

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



ANTICUERPOS ANTI - DNP EN SUEROS
HUMANOS NORMALES

TESIS PROFESIONAL

ENRIQUE ORTEGA SOTO

MEXICO, D. F.

M-21724

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 mis padres,
a mis hermanos
y a Lupita



A Edwin Arcenau,
a Gilberto Chávez
y a Carlos Larralde

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ANTICUERPOS ANTI-DNP EN SUEROS HUMANOS NORMALES

ENRIQUE ORTEGA SOTO
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
1980.

Jurado Asignado Originalmente según el tema:

Presidente	Magdalena Acosta Segura
Vocal	Librado Ortíz-Ortíz
Secretario	Ma. Dolores Lastra Azpilicueta
1er. Suplente	Nohemí Monroy Nava
2do. Suplente	Guadalupe Vázquez Lizardi

Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Inmunología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Sustentante: Enrique Ortega Soto

Asesor: Dr. Carlos Larraide

Ortega
Larraide

C O N T E N I D O

	Pág.
I.- INTRODUCCION	4
II.- MATERIALES Y METODOS	12
A) Diseño Experimental	12
B) Purificación de anticuerpos	13
C) Determinación de constantes de afinidad	16
D) Preparación de eritrocitos sensibilizados	21
E) Ensayos de hemaglutinación con sueros humanos	27
III.- RESULTADOS	31
A) Purificación de anticuerpos	31
B) Determinación de constantes de afinidad	31
C) Estabilidad de eritrocitos sensibilizados	46
D) Sensibilidad del sistema de hemaglutinación	46
E) Frecuencia de actividad anti-DNP en sueros humanos normales	59
IV.- DISCUSION	69
V.- CONCLUSIONES	79
VI.- BIBLIOGRAFIA	80

I INTRODUCCION

La especificidad es una característica importante - de ciertos productos biológicos tales como enzimas, toxinas, anticuerpos, antibióticos, receptores de superficie, etc. La especificidad se refiere a la capacidad de estas moléculas para interactuar con un número reducido de estructuras químicas y no con cualquiera aunque existan similitudes estructurales (1).

Por lo que respecta a los anticuerpos, es un hecho bien establecido que un suero inmune producido en un animal - contra un antígeno de estructura química definida, reacciona - especialmente bien con el antígeno empleado en la inmunización, y raramente lo hace con antígenos diferentes. Cuando - se presentan reacciones cruzadas, éstas son en general más débiles y ocurren con grupos parecidos estructuralmente al antígeno original.

Las causas químicas de la especificidad de un suero inmune por el antígeno fueron claramente establecidas por Landstainer (2). Dado el alto grado de especificidad que muestra un suero inmune, generalmente se ha supuesto que los anticuerpos constituyentes de ese suero inmune poseen el mismo grado de especificidad; es decir, que cada uno de estos anticuerpos, considerado individualmente, es igualmente capaz de reaccionar ex

clusivamente con el antígeno que indujo su formación.

El grado de especificidad de un conjunto de moléculas de anticuerpos idénticas fué muy difícil de evaluar, debido principalmente a que la población de anticuerpos que constituyen un suero inmune es heterogénea. Es decir, un suero inmune contiene una mezcla de inmunoglobulinas diferentes, todas ellas capaces de reaccionar con el antígeno aunque con distintas afinidades.* Cuando se estudiaron las proteínas de mielomas se encontró que estructural y funcionalmente eran indistinguibles de los anticuerpos producidos por inmunización (3,4).- Fué entonces que pudo contarse con cantidades adecuadas de anticuerpos homogéneos para investigar su grado de especificidad. Estudios diversos usando diferentes métodos para detectar actividad de anticuerpos contra algunos antígenos, mostraron que - entre el 1 y el 10% de proteínas de mielomas-tanto murinos (3, 5) como humanos (6,7)- reaccionan con DNP**, con derivados de purinas y pirimidinas (8), con ANS** (9), etc.

* La afinidad es una medida de la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo. La constante de afinidad de un anticuerpo corresponde a la constante termodinámica de la reacción de fijación entre un ligando (H) y un anticuerpo (Ac) en equilibrio:



Para este caso sencillo, la constante de afinidad es: $K = \frac{(HAc)}{(H)(Ac)}$

en donde los paréntesis indican concentraciones molares de las especies involucradas.

Para un tratamiento formal sobre la afinidad en la reacción antígeno-anticuerpo véanse las referencias 34-37.

** DNP es 2,4-dinitrofenol ANS es 1,8-anilino-naftalénsulfonato.

Las altas frecuencias con que se encontraron ciertas especificidades en proteínas de mielomas pueden ser explicadas por alguna de las siguientes hipótesis:

- a) La observación repetida de ciertas especificidades es una consecuencia directa del cambio tumoral; ya sea porque algunas familias o clonas de células plasmáticas son más susceptibles de transformarse en neoplásicas, o bien porque -- aunque cualquier clona puede sufrir la transformación, este cambio la induce a sintetizar inmunoglobulinas con ciertas características estructurales que le permiten fijar -- ciertos ligandos.
- b) El cambio tumoral ocurre al azar y las células que se -- transforman en neoplásicas producen la misma inmunoglobulina que produciría esa clona en condiciones normales. En este caso la frecuencia con que se presente una determinada especificidad en un conjunto de inmunoglobulinas diferentes, será el reflejo de la frecuencia o porcentaje con que esa especificidad está representada en el repertorio total de anticuerpos de esa especie (4). Esto implicaría que entre el 1 y el 10% de todas las clonas de células -- plasmáticas producen anticuerpos anti-DNP, el mismo porcentaje producen anticuerpos anti-ANS, etc.

La primera de estas hipótesis es muy difícil de evaluar experimentalmente de una manera directa, aunque existen algunas evidencias indirectas que la hacen aparecer como poco

probable (3,4,6,10). Una de ellas es el hecho de que las proteínas de mielomas son estructuralmente iguales a las inmunoglobulinas normales, y no parecen poseer ninguna característica estructural que sea común a proteínas de mielomas y que -- pudiera ser consecuencia del cambio tumoral. Un argumento en contra de que existan clonas que sean más susceptibles de transformarse en neoplásicas es el que se han encontrado proteínas de mielomas pertenecientes a todas las clases y subclases de inmunoglobulinas. Además, aunque cierto número de proteínas de mielomas reaccionan con un mismo ligando, lo hacen con constantes de afinidad diferentes. Esto indica que los sitios activos de cada proteína son diferentes y, por lo tanto, que cada una de ellas proviene de una clona de células plasmáticas diferente.

Por el otro lado, la hipótesis alterna (inciso b), - plantea un problema en lo que respecta a la capacidad de un animal para producir anticuerpos contra un número ilimitado de antígenos. Si, el 1% de las células plasmáticas de un animal sintetizan anticuerpos contra un hapteno simple como el DNP o el ANS, entonces el animal solamente tendría capacidad de producir anticuerpos contra un número reducido de determinantes antigénicos. En este caso, para explicar la capacidad de un animal para producir anticuerpos contra un número muy grande de antígenos, se tiene que postular que los anticuerpos son multiespecíficos: es decir, son capaces de reaccionar

con muchos determinantes antigénicos diferentes.

Desde 1959, Talmage (11) había propuesto que la capacidad de un animal para desarrollar una respuesta inmune -- adecuada contra un número ilimitado de determinantes antigénicos distintos, y la alta especificidad de un suero inmune, podrían explicarse mejor si se considera a los anticuerpos como multiespecíficos. Las ideas principales en que basa su hipótesis son las siguientes:

- a) Para que un anticuerpo reaccione con un antígeno no es necesario que sus estructuras sean perfectamente complementarias. Basta con que se establezcan simultáneamente un número suficiente de interacciones débiles (fuerzas de Vander Waals, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de atracción -- electrostáticas, etc.) tales que la energía libre del sistema disminuya. El grado en que la unión del antígeno con el anticuerpo disminuye la energía libre del sistema está reflejado en la constante de afinidad de la reacción.
- b) Una variedad de determinantes antigénicos diferentes deben poder combinarse con una misma molécula de anticuerpo. Cada determinante antigénico establecerá interacciones con un subconjunto específico de los grupos químicos de la superficie del sitio activo.
- c) La especificidad de un suero inmune constituido por muchas especies de anticuerpos diferentes será mayor que la de cada especie individual, porque aunque algunas especies reaccio-

nen con otro antígeno su concentración muy probablemente - estará por debajo del umbral de detección. En otras palabras, la probabilidad de que un número suficiente de especies de anticuerpos compartan dos especificidades es muy - pequeño. Es así como la heterogeneidad de un suero inmune aumenta su especificidad (Figura 1.)

Inman (12), basado en la hipótesis de multiespecificidad de Talmage, ha desarrollado un modelo probabilístico con el cual describe la distribución de frecuencias con que - se presentarían reacciones con cierta constante de afinidad - entre un hapteno elegido al azar y un número grande de especies de anticuerpos diferentes. Con su modelo demuestra tam bién como anticuerpos multiespecíficos pueden constituir un - suero inmune que tenga una especificidad muy alta.

El objetivo de este trabajo es estimar la frecuencia de actividad anti-DNP en sueros humanos normales con el - fin de distinguir entre las dos hipótesis al respecto de las - altas frecuencias de reacciones anti-hapteno observadas con - proteínas de mielomas. La observación de porcentajes altos - de sueros con actividad anti-DNP nos indicaría que la capacidad de fijar DNP es común a muchas de las diferentes especies de anticuerpos. Esto apoyaría la hipótesis de que el cambio tumoral no es selectivo para ciertas clonas de células plasmáticas sino que ocu-

SUEROS ANTI-A CON DISTINTOS GRADOS DE HETEROGENEIDAD Y UNA MISMA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS						NUMERO DE INTERACCIONES ENTRE EL SUERO ANTI-A Y DISTINTOS ANTIGENOS (A-M)												
						A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
⊙ A B C	⊙ A D E	⊙ A F G	⊙ A H I	⊙ A J K	⊙ A L M	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	2	3	4	5	6	++												
⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A D E	⊙ A F G	⊙ A H I	⊙ A J K	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+			
1	1	2	3	4	5	++												
⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A D E	⊙ A F G	⊙ A H I	++	++	++	+	+	+	+	+	+				
1	1	1	2	3	4	++	+	+										
⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A D E	⊙ A F G	++	++	++	+	+	+							
1	1	1	1	2	3	++	++	++										
⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A B C	⊙ A B C	++	++	++										
1	1	1	1	1	1	++	++	++										

Figura 1.- Especificidad de un suero inmune con distintos grados de heterogeneidad.

Sean 1,2,3,4,5 y 6, moléculas distintas de anticuerpos multiespecíficos. Todas ellas reaccionan con el antígeno A, pero las especificidades adicionales (B-M) son diferentes para cada una. Si el suero inmune anti-A está constituido por distintas clases de moléculas, las reacciones con los grupos B-M implicarán pocas interacciones y serán imposibles de detectar. A medida que la heterogeneidad del antisuero disminuye, el número de interacciones con antígenos distintos de A aumenta. Si el suero inmune es homogéneo reconocerá a los antígenos B y C tanto como a A. Así, es claro que la especificidad aumenta con la heterogeneidad dado que haya un límite de detección dependiente del número de interacciones en cada sistema.

Esto es sólo una representación esquemática; tanto el número de especies de anticuerpos que reaccionan con un mismo antígeno como el número de determinantes antigénicos diferentes con que una especie de anticuerpos puede reaccionar, se cree que son mucho mayores (13, 30).

rre al azar y, por ende, apoya la hipótesis de multiespecificidad de los anticuerpos. En caso contrario, la ausencia de actividad anti-DNP en sueros normales indicaría que la capacidad de fijar DNP no es muy común entre las distintas moléculas de anticuerpos que la especie sintetiza. En este caso la alta frecuencia con que las proteínas de mielomas fijan DNP se debería a que ciertas clonas de células son más susceptibles de transformarse en neoplásicas, o bien a que la transformación neoplásica de alguna manera promueve la síntesis de cierto tipo especial de inmunoglobulinas.

II MATERIALES Y METODOS

A.- DISEÑO EXPERIMENTAL

El modelo de Inman (12) describe las frecuencias con que se presentarían reacciones de cierta constante de afinidad entre un hapteno cualquiera y un número grande de inmunoglobulinas individuales que sea representativo del repertorio total de inmunoglobulinas. Prácticamente, es imposible obtener cantidades suficientes de inmunoglobulinas homogéneas a partir de sueros de individuos sanos. Por otro lado, si se emplearan inmunoglobulinas homogéneas obtenidas de mielomas, o a partir de cultivos de células monoclonales obtenidas por hibridización, sería cuestionable el que la muestra analizada fuera verdaderamente representativa del repertorio total, además del sesgo que el cambio tumoral introduciría. Por lo tanto, optamos por investigar la frecuencia de actividad anti-DNP en un conjunto de sueros humanos normales, bajo el supuesto de que el conjunto de inmunoglobulinas que se encuentran en el suero de un individuo en un momento determinado, es un subconjunto representativo del total de inmunoglobulinas diferentes que ese individuo tiene capacidad de sintetizar (13).

Ahora bien, la determinación experimental de la constante de afinidad promedio (K_0) con que reaccionan un hap-

teno y una muestra de anticuerpos es un procedimiento laborioso o requiere del empleo de anticuerpos purificados. Esto resulta en una imposibilidad práctica para realizar la determinación de K_0 en una muestra grande de sueros. - En vista de estas circunstancias, determinamos la K_0 por medio de la actividad anti-DNP en sueros humanos normales mediante un ensayo de hemaglutinación pasiva que sí permite analizar un número considerable de sueros. Previamente fué preciso estudiar la correlación entre el título de hemaglutinación con la concentración y K_0 de los anticuerpos anti-DNP usando poblaciones de anticuerpos anti-DNP con distintas afinidades. Esta correlación nos permitió clasificar a los sueros, de acuerdo a su título de hemaglutinación, en distintas clases según contuvieran o no una población de anticuerpos anti-DNP con una constante de afinidad igual o mayor a ciertos valores arbitrarios. - La proporción de sueros de cada clase en el total de sueros se comparó con las predicciones hechas por el modelo de Inman.

B.- PURIFICACION DE ANTICUERPOS

1) Obtención del suero inmune.

Se usó un borrego que había sido inmunizado previamente con albúmina bovina dinitrofenilada y adyuvante completo de Freund. Se dió un estímulo adicional con 5mg

de $\text{DNP}_{2,3}\text{BSA}^*$ intramuscular. Una semana después se sangró por punción venosa. La sangre se dejó coagular y se separó el suero.

2) Precipitación de Gamma-globulinas

A partir del suero inmune se obtuvo la fracción de gamma-globulinas por precipitación con sulfato de amonio al 33% de saturación (14).

El método consiste en agregar al suero, lentamente y con agitación, la mitad de su volumen de una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7,4). Las gamma-globulinas precipitan y se separan por centrifugación. El precipitado se disuelve en un volumen de solución salina (NaCl al 0.85%), igual al volumen original de suero y se repite la precipitación dos veces más. Al final se elimina el sulfato de amonio por diálisis exhaustiva contra PBS (0.15 M NaCl, 0.01 M fosfato de sodio, pH 7.4).

3) Purificación de anticuerpos anti-DNP

Los anticuerpos anti-DNP se separaron de la fracción de gamma-globulinas por cromatografía de afinidad según una modificación del método de Marck, Parikh y Cuatrecasas (15). Se utilizó Sefarosa 4B a la cual se acopló DNP-lisina por medio de bromuro de cianógeno. La Sefarosa-DNP-lisina se incubó con un volumen igual de la solución de gamma-globulinas, a 25°C y con agitación lenta durante toda una noche. Se filtró en un --

* $\text{DNP}_{2,3}\text{BSA}$. Albúmina sérica bovina con 23 residuos dinitrofenil por molécula

Buchner para recobrar las gamma-globulinas inespecíficas, y se lavó con 3 lts de PBS para eliminar todas -- las proteínas no adsorbidas específicamente.

Para obtener poblaciones de anticuerpos anti-DNP -- con distintas afinidades, los anticuerpos anti-DNP que quedaron adsorbidos a la Sefarosa-DNP-lisina, se eluyeron con un gradiente discontinuo de concentraciones crecientes de DNP. Con tal propósito, en cada elución-- la Sefarosa-DNP-lisina se secó y se incubó durante 1 h., a temperatura ambiente, con un volumen igual de una solución de DNP, agitando ocasionalmente. Se virtió -- en un Buchner y se recogió el filtrado. Se lavó con -- otro volumen de DNP a la misma concentración y el filtrado se juntó con el primero. El filtrado se concentró por ultrafiltración (Amicon, filtro XM 100) a un -- volumen aproximado de 10 ml y se pasó por una columna-- de Dowex (eluyendo con PBS) para separar el DNP. Se -- recogieron fracciones de 5 ml y se localizó la protefina leyendo la densidad óptica (DO) a 280 nm en el es-- pectrofotómetro. Se comprobó que no contuvieran DNP -- por la densidad óptica a 363 nm. La Sefarosa-DNP-lisina se incubó posteriormente con una solución de DNP de una concentración mayor, repitiéndose los mismos pasos.

De esta manera se separaron siete fracciones de anticuerpos anti-DNP eluidos con concentraciones crecientes de DNP desde 10^{-4} M hasta 10^{-1} M.

C.- DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD

1) Fundamento

A cada una de las siete fracciones de anticuerpos - obtenidas se le determinó la constante de afinidad pro medio (K_0) por el método de apagamiento o extinción de fluorescencia (16), de acuerdo a la técnica descrita - por Eisen y McGuigan (17).

El método se basa en que las moléculas de anticuerpos presentan fluorescencia (debida principalmente a - sus residuos de triptofano) cuando son irradiadas con luz ultravioleta de 295 nm de longitud de onda, emi- - tiendo luz cuyo máximo de intensidad se encuentra en - 345 nm aproximadamente. Cuando el ligando (DNP) se -- halla unido específicamente a la molécula de anticuerpo, la energía radiante emitida por los residuos de -- triptofano del (o cercanos al) sitio activo es trans-- ferida intramolecularmente al ligando unido, dada su - cercanía y orientación espacial. El ligando puede li- berar la energía absorbida de varias maneras (vibra- - ción, emisión a longitudes de onda mayores, etc.). El resultado final de estos procesos es que la fluorescen- cia de los anticuerpos se ve disminuída (apagada) en - proporción directa a la cantidad de ligando que tengan unido.

Si conocemos el porcentaje de la fluorescencia ini- cial que se apaga cuando todos los sitios activos es es

tán saturados (Q_{\max}), podremos determinar, para cada concentración de hapteno (H_t), la cantidad (P) que se encuentra unida a los anticuerpos conociendo el porcentaje de la fluorescencia inicial apagada (Q). La concentración de hapteno libre (L) se calcula restando a la concentración de hapteno total la concentración de hapteno unido ($L = H_t - P$).

De esta manera, conociendo la concentración de hapteno libre (L) y la fracción de los sitios activos que se encuentran ocupados ($r = P/S_o = Q/Q_{\max}$), podemos calcular para cada punto, los parámetros de la ecuación de Sips (17,18):

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

A partir de la gráfica de Sips, podemos calcular la constante de afinidad promedio (K_o) y el índice de heterogeneidad (a) de los anticuerpos.

2) Procedimiento experimental

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofotofluorómetro Aminco-Bowman, con monocromadores para seleccionar las longitudes de onda de la luz de excitación y de emisión y con un dispositivo para mantener constante la temperatura de la celda. Las longitudes de onda de excitación y de emisión usadas fueron 295 y 345 nm respectivamente. Todas las mediciones se hicieron a 25 °C.

Se colocaron en la celda 2 ml de una solución de anticuerpos de concentración conocida (0.05 mg/ml aproximadamente) en PBS y se registró la fluorescencia cuando hubo alcanzado un valor estable. Las muestras solo fueron expuestas a la luz excitadora en el momento de hacer las lecturas. Progresivamente se fueron adicionando volúmenes pequeños (0.01 ml) de una solución de hapteno de concentración conocida y en el mismo solvente. Después de cada adición de hapteno se agitó suavemente y se registró la fluorescencia antes de hacer la siguiente adición hasta haber agregado un total de 0.1 ml.

El valor de Q_{\max} (apagamiento cuando la totalidad de los sitios activos están ocupados) se determinó añadiendo una solución de hapteno lo suficientemente concentrada para saturar los sitios activos, midiendo el apagamiento y haciendo una corrección por el apagamiento debido al hapteno libre. Para hacer esta corrección, se añade a una solución de inmunoglobulinas inespecíficas la misma concentración de hapteno, para saber la cantidad de fluorescencia apagada que se debe al hapteno en solución (Figura 2).

3) Cálculos

A cada valor de fluorescencia se restó la fluorescencia de un blanco de solvente, y se multiplicó por la fracción de incremento de volumen (volumen/volumen

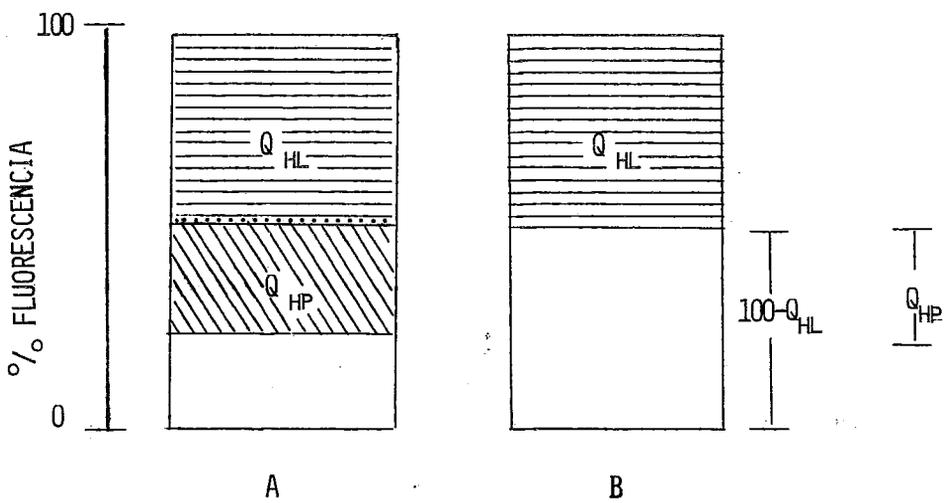


Figura 2.- Determinación de Q_{max} . Para conocer el porcentaje de la fluorescencia inicial que puede ser apagada cuando todos los sitios activos están ocupados (Q_{max}) se agrega, tanto a una solución de anticuerpos anti-DNP (A) como a una solución de gamma-globulinas normales (B) a la misma concentración (2.5×10^{-7} M), una concentración de DNP-lisina suficiente para saturar todos los sitios activos (7.5×10^{-3} M). En B un cierto porcentaje de fluorescencia es apagada debido a la alta concentración de hapteno libre (Q_{HL}). En A, la fluorescencia es apagada tanto por el hapteno libre como por el ligando que se ha unido a los anticuerpos (Q_{HP}) cuya eficiencia de apagamiento es mayor. Si $100-Q_{HL}$ es el máximo de fluorescencia que podemos tener debido a la alta concentración de hapteno libre, entonces $Q_{HP}/100-Q_{HL}$ es la fracción del total de fluorescencia disponible que es apagada debido a la saturación de los sitios. Ya que las mediciones de fluorescencia y apagamiento se dan en porcentajes, nos queda:

$$Q_{max} = 100 \left(\frac{Q_{HP}}{100-Q_{HL}} \right)$$

inicial) para corregir el descenso en la fluorescencia debido a la dilución de la muestra. Se normalizaron los valores dando al valor de fluorescencia inicial ya corregido, el valor de 100%.

El apagamiento (Q) para cada concentración de hapteno, se determinó restando de 100 el valor de fluorescencia corregido y normalizado. La fracción de sitios activos que están ocupados en cada punto, es igual a la fracción de apagamiento obtenido ($r = Q/Q_{\max} = P/S_o$). La concentración de ligando unido (P) se calculó multiplicando la fracción de sitios activos ocupados (r) por la concentración total de sitios activos (S_o), la cual corresponde a dos veces la concentración molar de proteína. En este caso, dado que los anticuerpos fueron Ig G de borrego (PM - 160 000), S_o se calculó a partir de la concentración de proteína en mg/ml, dividiendo entre el peso molecular y multiplicando por 2.

La concentración de hapteno libre (L) se obtuvo restando a la concentración total añadida (H_t), la concentración de hapteno unida a los anticuerpos (P). Por ejemplo, tengamos el siguiente caso:

F_o = Fluorescencia inicial = 95

F_B = Fluorescencia del blanco de solvente = 2

Vol. inicial = 2 ml

Concentración de anticuerpos = 0.04 mg/ml

Adiciones de hapteno 0.01 ml de una solución 1×10^{-5} M

$$Q_{\max} = 40$$

F_1 = Fluorescencia luego de la primera adición de hapteno
= 93

$$(F_1 - F_B) \times \frac{2.01}{2} = F_{1C} = 91.45$$

$$\begin{array}{l} (F_0 - F_B) \text{ --- } 100\% \\ F_{1C} \text{ --- } F_{1N} \end{array} \quad F_{1N} = \frac{91.45 \times 100}{93} = 98.3\%$$

$$Q = 100 - F_{1N} = 100 - 98.3 = 1.7\%$$

$$r = \frac{Q}{Q_{\max}} = \frac{1.7}{40} = .0425$$

$$P = r \cdot S_0 = r \cdot \frac{(0.04 \times 2)}{(160\,000)} = (.0425) \cdot (5 \times 10^{-7}) =$$

$$2.125 \times 10^{-8} \text{ M}$$

$$H_t = \frac{(1 \times 10^{-5} \times 0.01)}{2.01} = 5 \times 10^{-8} \text{ M}$$

$$L = 5 \times 10^{-8} - 2.125 \times 10^{-8} = 2.875 \times 10^{-8} \text{ M}$$

Es decir: para este caso, tendríamos $2.875 \times 10^{-8} \text{ M}$ de ligando libre (L) y $2.125 \times 10^{-8} \text{ M}$ de ligando unido a anticuerpos (P).

Los resultados obtenidos para cada una de las siete fracciones de anticuerpos se muestran en la sección de resultados (Tablas I a VII).

D.- PREPARACION DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS

1) Preparación de proteínas dinitrofeniladas.

La albúmina sérica humana dinitrofenilada ($\text{HSA}_{32}\text{-DNP}$) se preparó según la técnica descrita por Eisen (18). - La técnica consiste en hacer reaccionar al ácido 2,4--dinitrobenzénsulfónico (DNBS) con la proteína, en un medio alcalino. La dinitrofenilación ocurre casi exclusivamente en los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de las proteínas. La reacción incluye la liberación de sulfonato y la sustitución por los grupos --amino de la lisina (Figura 3).

El grado de sustitución (α = número de residuos DNP por molécula de proteína) depende de las concentraciones relativas del DNBS y la proteína en el medio de --reacción (38).

Para preparar la albúmina humana dinitrofenilada se pusieron en un matraz: 1 g de albúmina sérica humana - (Sigma Chemical Co), 1.5 g de DNBS (Eastman Kodak Co.) y se aforó a 100 ml con una solución de K_2CO_3 al 10%.- El matraz se protegió de la luz y se dejó reaccionar - durante 24 horas a temperatura ambiente y con agita --ción. A las 24 hrs. se colocó la mezcla de reacción - en una bolsa de diálisis y se dializó exhaustivamente contra PBS para eliminar el ácido sulfónico y el DNBS- que no reaccionó.

Se comprobó que no quedara DNBS en solución, midiendo la DO a 363 nm del amortiguador de diálisis.

Para estimar el grado de dinitrofenilación de la --

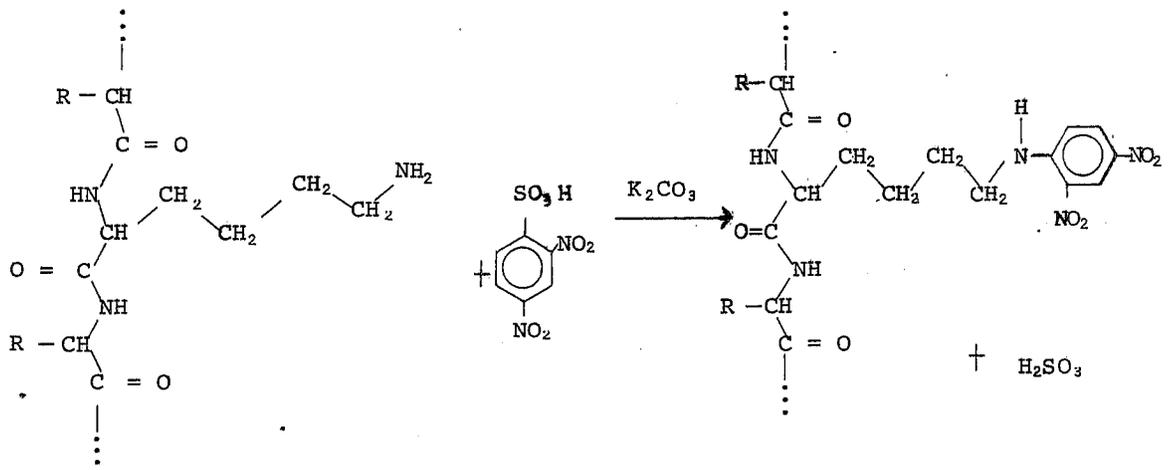


Figura 3.- Reacción de dinitrofenilación de proteínas. El ácido 2,4-dinitrobenzén-sulfónico reacciona con el grupo ε-amino de los residuos de lisina de la proteína, liberándose ácido sulfónico (20).

proteína, se determinó la concentración de proteína -- por el método de Lowry (19) y la concentración de DNP-- espectrofotométricamente a 363 nm (coeficiente de ex-- tinción molar = 17,530 (20)). En nuestro caso, al tér-- mino de la dinitrofenilación teníamos una concentra-- ción de proteína de 6.27 mg/ml (9×10^{-5} M) y una concen-- tración de DNP de 2.88×10^{-3} M, y por lo tanto $\alpha = 32$.- Es decir, había en promedio, 32 residuos dinitrofenil-- por molécula de albúmina (DNP₃₂ HSA).

2) Acoplamiento de proteínas a eritrocitos

La sensibilización de los eritrocitos se efectuó -- por medio de proteínas dinitrofeniladas que se acopla-- ron a la superficie del eritrocito con glutaraldehído, con el cual se han fijado los eritrocitos para hacerlos más estables (21,22). Una vez que los eritrocitos se-- han fijado, se incuban con una solución de proteína, - la cual se une a los eritrocitos mediante los grupos aldehído que hayan quedado libres en la superficie del eritrocito.

Se exploraron diversas variables en las condiciones en que se efectúa el acoplamiento, para escoger aque-- llas en que se obtuviera una mayor sensibilidad. Las-- variables estudiadas fueron: concentración de glutaral-- dehído, concentración de proteína en la incubación, -- tiempo de incubación y pH de incubación. Los resulta-- dos se muestran en las Figuras 4 y 5.

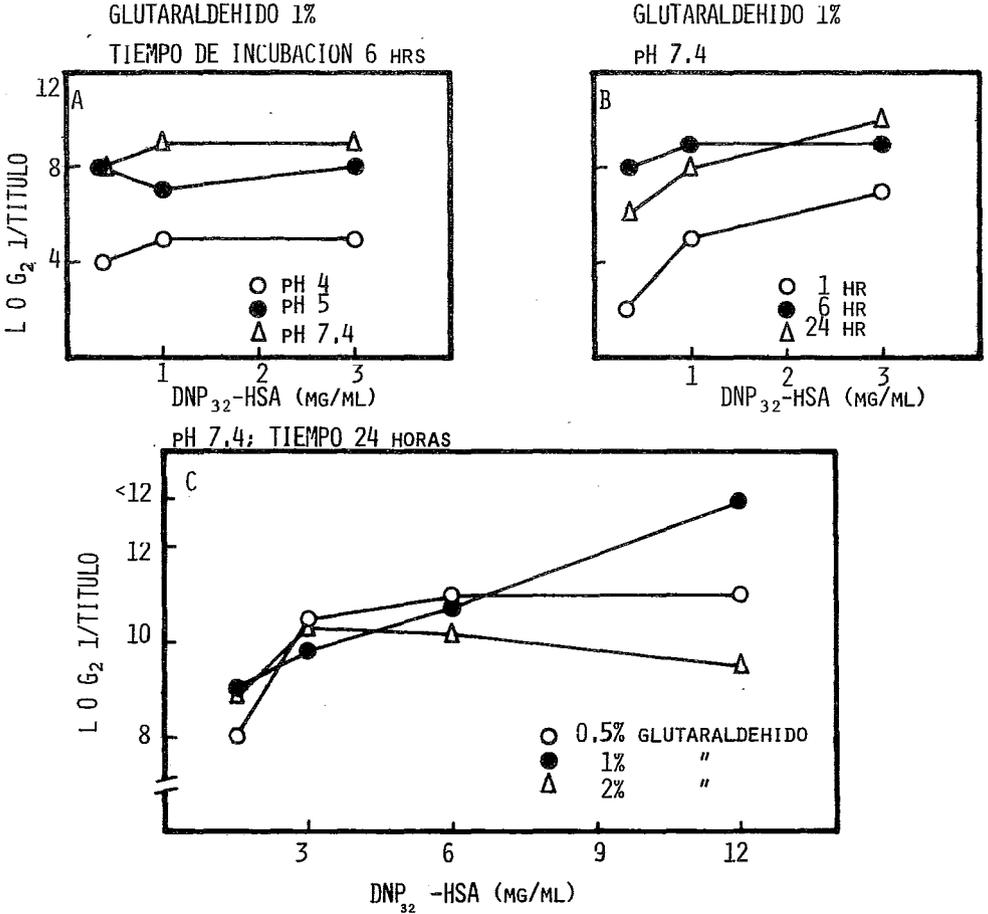


FIGURA 4.- CONDICIONES OPTIMAS PARA EL ACOPLAMIENTO DE PROTEINAS A ERITROCITOS GLUTARALDEHIZADOS. EL SISTEMA USADO PARA ESTOS ESTUDIOS FUERON ERITROCITOS DE BORREGO RECUBIERTOS CON DNP₃₂HSA PROBADOS CONTRA UN SUERO ANTI-DNP PREPARADO EN BORREGO. LOS TITULOS EN LAS GRAFICAS SON EL PROMEDIO DE 3 DETERMINACIONES. LOS TITULOS CON SUERO NORMAL DE BORREGO FUERON 1:2, 1:4 Y OCASIONALMENTE 1:8. GRAFICA A.- INFLUENCIA DEL pH Y LA CONCENTRACION DE PROTEINA. GRAFICA B.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION Y CONCENTRACION DE PROTEINA. GRAFICA C.- INFLUENCIA DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTARALDEHIDO Y DE PROTEINA. DE ACUERDO A ESTOS RESULTADOS, LAS CONDICIONES CON QUE SE OBTUVO MAYOR SENSIBILIDAD FUERON LAS SIGUIENTES: CONCENTRACION DE GLUTARALDEHIDO 1% pH DE INCUBACION 7.4, TIEMPO DE INCUBACION 24 Hrs., CONCENTRACION DE PROTEINA 12mg/ml.

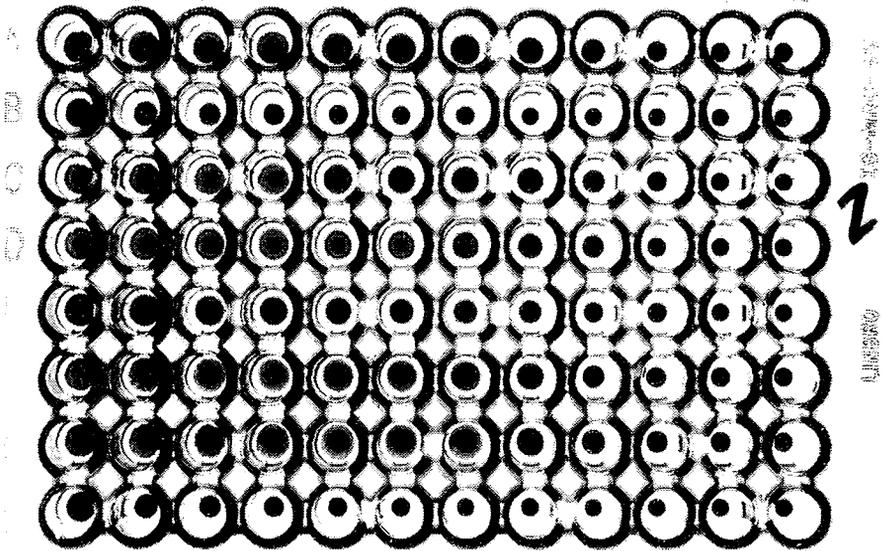


Figura 5.- Patrones de hemaglutinación obtenidos con eritrocitos recubiertos con DNP₃₂ HSA bajo distintas condiciones de a-coplamiento.

Fila	concentración glutaraldehído	concentración de DNP ₃₂ HSA	Suero	Título	log ₂ 1/título*
A	1%	6 mg/ml	anti-DNP	1:512	9
B	1%	12 mg/ml	normal	1:8	3
C	0.5%	6 mg/ml	anti-DNP	1:512	9
D	1%	3 mg/ml	anti-DNP	1:256	8
E	0.5%	1.5 mg/ml	anti-DNP	1:128	7
F	2%	6 mg/ml	anti-DNP	1:256	8
G	2%	12 mg/ml	anti-DNP	1:1024	10
H	2%	6 mg/ml	normal	1:4	2

En todos los casos la incubación se efectuó a pH 7.4, durante 24 horas. Los eritrocitos se agregaron de una suspensión al 2%. Las diluciones del suero se hicieron con HSA al 2% en PBS. En esta placa podemos ver que la aglutinación por el suero normal es en títulos bajos. También puede verse que la variable más importante parece ser la concentración de proteínas.

* Número del último pozo con aglutinación visible.

E.- ENSAYOS DE HEMAGLUTINACION CON SUEROS HUMANOS

1) Técnica de microtitulación

Los ensayos de actividad anti-DNP en sueros humanos se realizaron mediante un sistema de hemaglutinación -- usando la técnica de microtitulación. Esta técnica -- consiste en poner 0.025 ml de diluciones sucesivas del suero problema en una serie de pozos excavados en placas de plástico (placas de microtitulación). Las diluciones del suero se hacen en forma logarítmica: 1:2, - 1:4, 1:8, 1:16, etc. A cada dilución del suero se -- agregan 0.025 ml de una suspensión de glóbulos rojos - al 0.5%, se agita y se deja sedimentar.

Si en el suero hay anticuerpos que reaccionen con -- las estructuras químicas presentes en la superficie -- del eritrocito, éstos son aglutinados y al sedimentar -- forman una capa uniforme en el fondo del pozo. Si no -- hay anticuerpos los eritrocitos sedimentan y ruedan al -- centro del pozo ya que el fondo tiene forma de V, for -- mando entonces un botón compacto en el centro del fon -- do (Figura 5).

Los resultados se dan como títulos de hemaglutina-- ción, que es la última dilución a la cual todavía se -- observa aglutinación franca aunque no sea completa. En -- ocasiones es conveniente expresar un resultado como el -- \log_2 del inverso del título, lo que equivale al número -- del pozo de la última reacción positiva. (Es decir, si el -- título es 1:8, $\log_2 8/1=3$; si el título es 1:64, $\log_2 64/1=$

6, etc.)

2) Glóbulos rojos

Se utilizaron eritrocitos humanos grupo O, Rh -, para disminuir la posibilidad de aglutinación por los determinantes antigénicos de grupos sanguíneos principales de la superficie de los eritrocitos. Los eritrocitos utilizados no fueron aglutinados por antisueros anti-A, anti-B ni anti-D comerciales, ni antes ni después de la sensibilización.

La sensibilización se realizó usando las condiciones que demostraron ser óptimas con el mismo sistema - pero usando eritrocitos de borrego (ver Figura 4). El procedimiento completo fué el siguiente: una vez separados los eritrocitos del plasma por centrifugación, se lavaron 4 veces con PBS. Se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y con agitación lenta, en glutaraldehído al 1% en PBS. Se lavaron 4 veces con PBS. Luego se incubaron durante 24 hrs. a 4°C y con agitación lenta en una solución de DNP₃₂ HSA a una concentración de 12 mg/ml en PBS. Al final se lavaron 4 veces con PBS y se resuspendieron en PBS. Se almacenaron a 4°C.

3) Sueros humanos

Se probaron 492 sueros humanos colectados en laboratorios clínicos, de los cuales 117 habían sido recogidos para efectuarles química sanguínea y los restantes para prueba de VDRL. De los 117 primeros todos tenían una concentración de proteínas séricas dentro de los -

valores normales (6.5 a 8 g/dl).

4) Ensayos de hemaglutinación

Para estar seguros de que una reacción de aglutinación de los eritrocitos sensibilizados fuera específica para el grupo dinitrofenol, se utilizaron los siguientes criterios: a) Que el suero no aglutinara a eritrocitos no sensibilizados idénticos a los que se sensibilizaron, y b) Que la aglutinación fuera inhibida por DNP₃₂ HSA en solución pero no fuera inhibida por HSA en solución. Se consideró inhibida la hemaglutinación cuando el título en presencia de HSA fuera por lo menos dos pozos mayor que el título en presencia de DNP₃₂ HSA.

De acuerdo a esto, a cada suero se le determinó el título de hemaglutinación en tres sistemas diferentes:

Prueba A.- Eritrocitos recubiertos con DNP₃₂ HSA en presencia de HSA en solución (HSA a una concentración de 2 mg/ml).

Prueba B.- Eritrocitos recubiertos con DNP₃₂ HSA en presencia de DNP₃₂ HSA en solución (a concentraciones de DNP₃₂ HSA de 6 mg/ml en los dos primeros pozos y de 3, 1.5, 0.75, etc., en los siguientes).

Prueba C.- Eritrocitos no recubiertos en presencia de HSA en solución.

Además, para minimizar las reacciones debidas a otros sistemas antigénicos, previamente al ensayo los sueros fueron adsorbidos con un volumen igual de eri--

trocitos fijados pero no sensibilizados, durante 1 hr. a 4°C.

En el ensayo, a 0.025 ml de cada dilución de suero se agregaron 0.025 ml de una suspensión de eritrocitos al 0.5% en PBS. Luego de agitarlos, las placas se dejaron sedimentar a 4°C. Los resultados se leyeron al día siguiente.

III RESULTADOS

A.- PURIFICACION FRACCIONADA DE ANTICUERPOS

A partir de 100 ml de suero de borrego inmunizado con DNP₂₃BSA y siguiendo los pasos de purificación detallados en la sección de Materiales y Métodos, se obtuvieron siete fracciones de anticuerpos anti-DNP puros con -- distintas afinidades. Todas las fracciones aisladas precipitaron en doble inmunodifusión en gel de agar con DNP₃₂HSA pero no con HSA en similares concentraciones (Figura 6).

B.- DETERMINACION DE CONSTANTES DE AFINIDAD

Se realizaron ensayos de apagamiento de fluorescencia según la técnica ya descrita, a cada una de las siete fracciones de anticuerpos aislados. La Figura 7 muestra los porcentajes de apagamiento obtenidos en función de la concentración de hapteno presente. En las Tablas I a VII se anotan los resultados de los ensayos de fluorescencia de las fracciones 1 a 7 respectivamente, y la manera en que se calcularon los parámetros de la ecuación de Sips a partir de los valores de fluorescencia. Los datos de todas las fracciones se procesaron de la misma manera. El valor de Q_{\max} utilizado fué 40. Este valor fué el pro-

medio de las Q_{\max} obtenidas para cada una de las 7 fracciones por medio de la ecuación: $Q_{\max} = 100 (Q_{HP}/100 - Q_{HL})$, -- (ver Figura 2). Los valores de Q_{\max} obtenidos oscilaron entre 37.5 y 41 con un promedio de 39.7. Se usó el promedio ya que se ha encontrado que los anticuerpos de una -- cierta especie con una misma especificidad muestran el -- mismo valor de Q_{\max} independientemente de su constante de afinidad (17).

Como puede verse en las Tablas V y VII, algunas veces en las primeras adiciones de hápteno, la concentración de ligando unido (P) es mayor que la cantidad de ligando añadido (H_t). La causa y el significado de esta inconsistencia no están muy claras (17,18). Probablemente sea debida a cierta heterogeneidad en la fluorescencia y en el apagamiento de la fluorescencia de las moléculas de anticuerpos, de modo que se produzca más apagamiento cuando se ocupan sitios con alta afinidad que cuando se ocupan los de afinidad más baja. Para el cálculo de K. estos puntos no se toman en cuenta.

La Figura 8 muestra las gráficas de Sips de las siete fracciones. Las líneas rectas se trazaron de acuerdo a una regresión lineal de todos los puntos dibujados. Los valores de K. obtenidos para cada una de las fracciones a partir de las gráficas de Sips se anotan en la Tabla VIII.

Como podemos ver en esta Tabla, se logró separar 7 poblaciones de anticuerpos puros cuyas constantes de afinidad promedio son distintas y que van desde 1×10^5 hasta $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

1

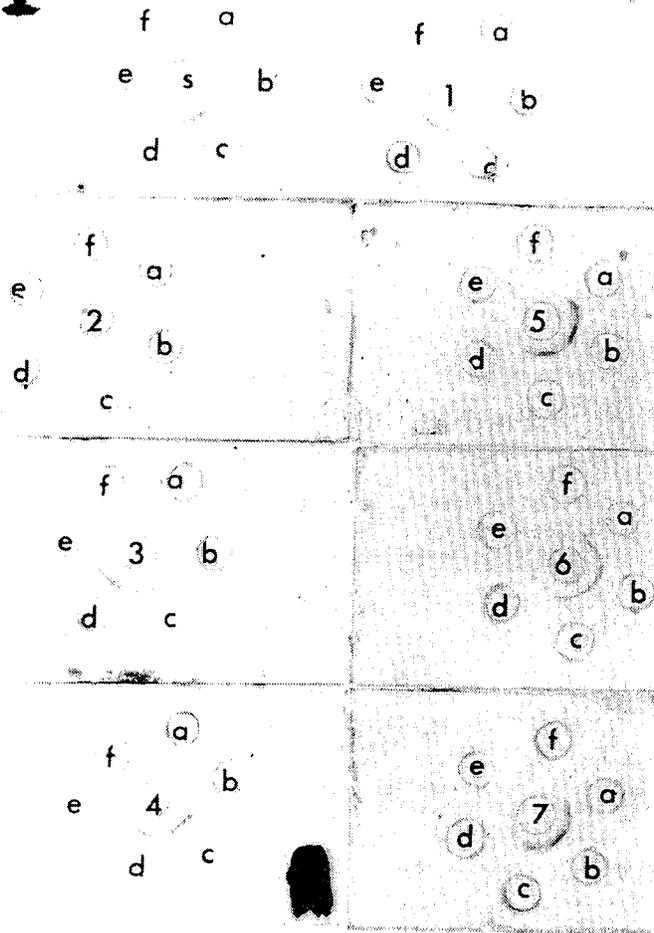


Figura 6.- Bandas de precipitación obtenidas con el suero anti-DNP y las siete fracciones aisladas (pozos centrales) - contra DNP₃₂-HSA y HSA. Los antígenos se colocan en el mismo orden:

pozos a	DNP ₃₂ HSA	3 mg/ml
pozos b	DNP ₃₂ HSA	1.5 mg/ml
pozos c	DNP ₃₂ HSA	0.75mg/ml
pozos d	DNP ₃₂ HSA	0.375mg/ml
pozos e	HSA	0.5 mg/ml
pozos f	HSA	1.5 mg/ml

S.- Suero anti-DNP 1 - 7 fracciones de anticuerpos purificados.

Puede verse que en el suero completo hay banda de precipitación con HSA, no así - en las 7 fracciones.

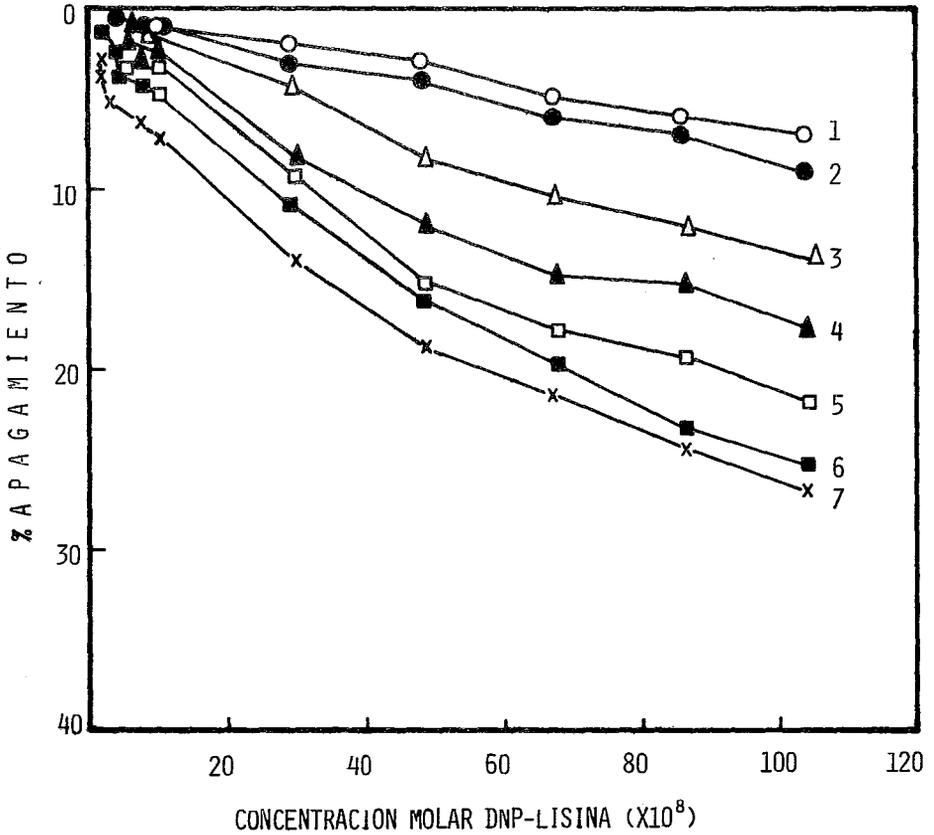


FIGURA 7.- APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-DNP PURIFICADOS CON DISTINTAS CONSTANTES DE AFINIDAD, SE UTILIZO DNP-LISINA-COMO LIGANDO. LOS NUMEROS JUNTO A CADA LINEA CORRESPONDEN AL NUMERO-DE FRACCION DE ANTICUERPOS.

T A B L A I

ml. hapteno añadidos	F	F _n	Q	r	H _T (x10 ⁸)	P (x10 ⁸)	L (x10 ⁸)	log L	log $\frac{r}{1-r}$
0.00	92.00	100.0	-	-	0.000	-	-	-	-
0.01	91.00	100.0	0	0	0.199	0	0.199	-	-
0.02	91.00	100.0	0	0	0.396	0	0.396	-	-
0.03	89.75	99.0	1	0.025	0.591	0.125	0.466	-7.33	-1.59
0.04	89.25	99.0	1	0.025	0.784	0.125	0.659	-7.18	-1.59
0.05	88.75	99.0	1	0.025	0.975	0.125	0.850	-7.07	-1.59
0.06	87.50	98.0	2	0.050	2.910	0.250	2.660	-6.57	-1.27
0.07	86.25	97.0	3	0.075	4.830	0.375	4.455	-6.35	-1.09
0.08	84.00	95.0	5	0.125	6.730	0.625	6.105	-6.21	-0.845
0.09	82.75	94.0	6	0.150	8.610	0.750	7.860	-6.10	-0.753
0.10	81.50	93.0	7	0.175	10.400	0.875	9.525	-6.02	-0.673

Tabla I.- Titulación por apagamiento de fluorescencia de la fracción 1. Los símbolos significan:

F = Valor de fluorescencia obtenido después de cada adición de hapteno.

F_n = Fluorescencia corregida por la fluorescencia del solvente y por el incremento de volumen y normalizada tomando el valor de fluorescencia inicial como 100%.

Q = Apagamiento de la fluorescencia ($Q = 100 - F_n$).

r = Fracción de sitios ocupados, igual a la fracción del máximo apagamiento posible ($r = Q/Q_{\max}$).

H_t = Concentración molar de DNP-lisina total.

P = Concentración molar de DNP-lisina unida a los anticuerpos. Es igual a la fracción de sitios ocupados multiplicada por la concentración molar de sitios activos totales ($P = S_o \times r$).

L = Concentración molar de DNP-lisina libre ($L = H_t - P$).

Volumen inicial 2 ml, fluorescencia solvente = 2, $Q_{\max} = 40$, $S_o = 5 \times 10^{-7}$ M

T A B L A I I

ml. hapteno añadidos	F	F _n	Q	r	H _L (x10 ⁸)	P (x10 ⁸)	L (x10 ⁸)	log L	log $\frac{r}{1-r}$
0.00	94.00	100.0	-	-	0.00	-	-	-	-
0.01	93.00	100.0	0.0	0	1.99	0	1.99	-	-
0.02	92.50	99.5	0.5	0.012	3.96	0.625	3.33	-7.47	-1.89
0.03	92.50	100.0	0.0	0	5.91	0	5.91	-	-
0.04	91.25	99.0	1.0	0.025	7.84	1.250	6.59	-7.18	-1.59
0.05	90.75	99.0	1.0	0.025	9.75	1.250	8.50	-7.07	-1.59
0.06	88.50	97.0	3.0	0.075	29.10	3.750	25.35	-6.59	-1.09
0.07	87.25	96.0	4.0	0.100	48.30	5.000	43.40	-6.36	-0.95
0.08	85.00	94.0	6.0	0.150	67.30	7.500	59.80	-6.22	-0.75
0.09	83.50	93.0	7.0	0.175	86.10	8.750	77.35	-6.11	-0.67
0.10	81.50	91.0	9.0	0.225	104.00	10.250	93.75	-6.03	-0.58

Tabla II.- Ensayo de apagamiento de fluorescencia para la determinación de la constante de afinidad. Fracción 2. Hapteno: DNP-lisina. $Q_{\max} = 40$. $S_0 = 5 \times 10^{-7}$ M. Volumen inicial 2 ml.

Los símbolos y la manera de calcular los datos son los mismos que en la Tabla I.

T A B L A I I I

ml. hapteno añadidos.	F	F _n	Q	r	H _t (x10 ⁸)	P (x10 ⁸)	L (x10 ⁸)	log L	log $\frac{r}{1-r}$
0.00	96.00	100.0	0	-	0	-	0	-	-
0.01	94.50	99.0	1.0	0.025	1.99	1.25	0.74	-8.13	-1.590
0.02	94.00	99.0	1.0	0.025	3.96	1.25	2.71	-7.56	-1.590
0.03	93.00	98.5	1.5	0.038	5.91	1.90	4.01	-7.39	-1.400
0.04	92.75	98.5	1.5	0.038	7.84	1.90	5.94	-7.22	-1.400
0.05	91.75	98.0	2.0	0.050	9.75	2.50	7.25	-7.14	-1.270
0.06	87.50	94.0	6.0	0.100	29.10	5.00	24.10	-6.62	-0.954
0.07	85.00	91.5	8.5	0.212	48.30	10.60	37.70	-6.42	-0.570
0.08	83.00	90.0	10.0	0.250	67.30	12.50	54.80	-6.26	-0.477
0.09	80.50	87.5	12.5	0.312	86.10	15.60	70.50	-6.15	-0.343
0.10	78.50	86.0	14.0	0.350	104.00	17.50	86.50	-6.06	-0.268

Tabla III.- Ensayo de apagamiento de fluorescencia para la determinación de la constante de afinidad. Fracción 3. Hapteno: DNP-lisina. $Q_{\max} = 40$. $S_0 = 5 \times 10^{-7} M$. Volumen inicial 2 ml.

Los símbolos y la manera de calcular los datos son los mismos que en la Tabla I.

T A B L A IV

ml. hapteno añadidos	F	F _n	Q	r	H _t ⁸ (x10 ⁸)	P (x10 ⁶)	L (x10 ⁸)	log L	log $\frac{r}{1-r}$
0.00	91.00	100.0	-	-	0.00	-	-	-	-
0.01	89.75	99.0	1.0	0.025	1.99	1.25	0.74	-8.13	-1.590
0.02	89.25	99.0	1.0	0.025	3.96	1.25	2.71	-7.39	-1.590
0.03	88.25	98.5	1.5	0.038	5.91	1.90	4.01	-7.39	-1.400
0.04	83.00	98.5	1.5	0.038	7.84	1.90	5.94	-7.22	-1.400
0.05	86.00	97.0	3.0	0.075	9.75	3.75	6.00	-7.22	-1.090
0.06	81.25	92.0	8.0	0.200	29.10	10.00	19.10	-6.72	-0.602
0.07	77.50	88.0	12.0	0.300	48.30	15.00	33.30	-6.47	-0.367
0.08	74.50	85.0	15.0	0.375	67.30	18.70	48.50	-6.31	-0.221
0.09	74.00	85.0	15.0	0.375	86.10	18.70	67.30	-6.17	-0.221
0.10	71.00	82.0	18.0	0.450	104.00	22.50	81.50	-6.08	-0.087

Tabla IV.- Ensayo de apagamiento de fluorescencia para la determinación de la constante de afinidad. Fracción 4. Hapteno: DNP-lisina. $Q_{\max} = 40$. $S_0 = 5 \times 10^{-7}$ M. - Volumen inicial 2 ml.

Los símbolos y la manera de calcular los datos son los mismos que en la Tabla I.

T A B L A V

ml. hapteno añadidos	F	F _n	Q	r	H _t (x10 ⁸)	P (x10 ⁸)	L (x10 ⁸)	log L	log $\frac{r}{1-r}$
0.00	95.00	100.0	-	-	0.00	-	-	-	-
0.01	91.75	97.0	3.0	0.075	1.99	3.75	neg.	-	-
0.02	90.25	96.0	4.0	0.100	3.96	5.00	neg.	-	-
0.03	90.75	97.0	3.0	0.075	5.91	3.75	2.16	-7.66	-1.090
0.04	89.50	96.0	4.0	0.100	7.84	5.00	2.84	-7.54	-0.954
0.05	88.50	95.5	4.5	0.112	9.75	5.50	4.25	-7.37	-0.908
0.06	82.50	89.5	11.5	0.260	29.10	13.00	16.10	-6.79	-0.454
0.07	77.00	84.0	16.0	0.400	48.30	20.00	28.30	-6.54	-0.176
0.08	75.00	82.0	18.0	0.450	67.30	22.50	44.80	-6.34	-0.087
0.09	73.63	81.0	19.0	0.475	86.10	23.75	62.35	-6.20	-0.043
0.10	70.50	78.0	22.0	0.550	104.00	27.50	76.50	-6.11	0.087

Tabla V.- Ensayo de apagamiento de fluorescencia para la determinación de la constante de afinidad. Fracción 5. Hapteno: DNP-lisina. $Q_{\max} = 40$. $S_0 = 5 \times 10^{-7} M$
Volumen inicial 2 ml.

Los símbolos y la manera de calcular los datos son los mismos que en la Tabla I.

T A B L A V I

ml. Hapteno añadidos	F	F _n	Q	r	H _t (x10 ⁸)	P (x10 ⁸)	L (x10 ⁸)	log L	log $\frac{r}{1-r}$
0.00	90.00	100.0	-	-	-	-	-	-	-
0.01	88.50	99.0	1.0	0.025	1.99	1.25	0.74	-8.13	-1.590
0.02	87.25	98.0	2.0	0.050	3.96	2.50	1.46	-7.83	-1.270
0.03	86.00	97.0	3.0	0.075	5.91	3.75	2.16	-7.66	-1.090
0.04	85.50	97.0	3.0	0.075	7.84	3.75	4.09	-7.38	-1.090
0.05	83.75	95.5	4.5	0.610	9.75	5.50	4.25	-7.37	-0.908
0.06	79.50	91.0	9.0	0.220	29.10	11.00	18.10	-6.74	-0.549
0.07	73.50	84.5	15.5	0.390	48.30	19.50	28.80	-6.54	-0.194
0.08	69.25	80.0	20.0	0.500	67.30	25.00	42.30	-6.37	0
0.09	65.50	76.0	24.0	0.600	86.10	30.00	56.10	-6.25	0.176
0.10	63.75	74.5	25.5	0.640	104.00	32.00	72.00	-6.14	0.249

Tabla VI.- Ensayo de apagamiento de fluorescencia para la determinación de la constante de afinidad. Fracción 6. Hapteno: DNP-lisina $Q_{max} = 40$. $S_0 = 5 \times 10^{-7}$ M. Volumen inicial 2 ml. Los símbolos y la manera de calcular los datos son los mismos que en la Tabla I.

T A B L A V I I

ml. hapteno añadidos	F	F _n	Q	r	H _t (x10 ⁸)	P (x10 ⁸)	L (x10 ⁸)	log L	log $\frac{r}{1-r}$
0.00	96.00	100.0	-	-	-	-	-	-	-
0.01	88.50	96.5	3.5	0.087	1.99	4.35	neg.	-	-
0.02	87.25	95.0	5.0	0.125	3.96	6.25	neg.	-	-
0.03	86.00	96.0	4.0	0.100	5.91	5.00	0.91	-8.04	-0.954
0.04	85.50	94.0	6.0	0.150	7.84	7.50	0.34	-8.46	-0.753
0.05	83.75	93.0	7.0	0.175	9.75	8.75	1.00	-8.00	-0.673
0.06	79.50	86.0	14.0	0.350	29.10	17.50	11.60	-6.93	-0.268
0.07	73.50	81.0	19.0	0.475	48.30	23.75	24.55	-6.60	-0.043
0.08	69.25	79.0	21.0	0.525	67.30	26.25	41.05	-6.38	0.043
0.09	65.50	76.5	23.5	0.587	86.10	29.35	56.75	-6.24	0.152
0.10	63.75	73.0	27.0	0.675	104.00	33.75	70.25	-6.15	0.317

Tabla VII.- Ensayo de apagamiento de fluorescencia para la determinación de la constante de afinidad. Fracción 7. Hapteno: DNP-lisina. $Q_{\max} = 40$. $S_0 = 5 \times 10^{-7} M$
Volumen inicial 2 ml.

Los símbolos y la manera de calcular los datos son los mismos que en la Tabla I.

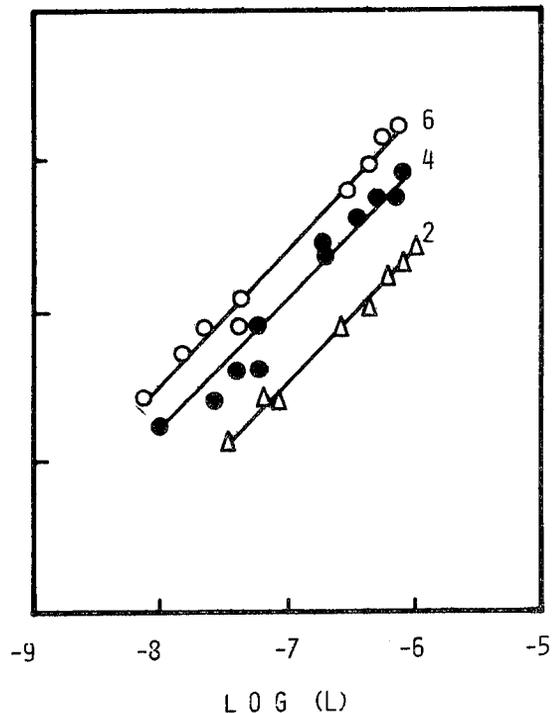
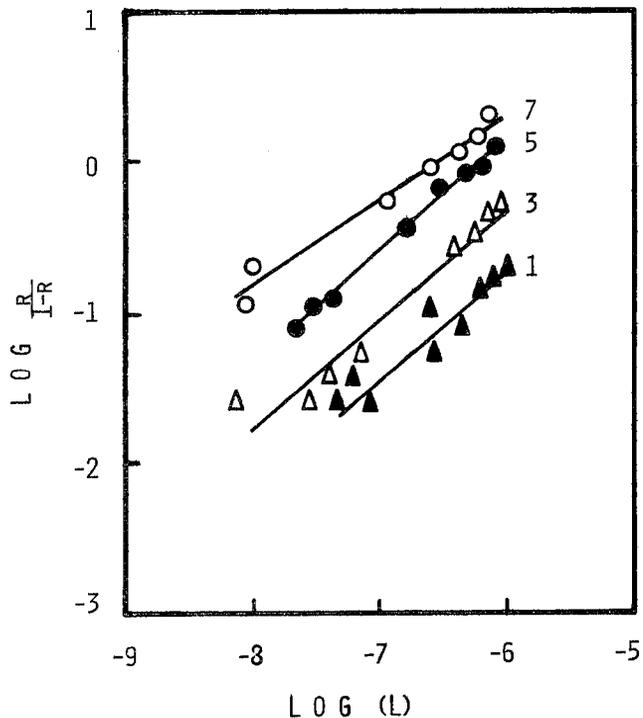


FIGURA 8.- GRAFICAS DE SIPS PARA LA DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD DE LAS 7 FRACCIONES DE-ANTICUERPOS, A PARTIR DE DATOS OBTENIDOS POR APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA, LOS NUMEROS JUNTO A LAS LINEAS CORRESPONDEN AL NUMERO DE FRACCION. LOS DATOS DE LOS QUE SE OBTUVIERON LAS LINEAS SE ENCUENTRAN EN LAS TABLAS I-VII. LAS LINEAS SE TRAZARON DE ACUERDO A UNA REGRESION LINEAL DE LOS PUNTOS MARCADOS, Y LOS PARAMETROS DE PENDIENTE Y ORDENADA AL ORIGEN OBTENIDOS SE USARON PARA CALCULAR K_0 Y EL INDICE DE HETEROGENEIDAD. LOS RESULTADOS SE ANOTAN EN LA TABLA VIII.

T A B L A V I I I

Fracción	Concentración de DNP con que se eluyó	K_0 (lt/mol)	$\log K_0$	índice de heterogeneidad
1	1×10^{-4} M	1.00×10^5	5.00	0.73
2	5×10^{-4} M	2.23×10^5	5.35	0.89
3	1×10^{-3} M	3.46×10^5	5.54	0.72
4	5×10^{-3} M	8.70×10^5	5.94	0.87
5	1×10^{-2} M	1.62×10^6	6.21	0.75
6	5×10^{-2} M	2.18×10^6	6.34	0.89
7	1×10^{-1} M	3.46×10^6	6.51	0.56

Tabla VIII.- Constantes de afinidad promedio (K_0) de las siete fracciones de anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad. Los valores de K_0 y del índice de heterogeneidad se obtuvieron a partir de las gráficas de Sips (Fig. 8).

C.- ESTABILIDAD DE LOS ERITROCITOS SENSIBILIZADOS

Como un control de que la sensibilidad del ensayo - se mantuviera estable a lo largo de los experimentos de - hemaglutinación (3 semanas), paralelamente a cada pequeño grupo de sueros humanos probados, se determinó el título de hemaglutinación a una dilución 1:32 de un suero anti-DNP preparado en borrego. Esta dilución se adsorbió con eritrocitos no sensibilizados de la misma manera que los sueros humanos, y no mostró aglutinación de eritrocitos - no sensibilizados. Los títulos obtenidos en los distintos días se muestran en la Figura 9.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que la sensibilidad del ensayo de hemaglutinación fué - constante a lo largo de los experimentos.

D.- SENSIBILIDAD DEL SISTEMA DE HEMAGLUTINACION

Con el objeto de conocer la correlación entre el título de hemaglutinación y la constante de afinidad y concentración de los anticuerpos, se determinó el título de hemaglutinación a las 7 fracciones de anticuerpos, bajo las mismas condiciones en que se probaron los sueros humanos. Esta prueba se realizó cuatro veces en días diferentes y se sacó un promedio de los 4 títulos de cada fracción. Estos - -

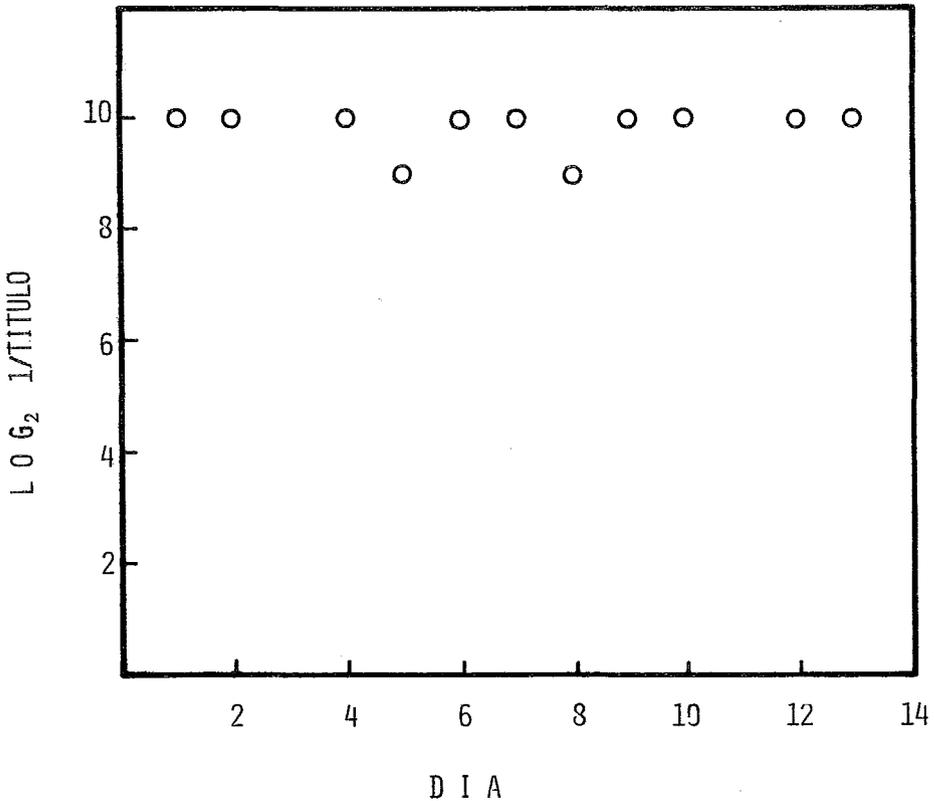


FIGURA 9.- CONTROL DE LA SENSIBILIDAD Y ESTABILIDAD DEL SISTEMA DE HEMAGLUTINACION A LO LARGO DE LOS ENSAYOS CON SUEROS HUMANOS. LOS ERITROCITOS SENSIBILIZADOS SE PROBARON CONTRA UN SUERO ANTI-DNP PREPARADO EN BORREGO TODOS LOS DIAS EN QUE SE ENSAYARON SUEROS HUMANOS (LOS DIAS 3 Y 11 NO SE REALIZO ESTA DETERMINACION)

resultados se muestran en la Tabla IX.

Conociendo el título de hemaglutinación de cada -- fracción a una determinada concentración, se calcularon -- las concentraciones que serían necesarias para obtener tí -- tulos tanto menores como mayores. El razonamiento segui -- do fué el siguiente: dado que las proporciones relativas -- de las distintas especies de anticuerpos anti-DNP no va -- rían al diluir una muestra, el título debe variar en for -- ma lineal al variar la concentración de anticuerpos. Es -- decir: si tenemos una solución de anticuerpos cuya concen -- tración es de 0.84 mg/ml y dá aglutinación positiva al di -- luirlo 32 veces (título 1:32), es obvio que si su concen -- tración inicial fuera del doble (1.68 mg/ml) daría agluti -- nación positiva en diluciones 2 veces mayores (título -- 1:64). Del mismo modo, si su concentración inicial fuera de 0.42 mg/ml, entonces la máxima dilución a la que toda -- vía mostraría aglutinación sería 1:16.

Los datos correspondientes a cada una de las frac -- ciones para títulos desde 1:2 hasta 1:256 se encuentran -- en la Tabla X y se grafican en la Figura 10.

Por interpolación en las líneas de la Figura 10, es -- posible conocer el título de hemaglutinación que obten -- dríamos si la concentración inicial de anticuerpos fuera de 0.5, 1 y 2 mg/ml para cada valor de constante de afini --

T A B L A IX

Fracción	K_o (lt/mol)	log K_o	concentración anticuerpos (mg/ml)	\log_2 1/título	título promedio
1	1.00×10^5	5.00	0.84	5 5 5 5	1:32
2	2.23×10^5	5.35	1.05	6 5 5 6	1:48
3	3.46×10^5	5.54	1.05	6 6 6 6	1:64
4	8.70×10^5	5.94	0.98	6 6 6 7	1:80
5	1.62×10^6	6.21	0.97	7 6 6 7	1:96
6	2.18×10^6	6.34	1.10	7 7 7 7	1:128
7	3.46×10^6	6.51	0.79	8 7 7 8	1:196

Tabla IX.- Sensibilidad del ensayo de hemaglutinación con respecto a la concentración de anticuerpos anti-DNP y a su constante de afinidad promedio. Las concentraciones de anticuerpos se determinaron por el método de Lowry (19). Los títulos se determinaron en la misma manera que los títulos de los sueros humanos (inciso E de Materiales y Métodos).

T A B L A X

Fracción	log K _o	Concentración de anticuerpos necesaria para títulos de:							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
1	5.00	.050	.105	.210	.420	.840	1.68	3.36	6.72
2	5.35	.043	.087	.174	.348	.690	1.39	2.78	5.56
3	5.54	.032	.064	.131	.262	.524	1.05	2.10	4.19
4	5.94	.024	.048	.096	.192	.384	.768	1.53	3.17
5	6.21	.020	.040	.080	.161	.323	.646	1.29	2.58
6	6.34	.017	.034	.068	.130	.270	.550	1.10	2.20
7	6.51	.008	.016	.032	.065	.130	.260	.520	1.04

Tabla X.- Concentración inicial de anticuerpos anti-DNP necesaria para obtener determinado título, según la constante de afinidad de los anticuerpos.

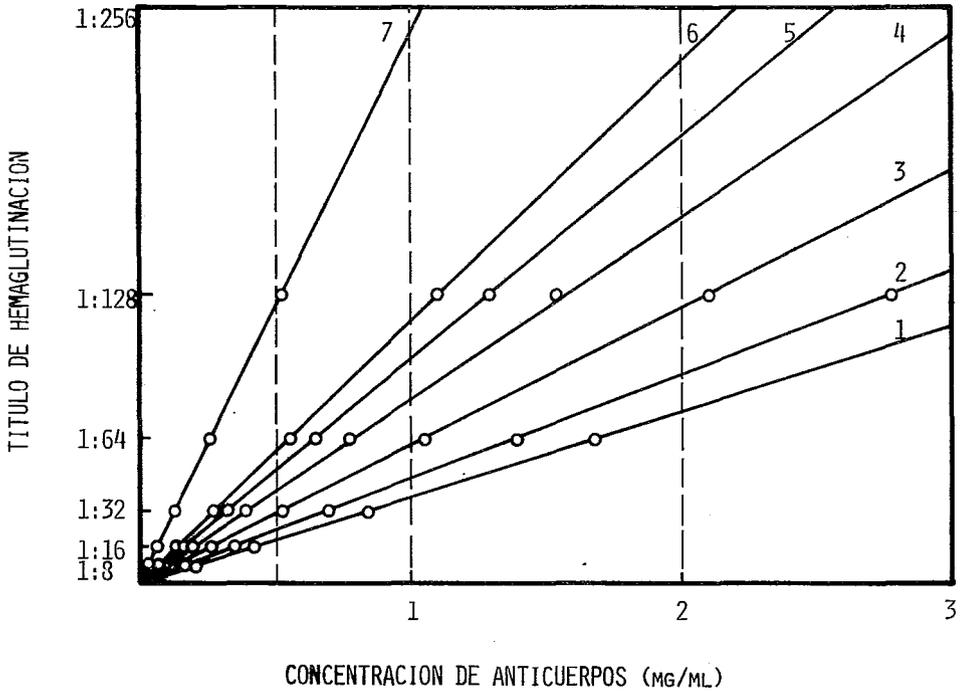


FIGURA 10.-DEPENDENCIA DEL TITULO DE HEMAGLUTINACION CON LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS PARA DISTINTOS VALORES DE CONSTANTE DE AFINIDAD PROMEDIO DE LOS ANTICUERPOS. EL NUMERO ANOTADO SOBRE CADA LINEA CORRESPONDE AL - NUMERO DE FRACCION:

FRACCION	K_0 (LT/MOL)
1	1.00×10^5
2	2.23×10^5
3	3.46×10^5
4	8.70×10^5
5	1.62×10^6
6	2.18×10^6
7	3.46×10^6

dad. Estos valores se muestran en la Tabla XI y se graficaron en las Figuras 11 y 12.

Por interpolación en las líneas de la Figura 12 se calcularon los valores mínimos de la constante de afinidad (K_{\min}) necesarios para obtener un determinado título de hemaglutinación dado que las concentraciones iniciales de anticuerpos fueran iguales o menores que los valores indicados. Estos resultados se muestran en la Tabla XII. Los valores de la Tabla XII nos permitieron inferir la constante de afinidad mínima con que cada suero reaccionaba con DNP a partir de su título de hemaglutinación.

Los valores de K_{\min} para cada título de hemaglutinación (Tabla XII) se obtuvieron por interpolación en la Figura 12 y no en la 11 porque la gráfica logarítmica facilita la interpolación, principalmente de los valores correspondientes a títulos de 1:8 y menores.

T A B L A X I

Concentración inicial de anticuerpos (mg/ml)	$K_0 (M^{-1})$	1×10^5	2.23×10^5	3.46×10^5	8.70×10^5	1.62×10^6	2.18×10^6	3.46×10^6
	log K_0	5.00	5.35	5.54	5.94	6.21	6.34	6.51
0.5	19.06	23.22	30.51	41.28	49.61	58.38	123.08	
	(4.25)	(4.53)	(4.93)	(5.36)	(5.63)	(5.86)	(6.94)	
1	38.10	46.44	61.05	81.75	99.22	116.49	246.13	
	(5.25)	(5.53)	(5.93)	(6.35)	(6.63)	(6.86)	(7.94)	
2	76.19	92.28	122.08	167.27	198.44	232.60	492.92	
	(6.25)	(6.53)	(6.93)	(7.35)	(7.63)	(7.86)	(8.94)	

Tabla XI.- Títulos de hemaglutinación teóricos para anticuerpos con distintas constantes de afinidad en función de la concentración inicial de anticuerpos. Los valores se calcularon por interpolación en la gráfica de la Figura 10. Los valores dentro de paréntesis corresponden al \log_2 del inverso de cada título.

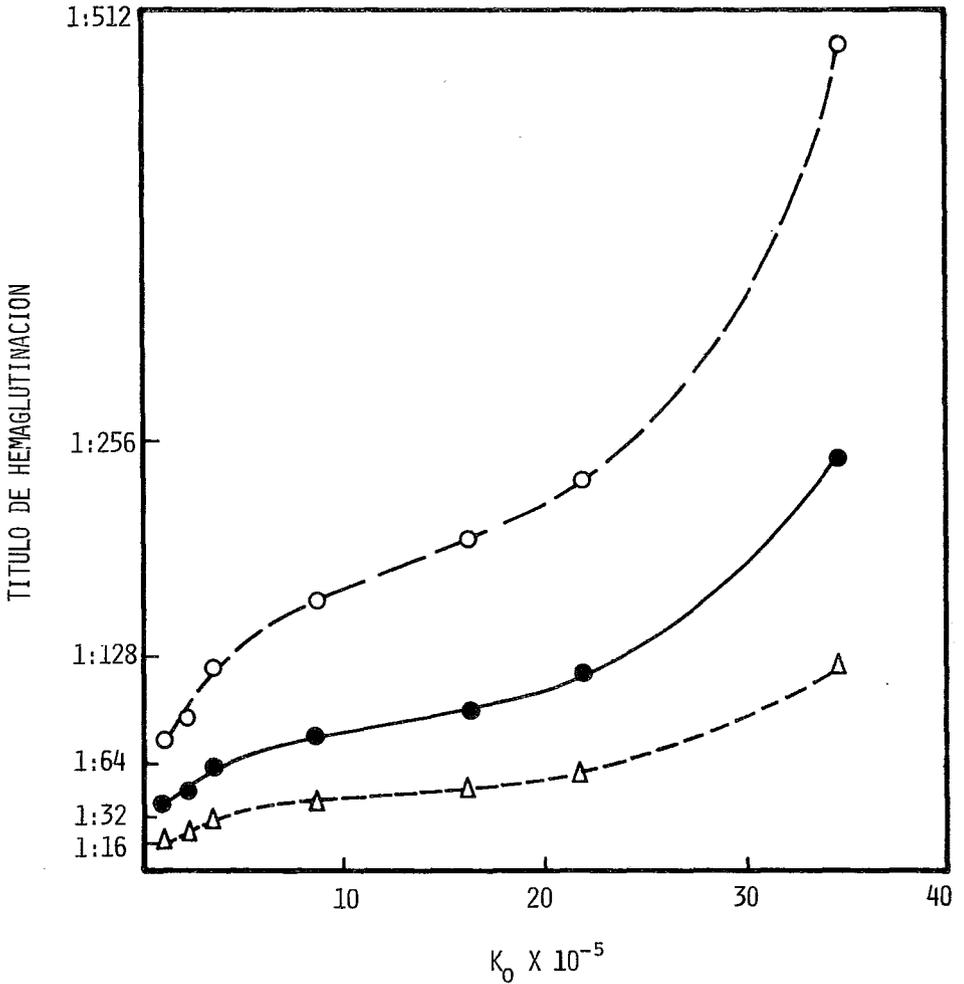


FIGURA 11.- DEPENDENCIA DEL TITULO DE HEMAGLUTINACION CON LA CONSTANTE DE AFINIDAD PROMEDIO (K_0) DE LOS ANTICUERPOS PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ANTICUERPOS: 0,5 MG/ML (Δ), 1 MG/ML (\bullet), Y 2 MG/ML (\circ).

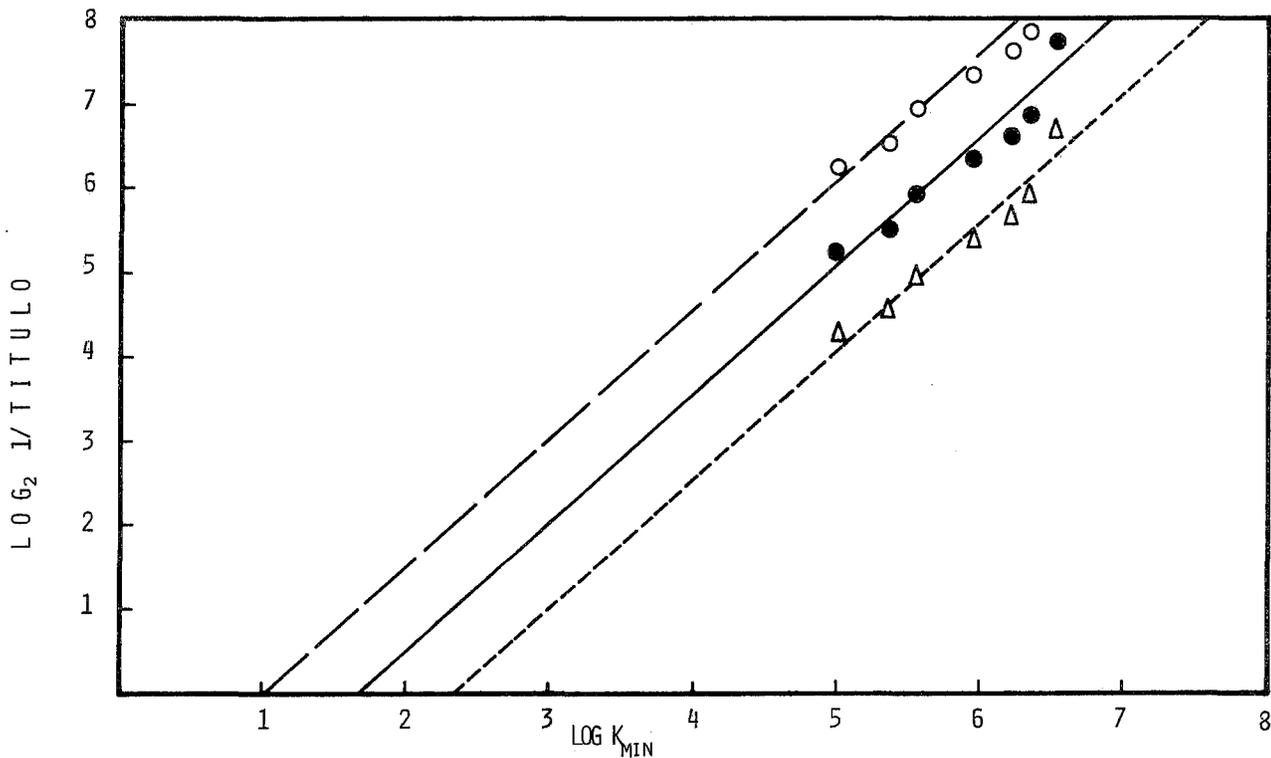


FIGURA 12.- LOG DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD PROMEDIO MINIMA NECESARIA (K_{MIN}) PARA OBTENER CIERTO TITULO DE HEMAGLUTINACION DADO QUE LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS NO SEA MAYOR QUE LOS VALORES INDICADOS: 0.5 MG/ML (\triangle), 1 MG/ML (\bullet), Y 2 MG/ML. (\circ). LOS VALORES DE LOS PUNTOS DIBUJADOS SE ENCUENTRAN EN LA TABLA XI. LAS LINEAS FUERON TRAZADAS DE ACUERDO A REGRESIONES LINEALES DE LOS PUNTOS DIBUJADOS (COEFICIENTES DE CORRELACION LINEAL $R = 0.95$ EN LOS TRES CASOS)

T A B L A X I I

Concentración de anticuerpos (mg/ml)	Título	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
	\log_2 1/título	1	2	3	4	5	6	7	8
0.5		2.99	3.64	4.29	4.95	5.60	6.26	6.91	7.57
1.0		2.33	2.99	3.64	4.30	4.95	5.60	6.26	6.91
2.0		1.68	2.33	2.99	3.64	4.30	4.95	5.60	6.26

Tabla XII.- \log_{10} de la constante de afinidad promedio mínima -
necesaria para obtener cierto título de hemaglutina
ción para distintas concentraciones de anticuerpos.
Los valores de la Tabla fueron calculados por inter
polación en las líneas de la Figura 12.

Llama la atención la forma sigmoidea de las gráficas de título de hemaglutinación en función de la constante de afinidad promedio (K_0) de los anticuerpos (Figura 11 y 12). Esta sigmoidealidad puede explicarse teniendo en cuenta la manera en que se obtienen los datos de la gráfica. Debido a que las diluciones de la muestra se hacen en forma logarítmica, es muy difícil estimar con precisión el punto final de la reacción (la última dilución a la que todavía -- hay aglutinación). Es decir: si dos preparaciones de anticuerpos con distintas K_0 pudieran dar títulos de 1:70 y 1:100 respectivamente, con este sistema estaríamos detectando para ambas un título de 1:64. Esto daría a la curva de la Figura 11 la forma de una escalera. El que nuestra gráfica no tenga exactamente esta forma se debería a que las concentraciones de nuestras preparaciones de anticuerpos no eran iguales, y al calcular los títulos que darían si sus concentraciones iniciales fueran de 1 y 2 mg/ml obtuvimos valores de títulos que experimentalmente serían imposibles de obtener (como los valores de la Tabla XI: títulos de 1:76, 1:93, 1:122, etc.)

Para definir claramente la forma de la curva, deberíamos precisar mejor el punto final, por ejemplo haciendo las diluciones en forma lineal 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, etc. También sería conveniente tener un intervalo más amplio de

constantes de afinidad. Si en este caso la sigmoidalidad persistiera, estaría indicando que existe un cierto intervalo de valores de K_0 dentro del cual las variaciones de K_0 no son acompañadas por variaciones importantes del título de hemaglutinación, y que para valores de K_0 fuera - de ese intervalo, el título fuera más sensible a variaciónes en la K_0 de la muestra. Es difícil explicar físicamente este fenómeno, pero podríamos explicarlo como sigue: Supongamos que se tienen muestras de anticuerpos a la misma concentración y cuyos valores de K_0 cubren un intervalo más o menos amplio. Para muestras con valores de K_0 - bajos, hay una cierta proporción de anticuerpos que permanecen con 1 o los 2 sitios activos desocupados. Al ir aumentando K_0 , esta proporción va disminuyendo al mismo tiempo que la proporción de anticuerpos con sus 2 sitios activos ocupados va aumentando y por lo tanto, el título va - aumentando al aumentar K_0 . Al llegar a cierto valor de - K_0 , aunque la proporción de anticuerpos con los 2 sitios- activos ocupados sigue aumentando al aumentar K_0 , dado que la fuerza de unión no es muy grande, pueden estarse dando asociaciones y disociaciones hasta que la molécula de anti cuerpo encuentre su estado de menor energía, que probablemente sea aquel en que sus 2 sitios activos se unan a grupos DNP sobre la misma célula y de esta manera los incrementos de K_0 no se reflejarán mucho en el título de -- hemaglutinación. Al seguir aumentando K_0 , las posibilida

des de asociación y disociación van siendo menores y el título vuelve a ser función directa de K_0 ya que las proporciones de anticuerpos cuyos 2 sitios activos se encuentran unidos a grupos DNP en la misma célula y aquellos en que sus 2 sitios activos se unen a grupos en células distintas, aumentan paralelamente.

E.- FRECUENCIAS DE ACTIVIDAD ANTI-DNP EN SUEROS HUMANOS NORMALES

Se probaron 492 sueros humanos de acuerdo a la técnica ya descrita en la sección de Materiales y Métodos. - 129 sueros aglutinaron los eritrocitos sensibilizados con DNP₃₂HSA. Sin embargo, 22 de ellos aglutinaron a eritrocitos no sensibilizados, lo cual indica que en estos casos la aglutinación no fué debida al DNP unido a los eritrocitos sino a algún antígeno propio de los eritrocitos o al glutaraldehído. Por lo tanto, estos sueros no se consideraron con actividad anti-DNP. De las 107 reacciones positivas restantes, 20 de ellas no fueron inhibidas por DNP₃₂HSA en solución. El significado de estas reacciones no es muy claro. Una posible explicación es que en estos sueros existieran anticuerpos que reaccionaran con algún (os) determinante(s) antigénico(s) que se hace patente -- solamente al acoplar la albúmina dinitrofenilada al eritrocito. Esto puede ocurrir porque la albúmina al unirse al eritrocito exponga al medio ciertas secuencias que en-

solución permanecen ocultas, o bien porque al unirse la albúmina dinitrofenilada a la superficie del eritrocito se asocia de tal manera a la superficie de la célula que aparezcan nuevos determinantes antigénicos formados tanto por estructuras pertenecientes a la albúmina como por estructuras de la superficie del eritrocito. De cualquier manera, estas reacciones tampoco podemos considerarlas específicas para el grupo DNP y por lo tanto, también se -- excluyeron.

En base a las anteriores consideraciones, se obtuvieron 87 reacciones positivas anti-DNP (17.5%), con títulos diversos desde 1:2 hasta 1:256. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla XIII. Las Figuras 13 y 14 muestran los resultados de algunos de los sueros.

T A B L A X I I I

Título	reacciones positivas- frente a - eritrocitos sensibili- zados	reacciones positivas- no inhibi- das por - DNP ₃₂ HSA	reacciones positivas- frente a - eritrocitos no sensibi- lizados	sueros con actividad anti-DNP	frecuencia de activi- dad anti- DNP
1:2	43	12	10	21	0.042
1:4	50	4	9	37	0.075
1:8	15	1	2	12	0.024
1:16	6	0	0	6	0.012
1:32	6	1	0	5	0.010
1:64	5	2	0	3	0.006
1:128	2	0	0	2	0.004
1:256	2	0	1	1	0.002
TOTAL	129	20	22	87	17.5%

Tabla XIII.- Frecuencias de actividad anti-DNP en sueros huma-
nos normales. Al total de reacciones positivas -
para cada título se resta el número de reacciones
que no son inhibidas por DNP₃₂ HSA en solución y -
el número de reacciones positivas debidas a los -
antígenos de los eritrocitos. Las frecuencias se
calcularon tomando en cuenta que el total de sue-
ros analizados fué de 492.

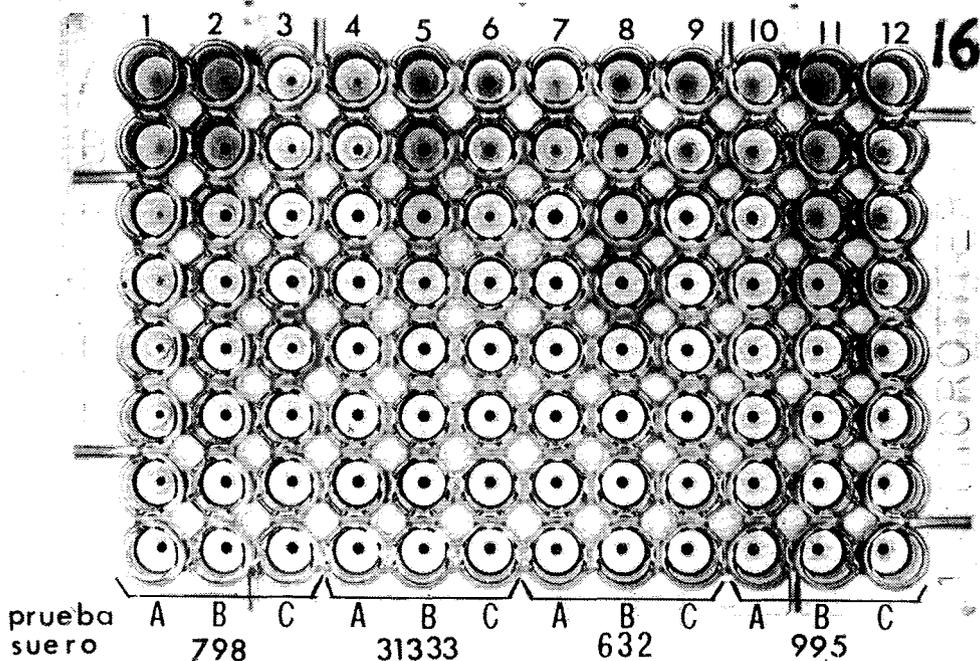


Figura 13.- Patrones de hemaglutinación observados con sueros humanos normales. Las diluciones se hicieron en sentido vertical (Fila A: diluciones 1:2, hasta Fila H: diluciones 1:256).
 Prueba A: Eritrocitos sensibilizados en presencia de HSA soluble.
 Prueba B: Eritrocitos sensibilizados en presencia de DNP₃₂ HSA-soluble.
 Prueba C: Eritrocitos no sensibilizados.

Columna	Suero	Prueba	Conclusión
1	798	A	Positiva. Título anti-DNP 1:16. Aunque hay aglutinación en B y C, los títulos son 1:2.
2	798	B	
3	798	C	
4	31333	A	Negativa. La aglutinación es muy ligera e igual a la de eritrocitos no sensibilizados.
5	31333	B	
6	31333	C	
7	632	A	Negativa. Solo hay un tubo de diferencia entre la aglutinación en A y en C.
8	632	B	
9	632	C	
10	995	A	Negativa. El título es idéntico en las tres pruebas.
11	995	B	
12	995	C	

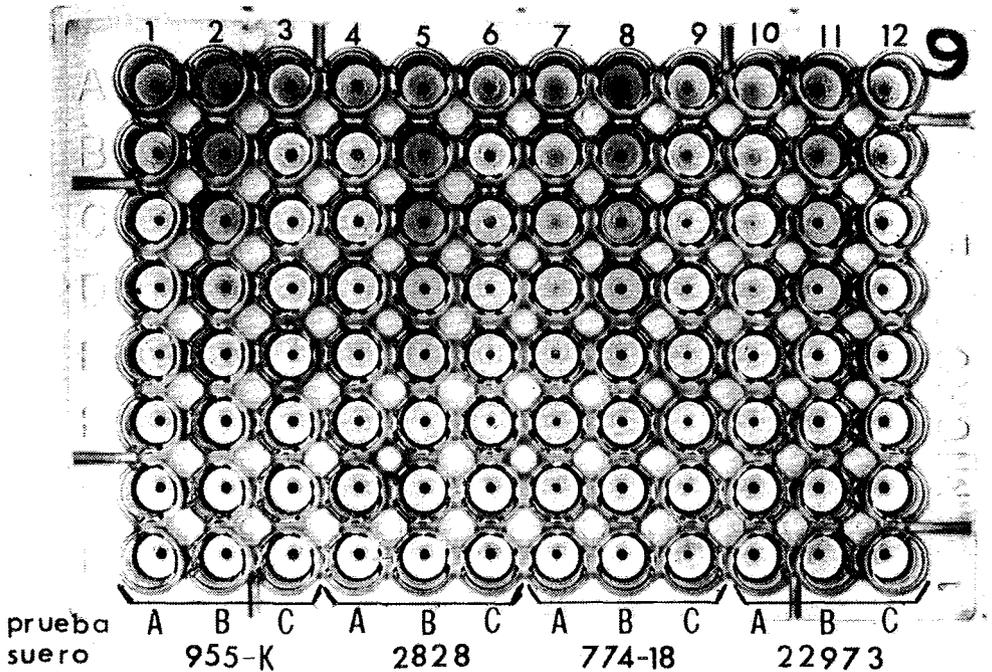


Figura 14.- Patrones de hemaglutinación observados con sueros humanos normales. Las diluciones de los sueros se hicieron en sentido vertical (Fila A: diluciones 1:2, Fila H: diluciones 1:256).

Prueba A: Eritrocitos sensibilizados en presencia de HSA soluble.

Prueba B: Eritrocitos sensibilizados en presencia de DNP₃₂ HSA soluble.

Prueba C: Eritrocitos no sensibilizados.

Columna	Suero	Prueba	Conclusión
1	955-K	A	Positiva. Título anti-DNP 1:2.
2	955-K	B	
3	955-K	C	
4	2828	A	Negativa. No hay aglutinación en ninguno de los casos.
5	2828	B	
6	2828	C	
7	774-18	A	Positiva. Título anti-DNP 1:32.- Las pruebas B y C son negativas.
8	774-18	B	
9	774-18	C	
10	22973	A	Positiva. Título anti-DNP 1:16.- Las pruebas B y C son negativas.
11	22973	B	
12	22973	C	

Como lo muestran la Figura 12 y la Tabla XII, a partir del título de hemaglutinación de una muestra podemos inferir el valor de la constante de afinidad promedio mínima (K_{\min}) que deben tener los anticuerpos presentes en esa muestra dado que la concentración de anticuerpos no sobrepase cierto valor-límite. Por lo tanto, para asignar a cada suero un valor de K_{\min} a partir de su título de hemaglutinación, fué necesario escoger un valor máximo para la concentración de anticuerpos anti-DNP presentes en sueros humanos normales. Para estimar el límite máximo de la concentración de anticuerpos anti-DNP nos basamos en los siguientes datos:

- a) Farah (23) detectó cantidades de anticuerpos anti-DNP en sueros humanos que correspondían a porcentajes entre el 0.4 y 0.8% del total de inmunoglobulinas del suero.
- b) Reisen y Morrell (7) encontraron que 4 de 279 proteínas de mielomas humanos fijaban DNP (1.4%).
- c) Terry et al (6) encontraron actividad anti-DNP en 9 de 532 sueros de humanos mielomatosos (1.6%).
- d) El conjunto de inmunoglobulinas presentes en el suero de un individuo en cualquier momento, debe ser representativo del repertorio total de inmunoglobulinas que dicho individuo es capaz de sintetizar (13).
- e) La concentración promedio de inmunoglobulinas séricas en el humano es de 14 mg/ml aproximadamente (24,25).

La fracción de inmunoglobulinas capaces de fijar --

DNP parece estar entre el 1 y el 2% del total del repertorio, y seguramente no excede del 5%. Considerando las posibles -- variaciones individuales en cuanto a concentración de inmunoglobulinas séricas, podemos considerar una concentración máxima de 21 mg/ml en sujetos sanos. Podemos entonces fijar el - límite máximo de concentración de anticuerpos anti-DNP en sueros humanos normales alrededor de 1 mg/ml.

Suponiendo que los anticuerpos anti-DNP presentes en sueros humanos normales no se encuentren en una concentración superior a 1 mg/ml, podemos asignar a cada suero un va-- lor de K_{\min} de acuerdo a su título de hemaglutinación. Así -- pudimos conocer la frecuencia de actividad anti-DNP en sueros humanos normales con respecto a constantes de afinidad en lugar de títulos de hemaglutinación (Tabla XIV). Esta correlación nos permitió comparar nuestros resultados con las predicciones hechas por el modelo de Inman (Figura 15).

En la Figura 15, la línea punteada fué obtenida -- por Inman en base a su modelo probabilístico. Para obtenerla, escogió los parámetros de su modelo de tal manera que representara las frecuencias de constantes de afinidad por el grupo DNP de un conjunto de proteínas de mielomas de ratón, de las cuales el 1% fijaban DNP con una K_0 mayor ó igual a $10^4 M^{-1}$ (3). La curva obtenida a partir de nuestros datos, aunque de forma similar, está desplazada hacia frecuencias mayores --

en el rango de constantes de afinidad entre 10^3 y 10^6 lt/mol-
si suponemos una concentración máxima de anticuerpos anti-DNP
de 1 mg/ml. Sin embargo, si tomamos como límite máximo de --
concentración de anticuerpos anti-DNP el valor de 2 mg/ml, en
tonces nuestra curva concuerda mejor con la calculada por --
Inman (Figura 15).

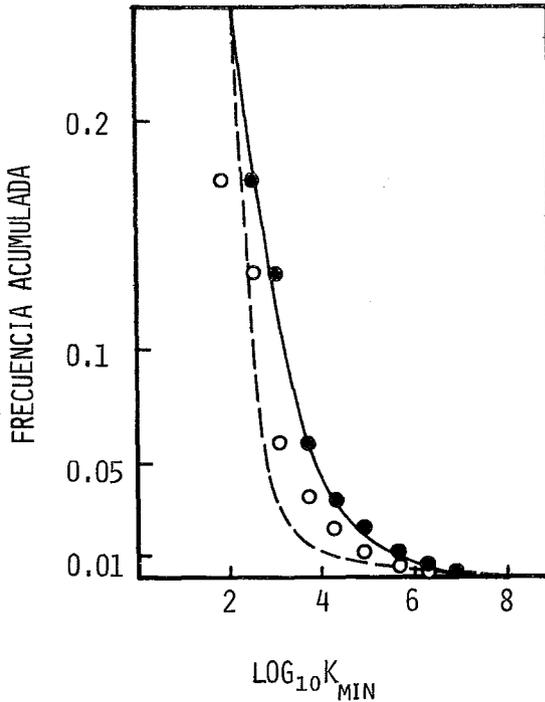


FIGURA 15.- FRECUENCIA DE REACCIONES CON CONSTANTES DE AFINIDAD IGUALES O MAYORES QUE CIERTO VALOR (K_{MIN}) ENCONTRADOS PARA ANTICUERPOS ANTI-DNP EN SUEROS HUMANOS NORMALES (CALCULADOS PARA -- UNA CONCENTRACION MAXIMA DE ANTICUERPOS ANTI-DNP DE 1 MG/ML (●) Y 2 MG/ML (○)). LA LINEA PUNTEADA ES TEORICA Y FUE OBTENIDA -- DE ACUERDO AL MODELO PROBABILISTICO DE INMAN (12).

T A B L A X I V

Título	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)	log K_{\min}	K_{\min} (lt/mol)	log K_{\min}	K_{\min} (lt/mol)
			A	A	B	B
1:256	0.002	0.2%	6.91	8.1×10^6	6.26	1.8×10^6
1:128	0.004	0.6%	6.26	1.8×10^6	5.60	4.0×10^5
1:64	0.006	1.2%	5.60	4.0×10^5	4.95	8.9×10^4
1:32	0.010	2.2%	4.95	8.9×10^4	4.30	2.0×10^4
1:16	0.012	3.4%	4.30	2.0×10^4	3.64	4.4×10^3
1:8	0.024	5.8%	3.64	4.4×10^3	2.99	9.8×10^2
1:4	0.075	13.3%	2.99	9.8×10^2	2.33	2.1×10^2
1:2	0.042	17.5%	2.33	2.1×10^2	1.70	5.0×10^1

Tabla XIV.- Frecuencias con que ocurren reacciones con cierta constante de afinidad - entre el grupo DNP y una población de sueros humanos normales. Los valores de K_{\min} fueron asignados considerando una concentración máxima de anticuerpos anti-DNP en sueros normales de 1 mg/ml (A) y 2 mg/ml (B) (Tabla XII). Las frecuencias acumuladas representan el porcentaje de sueros que contienen una población de anticuerpos capaz de reaccionar con el grupo - DNP con una constante de afinidad igual o mayor que el valor de K_{\min} correspondiente.

IV DISCUSION

En este trabajo encontramos actividad anti-DNP en 87 de 492 sueros de humanos aparentemente sanos. Los controles realizados permiten afirmar que éstas reacciones fueron específicas para el grupo DNP.

Aunque el tamaño de la muestra es suficientemente grande para afirmar que el porcentaje de positividad obtenido (17.5%) difiere significativamente de cero, los títulos de 1:2 y 1:4 en pruebas de hemaglutinación no son generalmente considerados como inmunológicamente significativos. Considerando únicamente los títulos de 1:8 y mayores, obtenemos un porcentaje de 5.9% de positividad con un intervalo de confianza (95%) de 3.9 a 7.9%.

Las altas frecuencias de actividad anti-DNP encontradas indican que el porcentaje de inmunoglobulinas capaces de reaccionar con DNP debe ser alto. Esto apoya la hipótesis de que el cambio tumoral en el mieloma múltiple ocurre al azar, y que la observación de altos porcentajes de proteínas de mielomas que reaccionan con DNP es únicamente el reflejo de que un alto porcentaje de las clonas de células plasmáticas sintetizan inmunoglobulinas capaces de reaccionar con DNP. En otras palabras, los datos apoyan la hipótesis de multiespe

cificidad de los anticuerpos.

Para comparar nuestros resultados con el modelo matemático de la hipótesis de multiespecificidad, fué necesario estimar valores de K_0 para cada suero a partir de su título de hemaglutinación. Para ésto, estudiamos la correlación entre título de hemaglutinación y concentración y K_0 de los anticuerpos, usando anticuerpos anti-DNP puros preparados en borrego. Las frecuencias de actividad anti-DNP con respecto a la constante de afinidad se compararon con las predicciones de Inman (Figura 15).

La curva obtenida a partir de nuestros resultados muestra un cierto desplazamiento hacia frecuencias mayores para valores de K_{\min} entre 10^3 y 10^6 lt/mol, con respecto a la curva calculada por Inman. Este desplazamiento puede deberse a una ò varias de las siguientes razones:

- a) Para inferir K_{\min} a partir de títulos de hemaglutinación, fijamos arbitrariamente un límite máximo a la concentración de anticuerpos anti-DNP en sueros humanos. Si supusiéramos que la concentración de anticuerpos máxima fuera el doble (2 mg/ml), la curva obtenida se correría a la izquierda y coincidiría mucho más con la curva trazada por Inman.
- b) Para inferir K_{\min} a partir de títulos de hemaglutinación, supusimos que el título de hemaglutinación dependía linealmente de la K_0 -

de los anticuerpos en todo el intervalo de valores de K_0 . Es difícil precisar la validez de esta suposición ya que únicamente contamos con anticuerpos cuyos valores de K_0 iban de 1×10^5 a 4×10^6 lt/mol, aparte de la aparente sigmoidealidad observada que ya se discutió en la sección de Resultados.

- c) La sensibilidad del ensayo se determinó usando anticuerpos anti-DNP purificados disueltos en PBS. Es posible que en el proceso de purificación se inactive una cierta fracción de los sitios activos de los anticuerpos, de modo que las concentraciones reales de anticuerpos activos en cada una de las fracciones de anticuerpos puros sean menores que las que suponemos. Si este fuera el caso, los títulos calculados para concentraciones de anticuerpos anti-DNP de 1 y 2 mg/ml (Tabla XI) estarían por debajo de los reales, y las K_0 necesarias para obtener cierto título serían menores que las anotadas en la Tabla XII. Por lo tanto, los valores de K_{\min} asignados a partir del título de hemaglutinación de cada suero (Tabla XIV) estarían sobreestimados y la posición real de la curva de la Figura 15 se acercaría más a la predicha por Inman. Además, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la presencia de suero puede modular significativamente la fijación de antígeno por el anticuerpo incrementando K_0 y S_0 .
- d) La posición de la curva trazada de acuerdo al modelo teóric

co (Figura 15) dependerá tanto del determinante antigénico de que se trate, como de la especie a que pertenezcan los anticuerpos. Inman escogió los parámetros de su modelo de tal modo que la curva obtenida representara las frecuencias de constantes de afinidad de un conjunto de proteínas de mielomas de ratón, de las cuales el 1% fijaban DNP con una K_0 mayor o igual a 10^4 lt/mol.

La forma de la curva obtenida (Figura 15) demuestra que la fracción de anticuerpos capaces de reaccionar con un determinante antigénico con constantes de afinidad altas (mayores de 10^5) es pequeña (0.02), y cómo a partir de ese valor hacia constantes de afinidad menores esa fracción va creciendo considerablemente. Es por esto que rara vez se detectan reacciones serológicas contra determinantes antigénicos con los que no se haya estado en contacto previamente. En la mayoría de los casos las interacciones ocurren con una K_0 por debajo del umbral de detección, y la concentración de anticuerpos capaces de reaccionar con una K_0 suficientemente grande será muy pequeña para poder observar la reacción macroscópicamente.

El modelo de Inman da una demostración cuantitativa de como la hipótesis de multiespecificidad de los anticuerpos puede explicar satisfactoriamente la capacidad del sistema inmune de responder con un grado de especifici-

idad adecuado a un número ilimitado de determinantes antigénicos. El modelo se basa en consideraciones acerca de la probabilidad de que ocurran un cierto número de interacciones de diferentes tipos entre un determinante antigénico y el sitio activo de un anticuerpo. Tomando en cuenta las contribuciones de cada tipo de interacción al cambio de la energía libre del sistema, describe las frecuencias esperadas con que ocurrirán reacciones entre un hapteno escogido al azar y un conjunto grande de inmunoglobulinas. El hecho de que nuestros resultados reproduzcan la forma de la curva teórica no prueba la hipótesis de multiespecificidad. Sin embargo, nos parece un argumento muy sugerente de que el modelo y la hipótesis se acercan bastante a la situación real, principalmente tomando en cuenta que nuestros resultados representan las frecuencias de actividad anti-DNP en una muestra grande de sueros normales.

Nuestros resultados involucran una serie de suposiciones y limitaciones (inferir K_0 a partir del título de hemaglutinación, dependencia lineal del título de hemaglutinación con respecto a K_0 , determinación de la sensibilidad del ensayo, etc.) a las cuales ya nos hemos referido. Sin embargo, no creemos que ninguna de ellas, en el caso de que no fueran completamente ciertas, introdujera una modificación sustancial en los resultados de tal modo que

la concordancia con el modelo de Inman se perdiera.

Es imposible decir si nuestros datos concuerdan o no con resultados de estudios similares efectuados por otros autores. Como lo muestra la Tabla XV, estos resultados han sido muy distintos entre sí. Posiblemente esto se debe a -- que las sensibilidades de los diferentes métodos de detección usados son distintos. Sin embargo, es clara la existencia de anticuerpos anti-DNP en sueros humanos normales, los que pueden ser demostrados en una fracción de los sueros que oscila tal vez dependiendo de la sensibilidad del sistema de detección. Con un sistema lo suficientemente sensible para detectar anticuerpos en muy bajas concentraciones y/o de bajas afinidades, muy probablemente se encontrará actividad -- anti-DNP en el suero de cualquier individuo. Nuestros resultados son originales en cuanto a que son los únicos que definen actividad anti-DNP en función de una constante de afinidad. Para esta definición de actividad existe una predicción teórica derivada de la hipótesis de multiespecificidad y nuestros resultados son, por lo tanto, críticos de la validez de la hipótesis.

La existencia de anticuerpos anti-DNP en sueros humanos es difícilmente explicable en términos de una exposición previa al antígeno, puesto que se trata de una sustancia sintética que no existía en el desarrollo filogénico de-

T A B L A X V

Sueros positivos		Método de detección	
Total de sueros	% positividad	de actividad anti-DNP	Referencia
45/56	80%	hemaglutinación pasiva	26
4/4	100%	retención por una columna de DNP-aminoetilcelulosa y elución con DNP-glicina	23
12/100	12%	precipitación por doble inmunodifusión con conjugados DNP-proteína	6
0/61	0%	fijación de ³ H-DNP-lisina (método de Farr)	6
25/25	100%	aglutinación de bacterias recubiertas con DNP	27

Tabla XV.- Frecuencias de actividad anti-DNP en sueros humanos -- normales reportadas.

la inmunidad y, por ende, no pudo actuar selectivamente. Empero, la posibilidad de que la detección de anticuerpos anti-DNP se deba a una reacción cruzada con un antígeno desconocido pero muy frecuente no puede ser ignorada, aunque parece poco probable ya que el sistema DNP-anti-DNP ha sido estudiado quizá más que ningún otro y no se ha reportado ninguna -- reacción cruzada con algún antígeno tan común que pudiera explicar la alta frecuencia de actividad anti-DNP en sueros -- normales. Además los antígenos con que se han encontrado -- reacciones cruzadas con anticuerpos anti-DNP homogéneos, son diferentes para cada inmunoglobulina individual (3,28) por lo que es difícil pensar que exista un antígeno único que -- fuera responsable de la aparición de actividad anti-DNP.

La hipótesis de multiespecificidad de los anticuerpos es cada vez más ampliamente aceptada a la luz de algunas otras evidencias (10, 28, 29, 30, 31 y 32). Las implicaciones biológicas de la multiespecificidad de los anticuerpos -- han sido revisadas y discutidas anteriormente (13, 30, 32 y 33). Las principales son las siguientes:

- a) Confiere al individuo (o a la especie) capacidad para responder adecuadamente a antígenos que nunca hayan aparecido en la historia de la especie.
- b) Preserva la capacidad de un individuo para responder contra determinantes antigénicos que hayan desaparecido del-

- medio ambiente y que eventualmente pudieran reaparecer.
- c) El número de genes necesarios en el genoma para asegurar la capacidad de responder a cualquier antígeno es mucho menor que si se consideran anticuerpos monoespecíficos.
 - d) Da una explicación de las altas frecuencias con que se -- han encontrado actividades de anticuerpos y reactividad -- cruzada en proteínas de mielomas.
 - e) La heterogeneidad de inmunoglobulinas con que responde un animal a un determinante antigénico, más que una imperfección es una ventaja, ya que confiere al suero inmune una mayor especificidad, al disminuir la probabilidad de reacciones cruzadas (Ver Fig. 1).
 - f) Unifica las propiedades de fijación de los anticuerpos -- con las de otras proteínas (enzimas, receptores de superficie de las células, etc.), en cuanto a su capacidad de fijar en su sitio activo, moléculas con estructuras diferentes entre sí (12, 39).
 - g) Puede ser una explicación razonable para la presencia de anticuerpos "naturales" en sueros normales.
 - h) Implica que cualquier individuo debe tener anticuerpos -- circulantes contra cualquier determinante antigénico contra el cual sea capaz de responder, aún cuando no haya -- existido un estímulo directo. Esto resultaría en que un -- individuo que haya estado en contacto con un número grande de determinantes antigénicos a lo largo de su vida, tendría en circulación un número suficientemente grande de espe

cies diferentes de anticuerpos, de las cuales debe haber un cierto porcentaje que reaccione con un antígeno escogido al azar. Estas reacciones raramente serían detectables por técnicas bioquímicas usuales, porque las concentraciones y afinidades de estas reacciones serían bajas, pero pueden ser biológicamente operantes y dan cuenta de el desarrollo ontogénico rapidísimo de la inmunidad sin poderse sólidamente demostrar un proceso de exposición a numerosos estímulos antigénicos.

En fin, la hipótesis de multiespecificidad de los anticuerpos no solamente explica razonablemente algunas características de la respuesta inmune que son difícilmente explicables considerando que los anticuerpos sean monoespecíficos, sino que también dá cuenta de otras características que confieren al aparato inmune una mayor eficiencia.

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

- 1.- Se encontró actividad anti-DNP en un 17.9% de sueros de humanos aparentemente sanos.
- 2.- Este alto porcentaje indica que la clona anti-DNP es muy frecuente y, por lo tanto, apoya la hipótesis de que el cambio tumoral en el mieloma múltiple ocurre al azar.
- 3.- Nuestros resultados son originales en cuanto que son los únicos que definen actividad anti-DNP en función de una constante de afinidad.
- 4.- Nuestros resultados apoyan la hipótesis de multiespecificidad de los anticuerpos puesto que muestran concordancia con una predicción teórica derivada por Inman de la hipótesis de multiespecificidad.



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

- 1.- Karush F. The Structural Basis for Antibody Specificity. *Ann. Rev. Biochem.* 2:1-40. Academic Press Inc. 1962.
- 2.- Landsteiner K. The specificity of serological reactions. Rev. Ed. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1945.
- 3.- Eisen H.N., Michaelides M.C., Uderdown B.J., Schulemburg E.P. & Simms E.S. Myeloma proteins with anti-hapten antibody activity. *Fed. Proc.* 29:78-84, 1970.
- 4.- Metzger H. Myeloma proteins and antibodies. *Am. J. Med.* 47:837-44, 1969.
- 5.- Schubert D., Jobe A., & Cohn M. *Nature* 220:882, 1968.
- 6.- Terry W.D., Body M.M., Rea J.S., & Stein R. Human M-proteins with antibody activity for DNP ligands. *J. Immunol.* 104:256, 1970.
- 7.- Reisen & Morell. A human myeloma protein with specificity vs. DNP and nucleic acids derivatives. *Immunochemistry* 9:979-85, 1972.
- 8.- Schubert D., Roman A., & Cohn M. Anti-nucleic acids specificity of mouse myeloma immunoglobulins. *Nature* 225:154-58, 1970.
- 9.- Parker C.W. & Osterland C.K. Hydrophobic binding sites on immunoglobulins. *Biochemistry* 9:1074, 1970.
- 10.- Michaelides M.C. & Eisen H.N. The strange cross reaction of menadione and DNP ligands with a myeloma protein and some conventional antibodies. *J. Exp. Med.* 140:687, 1974.

- 11.- Talmage D.W. Immunological specificity. *Science* 129:1643-48, 1959.
- 12.- Inman J.K. The antibody combining region: speculations on the hypothesis of general multispecificity. En: *Theoretical Immunology*. Ed. by Bell G.I., Perelson A.S., y Pimbley Jr. G.H. págs. 243-78. Marcel Dekker Inc. 1978.
- 13.- Williamson A.R. The biological origin of antibody diversity. *Ann. Rev. Biochem.* 47:467-500, 1976.
- 14.- Kendall F.F. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 6: 376, 1938.
- 15.- Marck S.C., Parikh I. & Cuatrecasas P. *Analytical Biochem.* 60:149-152, 1974.
- 16.- Velick S.F., Parker C.W. & Eisen H.N. Energy transfer and quantitative study of antibody-hapten interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:1470, 1960.
- 17.- Eisen H.N. & Mc. Guigan J.E. Quenching of antibody fluorescence by haptens and antigens: A method for determining antibody-ligand affinity. En: *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Ed. by Williams C.A. y Chase M.W. Vol. III. págs. 395-406. Academic Press Inc. 1971.
- 18.- Eisen H.N. *Meth. Med. Res.* 10:115, 1964.
- 19.- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
- 20.- Little J.R. & Eisen H.N. En *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Williams G.A. y Chase M.W. (editors) Vol. I págs. 131. Academic Press Inc. New York, 1967.
- 21.- Bing D.H., Weyand J.G.M., & Stavinsky A.B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124:166-7-, 1967.

- 22.- Hirata A.A., & Brandriss M.W. Passive hemagglutination procedures for protein and polysaccharide antigens using erythrocytes stabilized by aldehydes. *J. Immunol.* 100: 641-46, 1968.
- 23.- Farah F.S. Natural antibodies specific to the 2,4-dinitrophenyl group. *Immunol.* 25:217-26, 1973.
- 24.- Fudenberg H.H., Stites D.P., Caldwell J.L. & Wells J.V. *Basic and Clinical Immunology*. 2nd. Edition. Lange Medical Publications, Los Altos, California. pág. 28, 1978.
- 25.- Todd-Sanford's Clinical diagnosis by laboratory methods. 15th. edition. Davidson and Henry (eds.) W.B. Saunders Co. Philadelphia. pág. 573, 1974.
- 26.- Brandriss M.W. Antibody-like activity to the 2,4-dinitrophenyl group in normal human sera. *Nature* 221:960-62, 1969.
- 27.- Tuset N., Gras J. & Brugulat P. Natural anti-DNP antibodies in normal and pathological human sera. *Biomedicine (express)* 29:261-2, 1978.
- 28.- Cameron D.J. & Erlanger B.F. Evidence for multispecificity of antibody molecules. *Nature* 268:763-65, 1977.
- 29.- Richards F.F., Amzel L.M., Konigsberg W.H., Manjula B. M., Poljak R.J., Rosenstein R.W. Saul F., & Varga J.M. Polyfunctional antibody combining regions. En: *The immune system. Genes, receptors and signals*. Ed. by Secarz E.E., Williamson A.R., y Fox F.C. pág. 53-67, Acad. Press Inc. New York, 1974.
- 30.- Inman J.K. Multispecificity of the antibody combining region and antibody diversity. En: *The immune system. Genes, receptors, signals*. Ed. by Secarz E.E., Williamson A.R. & Fox F.C. pág. 37-52. Acad. Press Inc. New York, 1974.

- 31.- Varga J.M., Konigsberg W.H. & Richard F.F. Antibodies with multiple binding functions. Induction of single immunoglobulin species by structurally dissimilar haptens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:3269-74, 1973.
- 32.- Richards F.F., Konigsberg W.H., Rosenstein R.W. & Varga J.M. On the specificity of antibodies. Science 187:130-37,1975.
- 33.- Richards F.F. & Konigsberg W.H. Speculations: How specific are antibodies? Immunochemistry 10:545-53,1973.
- 34.- Eisen H.N. Equilibrium dialysis for measurement of antibody-hapten affinities. Meth. Med. Res. 10:106-14,1974.
- 35.- Steward M.W. Introduction to the methods used to study antibody-antigen reactions. En: Handbook of experimental immunology 3rd. edition Weir D.M. (ed.) Vol. I Cap. 16 Blackwell Scientific Publications. 1978.
- 36.- Klotz I.M. Proteins interactions. En: The Proteins. Vol. I Pte. B. Pág. 727. Neurath y Bailey (eds.) Academic Press Inc. 1953.
- 37.- Nissonof A. & Pressman D. Heterogeneity of average combining constants of antibodies from individual rabbits. J. Immunol. 80:417-28,1958.
- 38.- Larralde C. & Janof P. The Effects of the DNP:HSA molar ratio on the quantity and the affinity of rat anti-DNP antibodies in the primary response. Immunochemistry 9: 1209-19,1972.
- 39.- Glazer A.N. On the prevalence of "nonspecific" binding at the specific binding sites of globular proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 52:1099-1106,1970.