immune Complexes. J. Exp. Med. 145 86, 1977.

27. Lea, D. J.: Antisera as a Source of Inaccuracy in Protein Immunoassay. Clin. Chem. 24: 189, 1978.
28. Dandliker, W.B.; Alonso, R.; Saussure, V.A.; Kierszenbaum, F.; Levi-son, S.A., y Schapiro, H.C.: The Effect of Chaotropic Ions on the Dissociation of Antigen-Antibody Complexes. Biochem. 6: 1460, 1967.
29. Hatefi, Y., Y. Hanstein, W.G.: Solubilization of Particulate Proteins and Nonelectrolytes by Chaotropic Agents. Biochem. 62: 1129, 1969.
30. Vater, H. L.; Geuskens, L. M., y Vink, C.L.J.: Influence of ions on the Antigen-Antibody Complex Formation as Measured by Radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta 80: 361, 1977.
31. Celis, E.; Ridaura, R., y Larralde, C.: Effects of the Extent of DNP Substitution on the Apparent Affinity Constant and Cooperation Between Sites in the Reactions of Dinitrophenylated human serum Albumin with Anti-DNP and Anti-HSA Antibodies coupled to agarose. Immunchem. 14: 553, 1977.
32. Yakoleff, G.V., y Larralde, C.: Binding Kinetics of Anti-DNP Antibodies in vivo. Trabajo que se presentará en el Cuarto Congreso Internacional de Inmunología. Paris, Francia, Julio de 1980.
33. Florencia, G.I.: Hipótesis de Multiespecificidad de los Anticuerpos Efecto del pH, Fuera Iónica y Composición Iónica en la Precipitación cualitativa del Complejo Antígeno-Anticuerpo. Tesis Profesional, 1979.
34. Diccionario Enciclopédico Hispano-Americano, Tomo V. W. M. Jackson Ed. 1952.
35. Eisen, H.N., y Belman, S.: Studies of Hypersensitivity to Low Molecular Weight Substances. II. Reactions of some Allergenic Substituted Dinitrobenzenes with Cysteine or Cystine of skin Proteins. J. Exp. Med. 98: 533, 1953.

36. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L., y Randall, R.J.: Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 165, 1950.
37. Eisen, H.N.: Equilibrium Dialysis for Measurement of Antibody Hapten Affinities. Meth. Med. Res. 10: 106, 1964.
38. Ouchterlony, O.: Difussion-in gel Methods for Immunological Analysis. II. Progr. Allergy VI. 1962.
39. Campbell, D.H.; Garvey, J.S.; Cremer, N.E. y Susdorf, D.H.: Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction and Research. 2a. Edición, W.A. Benjamin, Nueva York, 1970.
40. March, S.C.; Parikh, I., y Cuatrecasas, P.: A Simplified Method for Cyanogen Bromide Activation of Agarose for Affinity Chromatography: Analytical Biochem. 60: 149, 1974.
41. Greenwood, F.C.; Hunter, W.M., y Glover, J.S.: The Preparation of ¹³¹I-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. Biochem. J. 89: 114, 1963.
42. Hvidt, A., y Linderstrom-Lang, K.: Exchange of Hydrogen Atoms in insulin with deuterium Atoms in Aqueous Solutions. Biochim. Biophys. Acta. 14: 574, 1954.
43. Englander, S.W.: A Hidrogen Exchange Method Using Tritium and Sephadex: Its Application to Ribonuclease. Biochemistry 2: 798, 1963.
44. Scatchard, G.: The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660, 1949.
45. Sips, R.: On the Structure of a Catalyst Surface. J. Chem. Phys. 16: 490, 1948.
46. Langmuir, I.: The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica and Platinum. J. Am. Chem. Soc. 40: 1361, 1918.

47. Klotz, I.M.: Protein Interactions. en: The Proteins. Vol. 1 parte B Academic Press, Nueva York, 1953.
48. Buckley, C.E.; Whitney, P.L., y Tanford, C.: The Unfolding, and Renaturation of a Specific Univalent Antibody Fragment. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50: 827, 1963.
49. Noelken, M.E.; Tanford, C. Unfolding and Renaturation of a Univalent Antihapten Antibody Fragment. J. Biol. Chem. 239: 1828, 1964.
50. Martell, A.E., y Calvin, M.: Chemistry of the Metal Chelate Compounds. Prentice-Hall. Inc. 1959.
51. Hoffman, W.S.: The Biochemistry of Clinical Medicine. Cuarta Edición. Year Book Medical Publishers. Inc. 1970.
52. Amidon, G. L.; Pearlman, R. S., y Anik, S. T.: The Solvent Contribution to the Free Energy of Protein-Ligand Interactions. J. Theor. Biol. 77: 161, 1979.
53. Karush, F.: Immunologic Specificity and Molecular Structure. Advances in Immunology. Volumen 2. Academic Press. 1962.
54. DeLisi, Ch., y Metsger, H.: Some Physical Chemical Aspects of Receptor-Ligand Interactions. En Immunology of Receptors. Marcel Dekker, Inc. N. Y. 1977.
55. Segel, I.H.: Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. Wiley-Interscience Publication. 1977.
56. Morris, J. G.: A Biologist's physical Chemistry. Edward Arnold. Londres. 1974.
57. Brown, J. C., y Koshland, M. E.: Activation of Antibody Fc Function by Antigen-Induced Conformational Changes. Proc. Nat. Acad. Sci. 72: 5111, 1975.

58. Hoffman, L. G. Antibodies as Allosteric Proteins. I. A Hypothesis. Immunochem. 13: 725, 1976.
59. Ishizaba, T. e Ishizaba, K. Triggering of Histamine Release from Rat Mast Cells by Divalent Antibodies Against IgE-Receptores. J. Immunol. 120: 800, 1978.
60. Ovary, Z., y Taranta, A.: Passive Cutaneous Anaphylaxis with Antibody Fragments. Science 140: 193, 1963.
61. Amidon, G. L.; Pearlman, R. S., y Anik, S. T.: The Solvent Contribution to the Free Energy of Protein-Ligand Interactions. J. Theor. Biol. 77: 161, 1979.
62. Joel, E. W.; Schonberg, D. K., y Keller, E.: Problems of Optimization of Double Antibody Radioimmunoassay of HLH, HFSH and HG. "HOOK" Phenomenon, False Negative Patient Values and Linearity of Values from Patient Plasma Dilutions. En: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine. Vol. I. International Atomic Energy Agency Viena. 1974.
63. Pérez Montfort, R. E.: Cooperatividad en la Reacción Antígeno-Anticuerpo. Tesis Profesional. 1977.
64. Wong, Tzei-Fei, J. Kinetics of Enzyme Mechanisms. Academic Press London. 1975.