



11261
lej
1

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE INTERACCIONES EN
ANTICUERPOS HOMOGENEOS CON ACTIVIDAD ANTI-
DNP EN LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO

T E S I S
PRESENTADA POR:
JUANITA ELIZABETH DEL BOSQUE MENDEZ
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
1983

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

I N D I C E

Agradecimientos.....	i
Resumen.....	ii
Lista de tablas.....	iii
Lista de figuras.....	iv
Abreviaturas.....	v

INTRODUCCION

1.1 ¿Existe cooperatividad en la reacción antígeno-anticuerpo?.....	1
--	---

MATERIALES Y METODOS

2.1 Animales.....	7
2.2 Preparación del inmunógeno 2,4 dinitrofenol-hemocianina (KLH).....	8
2.3 Medios de cultivo.....	8
2.4 Células tumorales.....	10
2.5 Obtención de linfocitos de ratón para la formación del híbrido.....	11
2.6 Fusión.....	12
2.7 Técnicas de detección de anticuerpos	13
2.8 Clonación.....	15
2.9 Expansión.....	17
2.10 Purificación de anticuerpos.....	18
2.11 Caracterización de los anticuerpos..	20
2.12 Anticuerpos del mieloma MOPC-315....	21
2.13 Preparación de la solución de hapteno ξ -3-4- ³ H-2,4 dinitrofenil L-lisina.....	21
2.14 Determinación de las constantes de afinidad.....	21
2.15 Método de ajuste y simulación.....	27
2.16 Diálisis en equilibrio.....	28

RESULTADOS

3.1	Cinética de la respuesta a DNP de los ratones inmunizados con DNP-KLJ.....	37
3.2	Fusión.....	37
3.3	Clonación.....	40
3.4	Expansión.....	42
3.5	Purificación de los anticuerpos...	42
3.6	Caracterización de los anticuerpos	46
3.7	Apagamiento de la fluorescencia...	46
3.8	Diálisis en equilibrio.....	56
3.9	Scatchard.....	69
3.10	Curva de ajuste y simulación.....	81

DISCUSION.....	89
----------------	----

ANEXOS

I	Modelo Teórico.....	99
II	Hibridomas.....	111

BIBLIOGRAFIA.....	123
-------------------	-----

RESUMEN

La cooperatividad es un fenómeno que presentan la mayoría de las proteínas que llevan a cabo reacciones de fijación. Y se define como la capacidad de estas moléculas de fijar más de un ligando en forma dependiente lo cual redundando en una modificación de la estructura y de los valores energéticos de la proteína que puede resultar o no en una modificación ostensible de su función.

Hasta ahora los reportes sobre cooperatividad han sido con anticuerpos heterogéneos, en donde la presencia de un brazo ascendente en los trazos de Scatchard es sinónimo de cooperatividad. Sin embargo, este fenómeno es considerado como producto de un artefacto experimental por la comunidad científica.

Al utilizar un anticuerpo homogéneo producto de un hibridoma, de la clase G y ensayarlo por apagamiento de la fluorescencia y diálisis en equilibrio se comprueba que la cooperatividad existe por la presencia de un brazo ascendente en los trazos de Scatchard. Además al compararse con un anticuerpo homogéneo de la clase A, producto del mieloma MOPC-315, el cual no presenta brazo ascendente en los trazos de Scatchard, se confirma que el fenómeno es inherente a cada molécula de inmunoglobulina y que no es producto de la heterogeneidad inicial.

L I S T A D E T A B L A S

TABLA

- I Características de las soluciones de DNP-Lisina utilizadas en experimentos de fijación de DNP-Lisina por anticuerpos anti-DNP.
- II Cultivos positivos en su respuesta a DNP los cuales se clonaron por técnicas de Agar-blando y dilución iimitante
- III Ensayos de fluorescencia con los valores para el cálculo de los parámetros de las ecuaciones de Scatchard, Sips y Hill para las δ -globulinas heterogéneas.
- IV Ensayos de fluorescencia con los valores para el cálculo de los parámetros de las ecuaciones de Scatchard, Sips y Hill para la IgG₃.
- V Ensayos de fluorescencia con los valores para el cálculo de los parámetros de las ecuaciones de Scatchard, Sips y Hill para la IgA.
- VI Valores obtenidos por Diálisis en equilibrio para el cálculo de los parámetros de las ecuaciones de Scatchard, Sips y Hill para la IgG₃.
- VII Datos para conocer los estimados de K_1 y K_2 en anticuerpos homogéneos (IgG₃ e IgA).
- VIII Anticuerpos homogéneos (IgG₃) anti-DNP purificados. Estimados de la relación entre las constantes experimentales del 1ero. y 2do. sitio de reacción.
- IX Valores de los estimados de K_1 y K_2 obtenidos por el método de simulación-ajuste para anticuerpos homogéneos (IgG₃ e IgA).
- X Tumores productores de inmunoglobulinas en ratones.
- XI Cronología de eventos en la historia de la hibridación de células somáticas.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

- 1 Doble inmunodifusión en agar con la globulina anti-DNP (IgG_3).
- 2 Aparato multodializador
- 3 Cinética de la respuesta a DNP determinada mediante la técnica de hemólisis localizada en gel.
- 4 Perfil cromatográfico en columna con DEAE-celulosa de las inmunoglobulinas precipitadas con solución saturada de sulfato de amonio.
- 5 Inmunolectroforesis de las inmunoglobulinas obtenidas de líquido de ascitis de ratón y de sobrenadante de cultivo.
- 6 Perfil cromatográfico en columna de DOWEX-I del conjugado DNP-anticuerpo obtenido de líquido de ascitis.
- 7 Doble inmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón frente a varias diluciones de DNP-acarreadores.
- 8 Electroforesis reductora en gel de poliacrilamida con DSS al 10% y 2-ME.
- 9 Doble inmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón frente a antisueros de ratón producidos en contra de las diferentes clases de inmunoglobulinas del mismo.
- 10 Isoelectroenfoque del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón en condiciones reductoras.
- 11, 12 y 13 Curvas de apagamiento de la fluorescencia de δ -globulinas heterogéneas, IgG_3 e IgA .
- 14 Efecto del tiempo sobre las lecturas obtenidas.
- 15 Trazos de Scatchard y curva de apagamiento de la fluorescencia para unas δ -globulinas heterogéneas.
- 16 Trazos de Scatchard y curva de apagamiento de la fluorescencia para la IgA .

- 17 Trazos de Scatchard y curva de apagamiento de la fluorescencia para la IgG_3 .
- 18 Trazos de Scatchard y diálisis en equilibrio para la IgG_3 .
- 19 Curvas de simulación-ajuste para la IgA . Apagamiento de la Fluorescencia.
- 20 Curvas de simulación-ajuste para la IgG_3 . Apagamiento de la fluorescencia.
- 21 Curvas de simulación-ajuste para los valores de IgG_3 obtenidos por diálisis en equilibrio.
- 22 Curvas de simulación-ajuste para los valores de las diferentes ecuaciones 20,21 y 22.
- 23 Gráfica de Scatchard (Anexo 1).

A B R E V I A T U R A S

ABM	=	Amortiguador de barbital modificado
ACF	=	Adyuvante completo de Freund
AIF	=	Adyuvante incompleto de Freund
ASF	=	Amortiguador salino fosfatos
B	=	Pegado
B/H	=	Pegado sobre libre
C.H.	=	Coefficiente de Hill
CFA	=	Células formadoras de anticuerpo
DID	=	Doble inmunodifusión
D.O.	=	Densidad óptica
DSS	=	Duodecil sulfato de sodio
DNP	=	Dinitrofenol
EC	=	Eritrocitos de carnero
ER	=	Electroforesis reductora
IAT	=	Medio completo con hipoxantina, aminopterina y timidina
HEPES	=	N-2-hidroxietil piperazina ácido n-2-etanosulfónico
HGPRT	=	Enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa
HP	=	Hemaglutinación indirecta o pasiva
IEE	=	Isoelectroenfoque
IEF	=	Inmunolectroforesis
IH	=	Inhibición de la hemaglutinación
i.p.	=	Intraperitoneal
i.v.	=	Intravenoso
KLH	=	Hemocianina
MCI	=	Medio de cultivo incompleto
MEMD	=	Medio Eagle modificado por Dulbecco
MMC	=	Medio de cultivo completo
PEG	=	Polietilenglicol
SFB	=	Suero fetal bovino
SSA	=	Solución saturada de sulfato de amonio
SSB	=	Solución salina balanceada
SSI	=	Solución salina isotónica
TK	=	Enzima timidina kinasa
TNP	=	Acido 2,4,6-trinitrobencénico sulfónico

I N T R O D U C C I O N

¿Existe Cooperatividad en la Reacción Antígeno-Anticuerpo?

El estudio del reconocimiento y unión entre proteínas y otras moléculas es una manera de conocer su función a nivel molecular; del resultado de estos estudios sabemos como interaccionan el grupo heme con la globina, el oxígeno con la hemoglobina, algunos metales con ciertas enzimas, la opsina con la retina, aniones con albúmina sérica o con insulina, ciertos pigmentos con la lana, la insulina con otras moléculas de insulina, algunas proteínas con ácidos nucleicos, proteasas con proteínas sólo para mencionar algunos ejemplos (50). El estudio de estas interacciones tiene un interés muy particular porque generalmente determina un efecto biológico para la respiración, la visión, la actividad enzimática, etc. Una característica de las reacciones de fijación que presentan enzimas, toxinas, anticuerpos, antibióticos, receptores de superficie y otros, es la especificidad, que es la capacidad de estas moléculas para interaccionar con un número reducido de estructuras químicas y no con otra cualquiera, aunque existan semejanzas estructurales (30).

Cuando las proteínas interactúan con sus ligandos, en su mayoría presentan efectos alostéricos y de cooperación. La diferencia entre estos dos efectos es que en el primero existe una alteración de la actividad química o biológica debida a la unión de una molécula distinta del ligando (Modulador) y en el segundo una facilitación de la función del sitio activo por la unión del ligando a otro sitio idéntico localizado en la misma macromolécula, es decir el mismo ligando actúa como modulador.

Se entiende por cooperatividad, al mecanismo mediante el cual al ser fijada una molécula(ligando) a otra molécula que posea un sitio activo o de reconocimiento, se induce un cambio conformacional ya sea intramolecular o intermolecular que hace que la molécula fije con mayor afinidad otra molécula de ligando. De aquí, que un aumento en el número de sitios activos puede ser visto como cooperatividad, ya que significaría que los sitios que tienen baja o ninguna capacidad de unión pueden adquirirla a medida que se lleva a cabo la reacción; esto es, su constante de afinidad puede aumentar a un nivel detectable.

El caso de la hemoglobina es un ejemplo clásico donde la unión del grupo heme con la primera y segunda molécula de oxígeno se lleva a cabo con la misma afinidad, mientras que la unión con la tercera y cuarta molécula de oxígeno se realiza con mayor afinidad. Lo cual hace pensar que la interacción de una proteína con más de un ligando puede ser dependiente, ya que la unión del primer ligando implica alguna modificación de la estructura

y de los valores energéticos de la proteína que resulta o no en una modificación ostensible de su función.

Una de las manifestaciones de la respuesta inmune es la reacción antígeno-anticuerpo, donde los anticuerpos séricos y de las secreciones son poblaciones heterogéneas de moléculas capaces de unirse no-covalentemente a un gran número de antígenos. Los enlaces en las interacciones antígeno-anticuerpo son del tipo de los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrófobas o apolares, las iónicas, las de van der Waals, los factores estéricos o las fuerzas estéricas repulsivas. Estas fuerzas comparten una propiedad común y es la de ser inversamente proporcionales a la distancia entre los grupos que interactúan. Se postula que estas interacciones tienen efectos sobre las propiedades de los anticuerpos que se ven asociadas con la generación de señales biológicas tales como la fijación de complemento, la degranulación de células cebadas, etc.

De lo anterior se deduce que la afinidad sea considerada como la suma de las fuerzas, tanto de atracción como de repulsión, resultantes de la interacción antígeno-anticuerpo en equilibrio. Por lo tanto la afinidad se considera como una medida termodinámica de las fuerzas de atracción antígeno-anticuerpo y se expresa como la constante de equilibrio (K_{eq}) en lt/mol o como ΔG° ($\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$) en Kcal/mol. De esta manera un anticuerpo de alta afinidad tendrá un ΔG° negativo. Por definición se considera a la cooperatividad como un aumento en la constante

de afinidad.

Hasta la fecha en la reacción antígeno-anticuerpo han predominado los reportes para efectos alostéricos, tales como la habilidad para disparar el sistema de complemento (2), la aparición de nuevos determinantes antigénicos (27), los cambios en las propiedades de reactividad del fragmento Fc con receptores celulares (48), etc. Actualmente se considera que no existen interacciones entre los sitios activos de los anticuerpos bivalentes, las cuales producirían un aumento en la afinidad por el hapteno monovalente o en general por el antígeno polivalente.

Sin embargo, algunas evidencias experimentales recientes, parecen indicar que sí puede haber cooperación entre los sitios activos del anticuerpo bivalente cuando reaccionan con haptenos monovalentes, antígenos polivalentes o en el caso de sistemas como el de hormonas esteroides (8,10,49 y 74).

Hasta ahora los estudios que se han hecho para investigar si existe cooperatividad en la reacción antígeno-anticuerpo, han sido desarrollados con anticuerpos heterogéneos, en los que se demuestra cooperatividad por la presencia de un brazo ascendente en los trazos de Scatchard a valores bajos de ligando unido (49) (Anexo 1). Este brazo ascendente generalmente no se observa debido a que en la literatura es costumbre quitar los puntos de los extremos (exceso de anticuerpo y exceso de antígeno) y sólo se reportan los puntos intermedios que tienen una tendencia clara a descender en un Scatchard. Además, frecuen-

temente se trabaja con concentraciones mínimas de hapteno , que oscilan entre 10^{-6} M y un máximo de 10^{-3} M, que son muy altas para poder detectar un brazo ascendente. Por otra parte, este fenómeno es poco aceptado en el ámbito científico, ya que está sujeto a mucha controversia.

Por todo lo anterior, se ha postulado que este brazo ascendente sinónimo de cooperatividad, sea un artefacto experimental. De aquí que existan 7 posibles fuentes de artefacto que son:

1. Diferentes tiempos de equilibrio para diferentes concentraciones de ligando.
2. Recuperación variable de la marca radioactiva a diferentes concentraciones de ligando.
3. Unión no específica de ligando a γ -globulinas.
4. Retención parcial del ligando después de diálisis extensiva de anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad que han sido eluidos con hapteno no radioactivo. El ligando retenido puede competir efectivamente con bajas concentraciones de ligando radioactivo y producir un brazo ascendente.
5. Contaminación radioactiva en la preparación de DNP-119 sina comercial.
6. Concentración de los anticuerpos utilizados en el experimento.
7. Polimerización del ligando a concentraciones en las cuales se detecta el brazo ascendente (si el anticuero

po tiene diferentes constantes de afinidad para ligandos monoméricos y poliméricos).

De lo anterior se deduce que el fenómeno que se presenta en la reacción antígeno-anticuerpo no es producto de un artefacto y es demostrable con una población heterogénea de anticuerpos.

La hipótesis de trabajo presentada en esta tesis es:

Si el fenómeno de cooperatividad se presenta en una población heterogénea de anticuerpos, puede que sea producto de la heterogeneidad per se o que existan subpoblaciones de anticuerpos (homogéneas) que lo presenten.

Para poder demostrarlo se tuvo que elaborar un anticuerpo monoclonal, esto es monoespecífico (Anexo 2) con actividad anti-DNP y de la clase G para probarlo por Apagamiento de la fluorescencia y Diálisis en equilibrio y así comparar los resultados obtenidos con los datos existentes para una población heterogénea y de esa manera apoyar el que la cooperatividad es un fenómeno inherente a cada molécula que la presente. Debido a que no todas las moléculas de anticuerpo lo presentan, aún teniendo la misma especificidad, como es el caso de la proteína del mieloma MOPC-315 que produce un anticuerpo de la clase A con actividad anti-DNP y que en esta tesis fué probado por Apagamiento de la fluorescencia ya que sirvió como una molécula patrón con respecto al anticuerpo monoclonal, debido a que no presenta el fenómeno de cooperatividad.

MATERIALES Y METODOS

Animales. En los experimentos realizados se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c con edades entre 6 y 8 semanas, los cuales se mantuvieron en el bioterio en cajas de acrílico con tapa de rejilla metálica, a una temperatura de 16 a 20°C y se alimentaron con tabletas de purina (Purina de México, S. A., de C.V.) y agua ad libitum.

Preparación del inmunógeno 2,4-dinitrofenol-hemocianina (KLH).

Para la inmunización de los ratones se disolvieron 100 mg de carbonato de potasio (K_2CO_3) en 5 ml de agua; a esta solución se le agregaron 100 mg de hemocianina (Keyhole limpet hemocyanin, Calbiochem, La Jolla, CA) (KLH). Por otro lado, se disolvieron 200 mg de ácido 2,4-dinitrobenzen sulfónico (Eastman Kodak, Rochester, N.Y.) (DNP) en 5 ml de agua destilada tibia y se añadieron a la solución anterior con agitación constante durante 15 h en la obscuridad y a temperatura ambiente. Después se dializó contra agua destilada con un poco de K_2CO_3 hasta obtener un pH de 7 a 7.4. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y col (37) y la concentración de DNP por lectura de la densidad óptica (D.O.) a 363 nm en un espectrofotómetro (Helger and Watts).

Inmunización de los ratones con DNP-KLH.

La inmunización de los ratones se efectuó mediante tres dosis. La primera con una concentración de 500 μ g de DNP-KLH en 0.2 ml de una mezcla de solución salina isotónica (SSI) y adyuvante completo de Freund (ACF) (Gibco, Gran Island Biological, N.Y.), por vía intraperitoneal (i.p.). Treinta días después se les dió una segunda dosis de 500 μ g de DNP-KLH en 0.2 ml de una mezcla de SSI y adyuvante incompleto de Freund (AIF) (Gibco) por vía i.p. . A los siguientes 30 días se les administró la última dosis inmunizante por vía intravenosa (i.v.), con una concentración de 100 μ g de DNP-KLH en 0.2 ml de SSI estéril. Después de 4 días de la última dosis se determinó en el bazo de los animales inmunizados la presencia de células formadoras de anticuerpo (CFA) mediante la técnica de hemólisis localizada en gel (Jerne) (29). Estas últimas además fueron utilizadas para la formación de hibridomas por el método de Köhler y Milstein (33), modificado por Geffer y col. (23).

Medios de cultivo.

Para los experimentos se utilizaron medios de cultivo preparados de varias formas a partir del medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD) con l-glutamina y glucosa en una concentración de 4.5 g/lit (Gibco), como sigue:

- A) Medio de cultivo incompleto (MC1). El MEMD fué suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y N-2-hidroxietil piperazina ácido N-2-etanosulfónico (HEPES), para

obtener una concentración final de 0.24 M y 0.08 M respectivamente. El pH se ajustó a 7.2-7.4 con NaOH o HCl 0.2 M y se esterilizó por filtración en membrana Millipore de 0.22 μ , conservándose a 4°C para su uso posterior.

B) Medio de cultivo completo (MMC). Cada 100 ml de medio contenían:

- 1 ml de piruvato de sodio 100 mM (Gibco 100X)
- 1 ml de L-glutamina 200 mM (Gibco 100X)
- 1 ml de aminoácidos esenciales 10 mM (Gibco 100X)
- 1 ml de una mezcla de penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 g/ml)
- 15 ml de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) previamente inactivado a 56°C durante 30 min
- 50 μ l de una solución de 2-mercaptoetanol (2-ME) 5×10^{-5} M.

C) Medio de cultivo completo con hipoxantina, aminopterina y timidina. (HAT)

El medio HAT se preparó añadiendo una mezcla de hipoxantina-timidina (HT) y aminopterina 1X que se elaboraron de la siguiente manera: La hipoxantina (hidroxipurina, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) a una concentración de 10×10^{-2} M se disolvió en NaOH 1N y la timidina (Sigma) a una concentración de 1.6×10^{-3} M en agua destilada. Se combinaron volúmenes de 100 ml de cada una de las soluciones y se aforaron a 300 ml. El pH se ajustó a 9.5 y se esterilizó por filtración a través de

membranas Millipore de 0.45μ conservándose a -20°C .

La aminopterina (ácido fólico-4-amino, ácido glutámico-4-aminopterol) (Sigma) se preparó a una concentración de 4×10^{-7} M y se disolvió con NaOH 1N. El pH de la misma se ajustó a 7.5-7.8 con ácido acético 1N. Se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore de 0.45μ y se conservó protegida de la luz a -20°C .

Solución de 8-Azaguanina.

La solución de 8-Azaguanina (8-Aza) (2-amino-6-oxi-8-azapurina) (Sigma) se preparó a una concentración final de 10^{-4} M, se disolvió en baño María a 37°C por adición de NaOH 1M. El pH se ajustó a 9.0 con ácido acético 1N. La esterilización se hizo por filtración en membranas Millipore de 0.22μ y se conservó a -20°C .

Preparación de polietilenglicol.

El polietilenglicol (PEG) de peso molecular 1000 (Sigma), se fundió y se esterilizó en autoclave durante 30 min a 15 libras de presión. Se mantuvo líquido en baño María a 50°C y se mezcló con un volumen igual de MCI. El PEG al 50% se conservó a -20°C .

Células tumorales.

Para la hibridización se usaron células de la línea tumoral Sp2/0-Ag-14 desarrolladas por Schulman y col. (64). Esta lí-

nea no sintetiza cadenas de inmunoglobulina, es resistente a 20 g/ml de 8-Aza; sin embargo, muere en medio suplementado con HAT. Las células tumorales se conservaron a -70°C y antes de su uso se descongelaron en baño María a 37°C , se resuspendieron en MMC y se mantuvieron durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron por centrifugación a 250 g durante 25 min y se resuspendieron en MCC con 8-Aza, verificándose su viabilidad con azul tripano al 0.4% (Gibco) (7).

Las células se distribuyeron en alícuotas de 5 ml en botellas de plástico estériles de 30 ml (Falcon/division, Oxnard, CA) y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 . Cada dos días se cultivaron a una concentración de 5×10^4 células/ml en 5 ml y 48 h antes de la fusión se tomó 1 ml de la concentración anterior y se llevó a 10 ml.

Obtención de linfocitos de ratón para la formación del híbrido.

Para la producción del híbrido se sacrificaron por dislocación cervical dos ratones inmunizados con DNP-KLH. Los bazos se obtuvieron asépticamente, se colocaron en una caja de Petri estéril de 60 x 15 mm (Falcon) que contenía aproximadamente 10 ml de MCI y se disgregaron con agujas de 25 x 16 mm. Estas células se transfirieron a un tubo de plástico estéril de 12 ml (Falcon) y se dejaron a 4°C durante 10 min. Posteriormente, el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo con el fin de eliminar las partes gruesas del macerado. La suspensión celular se lavó por centrifugación a 175 g a 5°C durante 8 min. Con la fi

nalidad de eliminar los eritrocitos presentes en la suspensión, las células se resuspendieron en 5 ml de un amortiguador de TRIS con NH_4Cl 0.8%, pH 7.2 y se mantuvieron a 4°C durante 10 min. En seguida se lavaron con MCI a 175 g durante 8 min a 4°C. Finalmente se resuspendieron en MCC y se determinó el número de células viables.

Fusión.

Para la fusión de las células tumorales y los linfocitos de ratón, se mezclaron 10^7 células tumorales con 10^8 células de bazo, se centrifugaron a 175 g durante 10 min y se lavaron una vez con MCC en las mismas condiciones. Al paquete celular resultante se le adicionó 0.2 ml de PEG al 50% y se agitó suavemente durante 6 min; posteriormente la mezcla se centrifugó a 125 g durante 3 min a temperatura ambiente. El paquete celular se dejó reposar durante 5 min después se resuspendió en 5 ml de MCI y se centrifugó nuevamente a 175 g durante 8 min. Las células se resuspendieron en MMC a una concentración de 4×10^5 células/ml y se distribuyeron en placas de microcultivo (Microtest II, Falcon) con una pipeta de 5 ml (Falcon), colocando dos gotas en cada pozo. Las placas se incubaron a 37°C, con atmósfera húmeda y 5% de CO_2 . A las 24 h de cultivo se añadió una gota de HAT IX cada 48 h durante una semana y a la siguiente semana las células se alimentaron con una gota de MMC. Tres días después se examinaron los cultivos en un microscopio invertido para determinar la existencia de híbridos. Los híbridos exis-

tentes se alimentaron cada 72 h con MCC y a los sobrenadantes se les determinó actividad anti-DNP.

Técnicas de detección de anticuerpos.

La actividad anti-DNP en los sobrenadantes de los cultivos, se determinó usando las técnicas de hemaglutinación indirecta o pasiva (HP) e inhibición de la hemaglutinación con DNP-Ficol1 (IH). Para el acoplamiento del TNP a los eritrocitos de certero (EC) se empleó el siguiente protocolo: Los EC obtenidos asépticamente 3 días antes de ser acoplados, se conservaron a 4°C en solución estéril de Alsever (22). Los EC se lavaron 3 veces por centrifugación a 400 g durante 10 min con un amortiguador de barbital modificado (ABM) (22). Del paquete de EC se tomó 1 ml y se añadió a un vaso con 7 ml de un amortiguador de cacodilatos 0.28 M, pH 6.9 (56) en el que previamente se disolvieron 25 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzénico sulfónico (TNP) (Eastman). La suspensión se mantuvo en agitación constante en la obscuridad durante 10 min. Posteriormente, las células se lavaron por centrifugación a 400 g durante 10 min con 35 ml de ABM frío. Se dió una segunda lavada en las mismas condiciones pero con ABM que contenía 22 mg de glicilglicina (Sigma) (39). Finalmente, se lavaron a 400 g durante 10 min. El acoplamiento de los EC al TNP se probó con un antisuero anti-TNP obtenido en borrego y previamente absorbido contra EC y descomplementado durante 30 min a 56°C.

Hemaglutinación indirecta.

En placas de hemaglutinación (Dynatech Laboratories Alexandria V.A.) se agregaron 0.025 ml de cada sobrenadante de los cultivos híbridos y 0.025 ml de EC acoplados a TNP. Las placas se incubaron a 37°C durante 60 min, se lavaron 3 veces por centrifugación a 50 g durante 3 min con ABM y a continuación se agregaron 0.025 ml de suero anti-inmunoglobulina de ratón diluido 1:6, el cual había sido previamente inactivado durante 30 min a 56°C y absorbido con EC en baño de hielo durante 60 min. Las placas se incubaron a temperatura ambiente 15 h.

Inhibición de la hemaglutinación con DNP-Ficoll.

Para probar la especificidad de los sobrenadantes de los cultivos celulares, se trató de inhibir la reacción empleándose soluciones de DNP-Ficoll a concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.12 y 7.56 µg/ml. De estas soluciones se colocaron en una placa de hemaglutinación volúmenes de 0.05 ml. A la vez, se añadieron 0.05 ml de cada uno de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos celulares de células híbridas y 0.05 ml de EC acoplados a TNP. Las placas se incubaron a 37°C durante 60 min y después se agregaron 0.05 ml de suero anti-inmunoglobulina de ratón diluido 1:6, que previamente había sido inactivado y absorbido. Finalmente las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 h.

Ya probada la actividad anti-DNP de los sobrenadantes de las células híbridas, éstas se resuspendieron y ajustaron para clo

narse.

Clonación.

La clonación se realizó por dos métodos: clonación en agar blando y clonación bajo condiciones de dilución limitante. Para la clonación en agar blando se preparó agar (Difco laboratories, Detroit, Mich.) al 2.5% en amortiguador salino fosfatos (ASF) 0.15 M, con un pH de 7.2 (22), el cual se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15 libras de presión y se mantuvo sin gelificar en baño María a 44°C. Por otra parte, los híbridos se colectaron por centrifugación y se prepararon dos concentraciones de células viables en MMC: 2.5×10^3 y 1.3×10^5 por ml que se mantuvieron en baño de hielo. Se mezclaron volúmenes iguales de agar y MMC enriquecido con 40% de SFB y se equilibraron en baño María a 44°C. De esta mezcla se distribuyó 1 ml en cada pozo de una caja de cultivo de 24 pozos (Micro Well, Falcon) y se dejó gelificar durante 10 min. Durante este tiempo se mezclaron 0.5 ml de cada una de las suspensiones celulares con 1 ml de agar-MMC 40% y se adicionó 0.6 ml a cada pozo. Las cajas se incubaron a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Después de 8 a 15 días de incubación, las clonas se separaron del agar blando por medio de una pipeta Pasteur, se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos y se incubaron en las condiciones anteriores. Los cultivos se observaron en un microscopio invertido después de 4 a 8 días, para ver si había crecimiento celular. Los pozos que mostraron cultivos con crecimiento aparente, se

ensayaron para determinar la actividad anti-DNP mediante hemaglutinación pasiva. Las clonas positivas se congelaron a -70°C . Para esto, se lavaron una vez por centrifugación a 175 g con MMC durante 8 min. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de MMC y se colocó en viales estériles de 2 ml (PRO-VIAL Cooke, Dynatech) en un volumen de 0.5 ml de células y 0.5 ml de mezcla crioscópica (42).

En el caso de la clonación por dilución limitante, se preparó un soporte de macrófagos. Para ello, 3 días antes de la clonación se incubaron 5 ratones con 3 ml de aceite mineral (Nujol, Plough de México) por vía i.p.. El día de la clonación los ratones se exsanguinaron, con el objeto de disminuir la contaminación del exudado con eritrocitos. Inmediatamente después los animales se fijaron a una placa de corcho por las cuatro extremidades y el abdomen se desinfectó con alcohol etílico al 70%. Se inocularon en la cavidad peritoneal con 3 ml de solución salina balanceada (SSB) (22) con 10 U/ml de heparina (Sigma de México), se aplicó masaje en la parte dorsal con unas pinzas durante 2 min; la piel del abdomen se separó y se practicó una pequeña incisión para extraer con una pipeta Pasteur la mezcla de SSB y la suspensión obtenida se centrifugó a 400 g durante 10 min. El sobrenadante se decantó y el paquete celular se lavó tres veces con SSB. Las células se resuspendieron en MMC, se determinó el número de células viables y la suspensión se ajustó a 2×10^5 células/ml. Las células se distribu-

yeron en cajas de cultivo de 24 pozos, en alícuotas de 1 ml en cada pozo y se incubaron 48 h a 37°C, en atmósfera de húmeda y 5% de CO₂.

Las células se ajustaron a una densidad de 10 células por ml de manera seriada a partir de una densidad de 1×10^4 células/ml. De la suspensión de 10 células se tomó 0.1 ml y se colocó en cada pozo de la caja a la cual previamente se habían adherido los macrófagos. Las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Después de 4 a 8 días de incubación se verificó que las clonas tuvieran actividad anti-DNP mediante la técnica de hemaglutinación pasiva y de las clonas positivas se eligió una para la expansión y el resto se congeló a -70°C.

Expansión.

La expansión de la clona se efectuó: in vivo e in vitro. Para la expansión in vitro se cultivaron 100 ml de células a una densidad inicial de 3×10^5 células/ml, en botellas de 30 ml a 37°C, con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. A los 8 días de incubación, las células se colectaron por centrifugación a 250 g durante 10 min, se subcultivaron de igual manera y el sobrenadante se conservó a -20°C para la ulterior purificación del anticuerpo.

La expansión in vivo se hizo en ratones a los cuales se les inyectó por vía i.p. 0.5 ml de Pristan (2,6,10,14-tetrametilpentadecano, Aldrich, Milwaukee, Wis.). Después de 23 días se les

inocularon 3×10^4 células y a los 18 días se sangraron para comprobar la presencia de anticuerpos en circulación mediante hemaglutinación. Los animales desarrollaron 7 días después líquido de ascitis, el cual se extrajo por drenado de la cavidad peritoneal. El líquido se mantuvo en frío durante 30 min y se centrifugó a 400 g durante 10 min. El sobrenadante se conservó a -20°C para la purificación posterior de los anticuerpos.

Purificación de los anticuerpos.

Se utilizaron diferentes técnicas para la purificación de los anticuerpos, las cuales se enuncian a continuación: A) Precipitación de inmunoglobulinas tanto de los sobrenadantes de cultivo como del líquido de ascitis. Las inmunoglobulinas se precipitaron con una solución saturada de sulfato de amonio (SSA), para lo cual se mezclaron volúmenes iguales de cada muestra con SSA a pH 6.5; se incubaron con agitación constante durante 60 min a 4°C . Las mezclas se centrifugaron a 5900 g durante 10 min. Los precipitados se resuspendieron 1:20 con respecto al volumen original en agua destilada y se dializaron durante 3 h contra agua destilada; después durante 24 h contra ASF 0.01 M, pH 7.2 (22) y por último con SSI hasta que los precipitados estuvieran libres de iones sulfato, lo cual se corroboró mediante la adición de cloruro de bario al 10% y HCl diluído a una alícuota del dializado. Finalmente, se determinó la concentración de proteína por lectura de D.O. a 280 nm. B) Absorción de los anticuerpos con actividad anti-DNP a DNP-lisina acoplada a Sefa

rosa 4B (Pharmacia, Piscataway, NJ.). Únicamente se procedió a la absorción con Sefarosa 4B, de los anticuerpos presentes en la muestra procedente de líquido de ascitis. Para ello, a la Sefarosa 4B previamente activada (40) y acoplada a DNP-lisina (57) se le adicionó la muestra y se incubó en la oscuridad durante 15-18 h a la temperatura ambiente y con agitación constante. A continuación la Sefarosa se filtró en un embudo Büchner "C" y el filtrado se recuperó para corroborar la inexistencia de anticuerpos con actividad anti-DNP mediante doble inmunodifusión (DID) (63) y hemaglutinación. Posteriormente la Sefarosa-anticuerpo se lavó con BSF 0.01 M, pH 7.2, hasta eliminar las proteínas absorbidas inespecíficamente a la Sefarosa, comprobándose esto mediante la lectura de la D.O. a 280 nm.

La separación del conjugado DNP-anticuerpo de la Sefarosa se hizo eluyendo el anticuerpo de la Sefarosa con una solución de DNP 10^{-2} M. Para ello se incubaron la Sefarosa-anticuerpo con 50 ml de solución de DNP 10^{-2} M durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación suave y en la oscuridad. En seguida se filtraron en un embudo Büchner "C" y se lavaron con 50 ml de la misma solución. El filtrado se concentró 10 veces por ultrafiltración con amicon (Membrane DIAFLOX M 100 000 MW, AMICON Corp. Lexington MASS) y se determinó la concentración de proteína mediante el método de Lowry y col (37). C) Separación de los anticuerpos del DNP mediante cromatografía en columna de intercambio iónico con DOWEX I. Para la separación de los anticuer-

pos del hapteno se utilizó una columna de 1.7 x 30 cm en la cual se empacó DOWEX I (1 x 8400 chloride form, Sigma) previamente hidratado. La resina se lavó con 250 ml de acetato de sodio al 10% y posteriormente con agua destilada hasta el pH del agua. Finalmente, se lavó con ASF 0.01 M, pH 7.2, hasta tener en el eluido el pH del amortiguador (7.2). La muestra se pasó por la columna y se eluyó con el mismo amortiguador, colectando se fracciones de 3 ml. Por último, se determinó la concentración de proteína y DNP presentes en las fracciones mediante lectura de D.O. a 280 y 360 nm respectivamente. Las alícuotas que contenían los anticuerpos se mezclaron y concentraron por ultrafiltración con Amicón. Posteriormente se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry y col. (37) y la actividad anti-DNP por hemaglutinación y DID.

Caracterización de los anticuerpos.

Después de la separación del hapteno DNP de los anticuerpos, se analizaron éstos últimos mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida en condiciones reductoras (ER) con duodecil sulfato de sodio (DSS) al 10% (72). Por otra parte, para determinar el tipo de inmunoglobulina producida por la clona expandida, se empleó la técnica de DID y el uso de sueros liofilizados anti-inmunoglobulinas de ratón (Miles Laboratories Inc. Elkhart, Indiana) producidos en conejo contra las clases IgM, IgA e IgG y las subclases de IgG correspondientes a IgG₁, IgG₂, IgG_{2b} e IgG₃.

Finalmente, se analizaron los anticuerpos obtenidos para determinar la naturaleza homogénea de los mismos, mediante la técnica de isoelectroenfoque (IEE) (34,43).

Anticuerpos del Mieloma MOPC-315.

En los experimentos de fijación se usó, paralelamente a la Ig producida por hibridoma, otra Ig homogénea producida por un mieloma de ratón. Esta proteína es de la clase A y también fija DNP (18) y fué un obsequio del Dr. Israel Pecht del Weismann Institute of Science, Israel.

Preparación de la solución de hapteno ξ -3-4-³H-2,4-dinitrofenil L-lisina.

Se usó una solución de ³H-DNP-lisina (New England Nuclear, Mass) con actividad específica de 3.4 Ci/mMol y se hicieron diluciones para obtener diferentes concentraciones de hapteno. Tabla I. La radiactividad total se estimó en cada una de las soluciones poniendo en un vial (frasco de polietileno) 50 μ l de cada solución y agregándose 10.0 ml de Bray (naftaleno 60 g; PPO 4 g; POPOP 0.2 g; metanol 100 ml; etilenglicol 20 ml; dioxano llevar a 1 lt; la radiactividad se determinó en un contador de centelleo Nuclear Chicago Mark II.

Determinación de las constantes de afinidad.

Tanto al anticuerpo obtenido de mieloma (IgA) como al producido por el método de hibridación (IgG₃) se les determinó la constanta

T A B L A I

CARACTERISTICAS DE LAS SOLUCIONES DE DNP-LISINA UTILIZADAS EN
LOS EXPERIMENTOS DE FIJACION DE DNP-LISINA POR ANTICUERPOS ANTI
DNP

Concentración molar total de ^3H -DNP-lisina	CPM	DPM	Eficiencia
5.90×10^{-5}	3.62×10^6	2.22×10^7	16.30
2.95×10^{-5}	1.98×10^6	1.11×10^7	17.83
1.47×10^{-5}	9.84×10^5	5.55×10^6	17.72
7.35×10^{-6}	4.98×10^5	2.77×10^6	17.97
3.67×10^{-6}	2.41×10^5	1.38×10^6	17.37
1.83×10^{-6}	1.23×10^5	6.93×10^5	17.74
9.10×10^{-7}	5.76×10^4	3.46×10^5	16.64
4.55×10^{-7}	2.95×10^4	1.73×10^5	17.05
2.27×10^{-7}	1.47×10^4	8.67×10^4	16.95
1.38×10^{-7}	8.00×10^3	4.33×10^4	18.47
6.90×10^{-8}	3.67×10^3	2.16×10^4	16.99
3.95×10^{-8}	1.93×10^3	1.08×10^4	17.87
			$\bar{X} = 17.408$

CPM = Desintegraciones por minuto reales
DPM = Desintegraciones por minuto teóricas
Eficiencia = CPM/DPM
 \bar{X} = Eficiencia promedio

te de afinidad promedio (K_0) por el método de apagamiento o extinción de la fluorescencia (70), de acuerdo a la técnica descrita por Eisen y McGuigan (19).

Este método se fundamenta en que las moléculas de anticuerpo presentan fluorescencia (debido principalmente a los residuos de triptofano) cuando son irradiadas con luz ultravioleta a 295 nm de longitud de onda, emitiendo luz cuyo máximo de intensidad se encuentra a 345 nm aproximadamente. Cuando el ligando (DNP) se haya unido específicamente a la molécula de anticuerpo, la energía radiante emitida por los residuos de triptofano del (o cercano al) sitio activo es transferida intramolecularmente al ligando unido, dada su cercanía y orientación espacial. El ligando puede liberar energía absorbida de varias maneras (vibración, emisión a longitud de ondas mayores, etc.). El resultado final de estos procesos es que la fluorescencia de los anticuerpos se ve disminuída (apagada) en proporción directa a la cantidad de ligando que tenga unido.

Si conocemos el por ciento de la fluorescencia inicial que se apaga cuando todos los sitios activos están saturados (Q_{MAX}), podremos determinar, para cada concentración de hapteno (H_t), la cantidad (B), que se encuentra unida a los anticuerpos, conociendo así el por ciento de la fluorescencia inicial apagada (Q). La concentración de hapteno libre (H) se calcula restando a la concentración de hapteno total la concentración de hapteno unido ($H = H_t - B$). De esta manera, conociendo la concen

tración de hapteno (H) y la fracción de los sitios activos que se encuentran ocupados ($r = B/S_0 = Q/Q_{Max}$), podemos calcular para cada punto, los parámetros de la ecuación de Hill y la de Scatchard (13,62). A partir de la gráfica de Hill, podemos calcular la constante de afinidad K_0 y el coeficiente de Hill (C.H.) para homogeneidad de los anticuerpos.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro 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 (22°C). Las longitudes de onda de excitación y de emisión usadas fueron 280 y 355 nm respectivamente. Se colocaron en la celda 1.5 ml de una solución de anticuerpos de concentración conocida (0.08 mg/ml aproximadamente) en ASF y se registró la fluorescencia cuando alcanzó un valor estable. Las muestras sólo se expusieron a la luz excitadora en el momento de hacer las lecturas. Progresivamente se adicionaron volúmenes pequeños de concentraciones conocidas de hapteno (0.005 ml) en el mismo solvente. Después de cada adición de hapteno, se agitó y se registró la fluorescencia antes de hacer la siguiente adición, hasta completar un volumen de 0.120 ml.

El valor de Q_{Max} se determinó añadiendo una solución de hapteno lo suficientemente concentrada para saturar los sitios activos de la globulina en estudio, midiendo el apagamiento y haciendo una corrección para determinar el apagamiento debido al hapteno

libre. Para hacer esta corrección se añadió a una solución de inmunoglobulinas inespecíficas la misma concentración de hapteno. Esta corrección por el apagamiento debido al hapteno libre se hizo para cada uno de los puntos de la titulación.

Para comprobar que el efecto observado no era producto de una cinética y además que las lecturas correspondientes para cada punto eran leídas al tiempo adecuado, se midió el efecto de la concentración media de hapteno en una solución de anticuerpos de concentración conocida (0.08 mg/ml) a diferentes tiempos (0 hasta 3h).

A cada valor de fluorescencia se le restó la fluorescencia de un blanco de solvente y se multiplicó por la fracción de incremento de volumen (Volumen final/Volumen inicial) para corregir el descenso en la fluorescencia debido a la dilución de la muestra. Los valores se normalizaron dando el valor de 100% de la fluorescencia inicial ya corregida.

El apagamiento (Q) para cada concentración de hapteno, se determinó restando de 100 el valor de la fluorescencia corregida y normalizada. La fracción de sitios activos que están ocupados en cada punto, es igual a la fracción de apagamiento obtenido ($r = Q/Q_{\text{Max}} = P/S_0$). La concentración de ligando unido (P) se calculó multiplicando la fracción de sitios activos ocupados (r) por la concentración total de sitios activos (S_0), la cual corresponde a dos veces la concentración molar de proteína. En este caso, dado que los anticuerpos fueron IgG de ratón

(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 dos.

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

$$F_o = \text{fluorescencia inicial} = 95$$

$$F_B = \text{fluorescencia del blanco de solvente} = 2$$

$$\text{Volumen inicial} = 1.5 \text{ ml}$$

$$\text{Concentración de anticuerpo} = 0.08 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Adiciones de hapteno: } 0.005 \text{ ml de una solución } 1.6 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$Q_{\text{Max}} = 50$$

$$F_1 = \text{fluorescencia después de la primera adición de hapteno} = 93$$

$$(F_1 - F_B) \times 1.505/1.5 = F_{1c} = 91.273$$

$$(F_o - F_B) \frac{100\%}{F_{1c}} = F_{1n} = \frac{91.273 \times 100}{93} = 98.1\%$$

$$Q = 100 - F_{1n} = 100 - 98.1 = 1.9\%$$

$$r = Q/Q_{\text{Max}} = 1.9/50 = 0.034$$

$$P = r \times S_o = r \times \frac{(0.08 \times 2)}{(160\ 000)} = (0.034) \times (1.0 \times 10^{-6}) = 3.4 \times 10^{-8} \text{ M.}$$

$$H_t = \frac{(1.6 \times 10^{-5} \times 0.005)}{1.505} = 5.3 \times 10^{-8}$$

$$H = 5.3 \times 10^{-8} - 3.4 \times 10^{-8} = 1.9 \times 10^{-8} \text{ M.}$$

Es decir, en este caso, tendríamos 1.9×10^{-8} M de ligando libre (H) y 3.4×10^{-8} M de ligando pegado a anticuerpo (B).

Método de ajuste y simulación.

Las constantes de asociación K_1 y K_2 fueron calculadas por un método iterativo de ajuste, utilizando la regresión de pegado sobre ligando libre. K_1 y K_2 representan las constantes de asociación paso a paso para el sitio primero y segundo respectivamente (21). El ajuste se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación (59):

$$B = \frac{K_1 A_0 (H) + 2K_1 K_2 A_0 (H)^2}{1 + K_1 (H) + K_1 K_2 (H)^2} \quad (7)$$

Donde B y H representan la concentración total de ligando pegado y ligando libre y A_0 la concentración molar de anticuerpo. Los valores de K_1 , K_2 y A_0 fueron secuencialmente modificados hasta que la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores de B experimentales y los valores de B calculados de la ecuación fueron llevados al mínimo. Las primeras conjeturas para el proceso de ajuste se calcularon de la constante de asociación promedio (K_0) que se estimó de una gráfica de Sips de los puntos experimentales. Una curva simulada se trazó utilizando los valores obtenidos del proceso de ajuste en un trazo de Scatchard junto con los puntos experimentales. La curva simula

da se trazó de acuerdo a la siguiente ecuación (59):

$$H = \frac{B_t - A_o + [(A_o - B_t)^2 + 4K_2/K_1 B_t (2A_o - B_t)]}{2K_2 (2A_o - B_t)} \quad (8)$$

la cual se obtuvo de la ecuación (7), resuelta para H y tomando el signo positivo de la raíz cuando $H = 0$ y cuando $B = 0$. Los valores para H se calcularon para cada valor de B y la relación B/H se graficó contra los valores de B. Es importante hacer notar que K_1 y K_2 en este modelo corresponden a las constantes de asociación secuenciales, las cuales difieren de la constante de asociación intrínseca por un factor estadístico. De aquí, si no hay interacciones los sitios son idénticos con respecto a su afinidad intrínseca por el hapteno, entonces $4K_2 = K_1$ ó $\beta = 4K_2/K_1$. Si $\beta > 1$ implica cooperatividad positiva y $\beta < 1$ implica cooperatividad negativa.

Diálisis en equilibrio.

Este modelo está basado en la impermeabilidad de una membrana de diálisis (celulosa) a una macromolécula y a la difusión libre de un ligando (molécula pequeña) a través de la membrana (76). En esencia, el método consiste en poner en un compartimento un volumen de proteína de concentración conocida separado de otro por medio de una membrana semipermeable y en el cual se coloca un volumen de ligando de concentración conocida. Tanto la proteína como el ligando se encuentran en el mismo solven

te. Cuando la diálisis ha alcanzado el equilibrio se miden las concentraciones de ligando en ambos compartimentos. En el equilibrio la concentración de ligando libre en el lado de la cámara que contiene la proteína es igual al que se encuentra en la otra cámara que no tiene proteína.

El valor de la concentración en la cámara sin proteína representa el ligando libre en equilibrio y el valor en la otra cámara representa el ligando total o sea, el que se ha pegado en la proteína y el que se encuentra libre. En la ecuación (1) la concentración molar de ligando libre la representamos por (H) y la concentración molar de ligando pegado por (B). Una serie de estos pares de valores es obtenida para un rango apropiado de ligando, entonces los datos pueden ser tratados de manera que su trazado nos de una curva de fijación.

Puesto que las moléculas de proteína constituyen una especie cargada no difusible, la difusión de especies iónicas entre las cámaras está sujeta al efecto de Donnan. En la práctica este efecto es reducido a un valor despreciable en soluciones isotónicas, las cuales son usadas normalmente en el manejo de anticuerpos. En general, una fuerza iónica de 0.1 es suficiente para hacer insignificante el efecto de Donnan.

El tiempo requerido para alcanzar el estado de equilibrio varía con la temperatura, la naturaleza del ligando y la distribución de éste entre las formas libres y pegadas. El tiempo mínimo en alcanzar el equilibrio puede ser determinado dializando soluciou

nes de ligando contra el solvente y midiendo sus concentraciones en ambos lados de la membrana en función del tiempo. Períodos largos son generalmente convenientes para asegurar que se alcanzó el equilibrio.

Es necesario trabajar con bajas concentraciones de ligando porque las concentraciones usadas de proteína son pequeñas. Si la concentración de ligando excede grandemente la concentración de proteína, la concentración de ligando pegado necesariamente será baja en relación a la concentración de ligando total y la diferencia de concentraciones en uno y otro lado de la membrana será pequeña para medirla con exactitud. Por lo anterior la concentración de ligando debe ser del mismo orden de magnitud o menor que la concentración de proteína. Por esta razón, para diálisis en equilibrio generalmente se usan ligando radiactivos o que absorban fuertemente en la región visible. Además, este método está limitado para ligandos que sean lo suficientemente pequeños para difundir libremente a través de la membrana; también la proteína está sujeta a un límite determinado en cuanto a su tamaño.

Para determinar la concentración apropiada de anticuerpo a utilizar, se hicieron inmunodifusiones dobles en agar con la globulina anti-DNP diluída hasta 1:128 y las diferentes diluciones del DNP-KLH, de 1:2 hasta 1:32 (Fig. 1).

Por medio del método de diálisis en equilibrio, se calcularon los estimados de ligando libre y pegado, necesarios para deter

F I G U R A 1

En esta figura se muestran las doble inmunodifusiones en agar de la inmunoglobulina anti-DNP (IgG_3) diluída 1:128 y las diferentes diluciones del DNP-KLH, de 1:2 hasta 1:32.



A



B



C



D



E



F



G

FIGURA 1

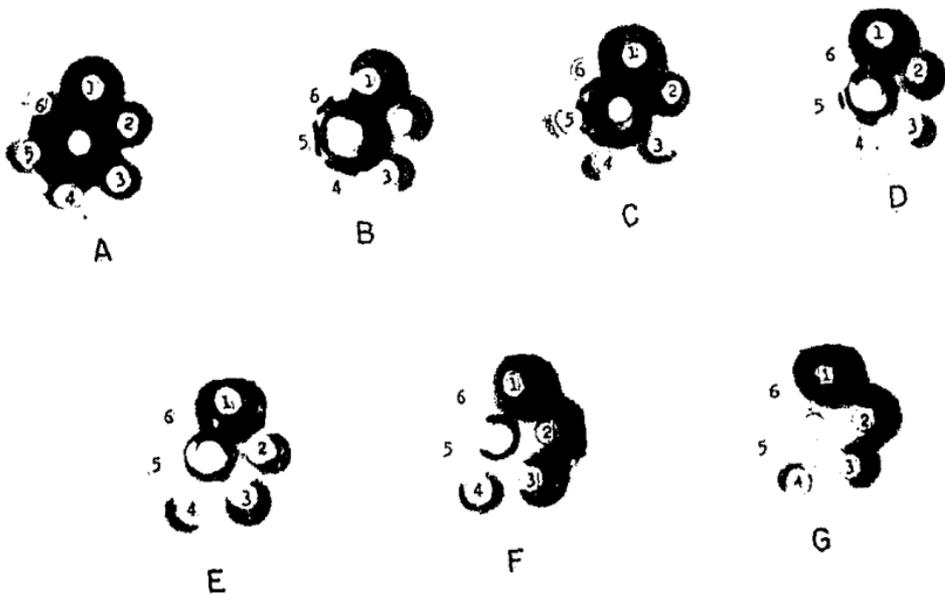


FIGURA 1

minar las constantes de asociación y el número de sitios de fijación, para la reacción específica hapteno-anticuerpo. Los experimentos se realizaron en un aparato de multidiálisis (Fig. 2) fabricado en el centro de instrumentos de la U.N.A.M. el cual consta de 3 módulos de lucita, con 3 cámaras de diálisis por módulo. La diálisis en equilibrio se lleva a cabo de la siguiente manera:

(1) Lavado y preparación de equipo. Los módulos de lucita se colocan en un recipiente y se dejan lavando al chorro de agua de la llave durante 2 días después de cada experimento para eliminar residuos radiactivos. Después se hacen varios cambios de agua destilada y por último se enjuagan con agua bidestilada desionizada y se secan con aire.

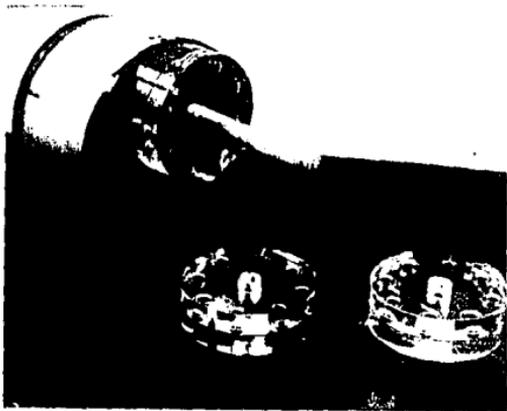
Las membranas de diálisis se hierven tres veces con agua destilada cambiando el agua después de cada ebullición.

Para montar los módulos primero se les pone a los empaques una capa delgada de Silicón (Sigma) y a las membranas se les quita el exceso de agua con una gasa y se colocan entre cada módulo. Por último se ponen los tres módulos en el aparato.

(2) Colocación de las soluciones. Cada cámara de diálisis tiene un orificio de cada lado de la membrana por donde se inyecta la muestra con una jeringa automática de volumen constante (Hamilton, Reno, NV.). De una solución de proteína 1:64 (0.07 mg/ml) se inyectaron 100 μ l en uno de los lados de cada una de

FIGURA 2

La Figura 2 muestra un aparato multodializador. En la Figura (a) se observa el motor y el eje donde van montados los 3 módulos de lucita, apareciendo 2 de ellos y la membrana de celulosa sobre la mesa y un módulo instalado. También se ven las 8 cámaras para diálisis que tiene cada módulo. En la Figura (b) se observan los 2 orificios de una de las cámaras de diálisis por las cuales se inyecta la muestra. La membrana de celulosa separa un compartimento de otro.



(a)



(b)

las cámaras del multializador, mientras que en el otro lado se coloca el mismo volumen de las soluciones de ligando (^3H -DNP-lis). Los orificios de las cámaras se tapan con cinta adhesiva. Los estudios se hacen por duplicado. El aparato se coloca en un cuarto frío a 4°C y se agita automáticamente. La diálisis se prolonga de 70 a 80 h para asegurar que alcance el equilibrio.

(3) Toma de la muestra. Con la jeringa automática se toman 50 μl de cada lado de las 24 cámaras comenzando del lado del ligando de concentración más baja y después, del lado de la proteína empezando con la solución que está en contacto con la del ligando más diluida. Cada una de las muestras se ponen en un vial y se agregan 10 ml de líquido de Bray, se agitan y se cuentan.

Del lado donde no hay proteína se obtienen las cuentas por minuto (CPM) del ligando libre (H) y del lado donde hay proteína se obtienen las CPM del ligando pegado (B) a la proteína haciendo una resta del libre, es decir:

$$[(B) + (H)] - (H) = (B)$$

Las concentraciones molares se obtienen por la fórmula:

$$(H) \text{ o } (B) = \text{CPM} \times 1/60 \times 1/\text{actividad específica} \times 1/\text{eficiencia} \\ \times \text{volumen de un litro/volumen de la muestra.}$$

RESULTADOS

Cinética de respuesta a DNP de los ratones inmunizados con DNP-KLH

Para determinar en los ratones inmunizados con DNP-KLH la presencia del mayor número de CFA producidas contra DNP y definir por este medio el día más propicio para llevar a cabo la fusión, se realizó una cinética de respuesta a DNP los días 3, 5 y 8 posteriores a la inmunización. Para cada determinación se emplearon 3 ratones inmunizados por vía i.p., con una dosis de 500 μ g de DNP-KLH en 0.2 ml de SSI y ACF (v/v) y tres ratones normales, a los cuales se les determinó el número de CFA por el método de la hemólisis localizada en gel. Como puede verse en la Fig. 3 entre los días 3 y 5 se presentó un mayor número de CFA; por consiguiente se eligió el día 4 después de la última dosis inmunizante para llevar a cabo la fusión.

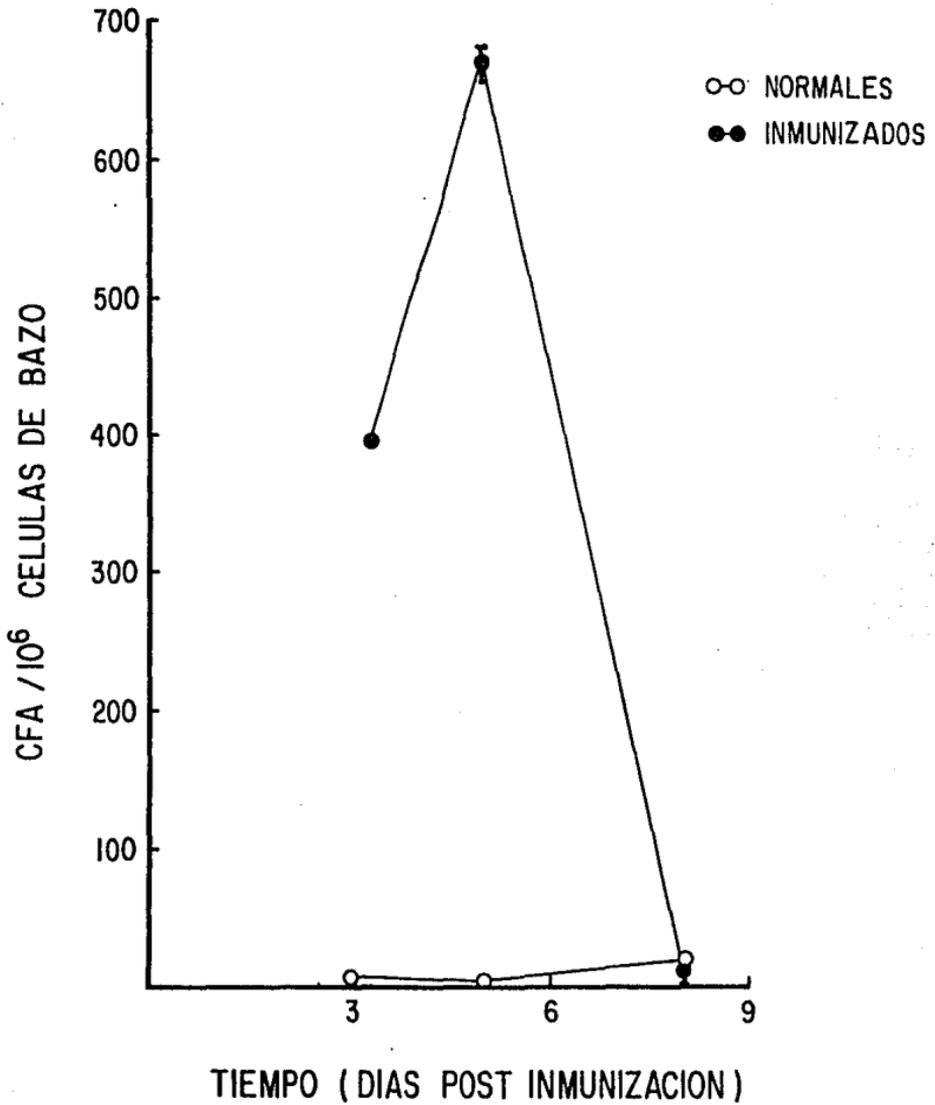
Fusión.

Se cultivaron 5×10^7 células de bazo de ratones inmunizados, en volúmenes de 5 ml en MCC que contenía 100 μ g/ml de lipopolisacárido (LPS) de Escherichia coli, durante 24 h. Al transcurrir este tiempo se fusionaron las células de bazo con las células tumorales, en presencia de PEG y fueron cultivadas a una concentración de 4×10^5 células/ml. Después de 15 días de la inducción de la fusión, se hizo aparente la presencia de colonias de híbridos, las cuales aparecieron en 72 de los 109 cultivos, lo que equivale a un 65% de cultivos con colonias de híbridos. Los so-

F I G U R A 3

Cinética de la respuesta a DNP determinada mediante la técnica de hemólisis localizada en gel, en 3 ratones normales y 3 ratones inmunizados con 3 dosis de DNP-KLH. Se presentan CFA promedio determinadas con GRC acoplados a TNP menos CFA determinadas con GRC normales.

FIGURA 3



sobrenadantes de todos los pozos con crecimiento visible, se ensayaron para detectar la presencia de actividad anti-DNP mediante hemaglutinación pasiva. La frecuencia de detección de hibridomas positivos fué de 38 que corresponde a un 34.86%.

Clonación.

Una vez que se detectaron los hibridomas positivos, se determinó la viabilidad de las células de una sola colonia positiva (#26), la cual se eligió al azar. En esta colonia se obtuvo una densidad de 3.7×10^5 células/ml, a partir de la cual se efectuó una dilución semilimitante, por cultivo de 370 células en 0.1 ml, en cajas de cultivo a las cuales previamente se les había adherido una monocapa de células peritoneales obtenidas de ratón. Ocho días después los sobrenadantes de 50 cultivos se ensayaron por HP y de ellos 36 fueron positivos en su respuesta a DNP. Al probarse estos mismos por IH con DNP-ficoll, 11 resultaron francamente positivos a DNP. De estos 11 cultivos, 7 fueron clonados por la técnica del agar-blando. Tabla II .

Por otra parte, se tomó la colonia número 32 de los 36 que fueron inicialmente positivos y se clonó por la técnica de la dilución limitante. En esta colonia se tuvo una densidad de células viables de 1.49×10^6 /ml, la cual se ajustó a una densidad de 1×10^4 células/ml, que se diluyó de una manera seriada hasta tener una concentración de 10 células/ml. De ésta última se cultivaron 50 pozos con una célula. Al probar la actividad anti DNP de los sobrenadantes de los 50 cultivos, 3 de ellos presentaron

TABLA II

CULTIVOS POSITIVOS EN SU RESPUESTA A DNP LOS CUALES SE CLONARON
POR LAS TECNICAS DE AGAR-BLANDO Y DILUCION LIMITANTE

Método de Clonación	N _o . de Cultivo	Células viables/ml($\times 10^{-5}$)	Células para clonar($\times 10^{-3}$)	Clonas positivas	
Dilución Semilimitante	26	3.7	3.7	36 ^a	
	31	2.5	6.0	-	
	33	2.3	6.0	3	
	34	1.8	9.0	-	
	Agar-blando ^b	35	1.0	5.0	-
		37	4.1	8.0	7
		38	5.9	9.0	8
	39	2.1	7.0	-	
Dilución Limitante	32	14.9	c	17,29,36 ^d	

- a De los 36 cultivos que resultaron positivos 7 se clonaron por la técnica de agar-blando y 1 por dilución limitante. El resto de los cultivos se congelaron.
- b Las clonas 3, 7 y 8 se expandieron in vitro y los cultivos que resultaron positivos se congelaron.
- c Se efectuaron diluciones seriadas a partir de 1×10^4 células por ml hasta tener una densidad de 10 células por ml
- d La clona 36 se expandió in vivo e in vitro. Las clonas 17 y 29 se congelaron

respuesta positiva por hemaglutinación, por lo que se eligió la clona número 32 para hacer la expansión.

Expansión.

La clona seleccionada se expandió in vitro hasta obtener una densidad celular de 3×10^5 por ml. Se obtuvieron las células y el sobrenadante. Este último mostró actividad anti-DNP, por lo que se conservó para la purificación posterior del anticuerpo. Las células se subcultivaron para la expansión in vivo.

Purificación de los anticuerpos.

La precipitación de inmunoglobulinas del líquido de ascitis y de los sobrenadantes de los cultivos celulares con SSA aportó 168 mg/ml y 5.2 mg/ml de inmunoglobulinas respectivamente. De estas inmunoglobulinas se separó la IgG por cromatografía en columna de DEAE-celulosa Fig. 4 . Las fracciones se sometieron a IEF y mostraron una sola banda que se identificó como IgG Fig. 5 .

Por otra parte, al probarse ambas fracciones por HP presentaron actividad anti-DNP con títulos de 1:128, igualmente, la actividad anti-DNP se corroboró en DID usando como antígeno de prueba al DNP acoplado a hemocianina. Con estos antecedentes se pudo proceder a la absorción de los anticuerpos anti-DNP mediante DNP-lisina acoplada a sefarosa, lo cual se hizo evidente después de incubar la muestra con la sefarosa, ya que en el filtrado no persistía actividad anti-DNP, indicando que los anticuerpos habían sido absorbidos a la sefarosa. Posteriormente se

F I G U R A 4

Perfil cromatográfico en columna con DEAE-celulosa de las inmunoglobulinas precipitadas con solución saturada de sulfato de amonio.

- A Curva de elución de las inmunoglobulinas de líquido de ascitis.
- B Curva de elución de las inmunoglobulinas de sobrenadantes de cultivo.

FIGURA 4

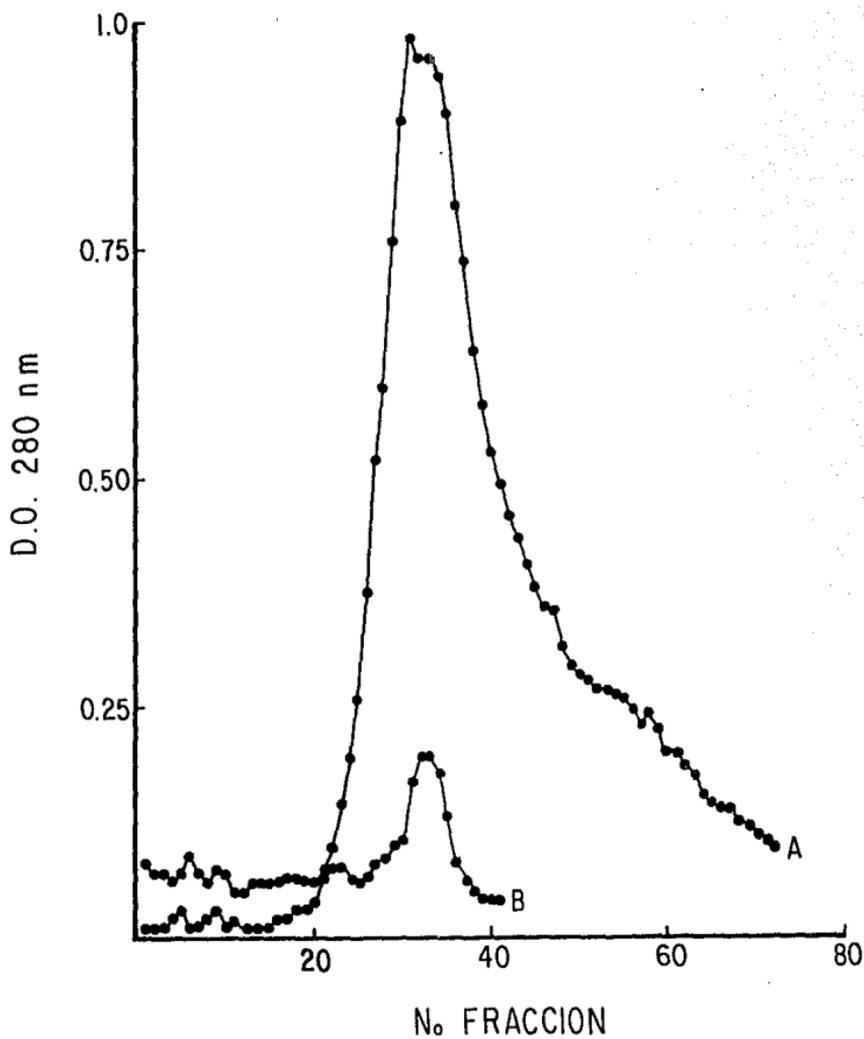
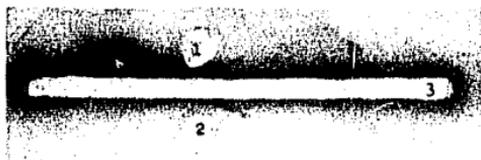


FIGURA 5

Inmunoelectroforesis de las inmunoglobulinas
obtenidas de ascitis de ratón y de sobrenadantes
de cultivo.

- 1 Inmunoglobulina de líquido de ascitis
- 2 Inmunoglobulina de sobrenadante de medio
de cultivo
- 3 Anti-IgG de ratón



efectuó la separación del conjugado DNP-anticuerpo de la sefarosa y se aisló de este conjugado el anticuerpo. Esto último se concretó al pasar el conjugado DNP-anticuerpo por una columna de cromatografía de Dowex I. La curva de elución se muestra en la Fig. 6.

Ya separados los anticuerpos del hapteno DNP, los primeros se concentraron y ensayaron para determinar la presencia de actividad anti-DNP mediante DID con DNP acoplado a diferentes acarreadores Fig. 7.

Caracterización de los anticuerpos.

Se analizaron los anticuerpos mediante ER con 2-ME en gel de acrilamida DSS al 10% Fig. 8. El producto secretado por la clona expandida presentó en todos los casos el patrón característico de una inmunoglobulina. En la ER el anticuerpo producido presentó una pureza confiable, lo cual fué corroborado mediante el empleo de técnicas más finas.

Por otra parte, mediante el empleo de antiseros contra las diferentes clases de inmunoglobulinas y DID Fig. 9, se encontró que el anticuerpo obtenido de líquido de ascitis pertenece a una inmunoglobulina de la subclase IgG₃. Finalmente, se encontró por IEE que la muestra analizada contiene anticuerpos del mismo punto isoeléctrico Fig. 10.

Apagamiento de la fluorescencia.

Se realizaron ensayos de apagamiento a cada uno de los anticuer-

F I G U R A 6

Perfil cromatográfico en columna con
DOWEX-I del conjugado DNP-anticuerpo
obtenido de líquido de ascitis.

FIGURA 6

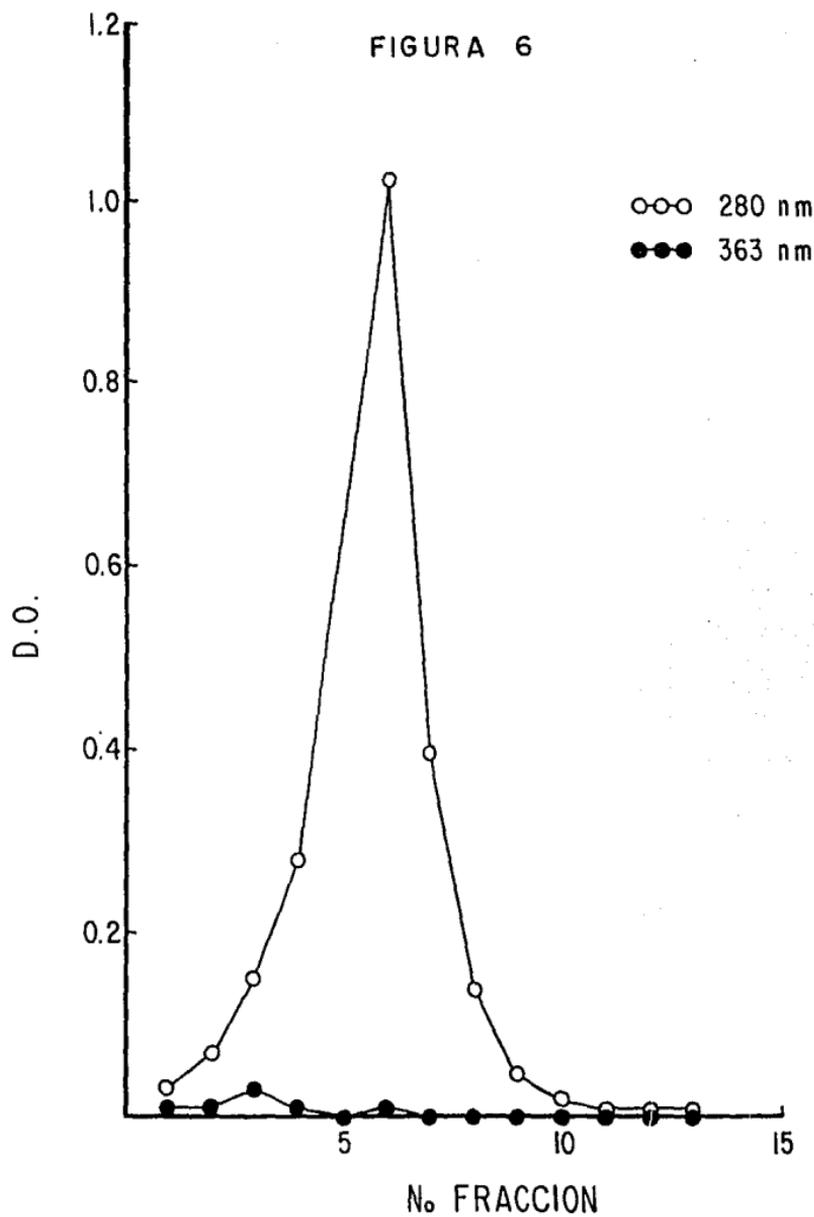
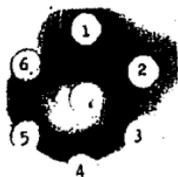


FIGURA 7

Doble inmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón (pozo central) frente a varias diluciones (1. concentrado, 2. 1:2, 3. 1:4, 4. 1:8, 5. 1:16, 6. 1:32) de diferentes acarreadores acoplados a DNP (pozos periféricos).

- a. DNP-albúmina humana (fracción V)
- b. DNP-albúmina de conejo (fracción V)
- c. DNP-gamma globulina humana (fracción II)
- d. DNP-albúmina bovina (fracción V)
- e. DNP-hemocianina (KLH)
- f. Acarreadores sin DNP (a,b,c,d y e)

FIGURA 7



A



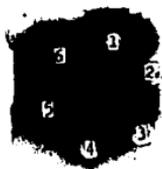
B



C



D



E



F

F I G U R A 8

**Electroforesis reductora en gel de poliacrilamida
con 2-mercaptoetanol y DSS al 10%.**

- A Patrón de pesos moleculares
- B IgG cerdo
- C Anticuerpo monoclonal control
- D {
- D' { Anticuerpo obtenido de líquido de
- D'' { ascitis purificado

- a Cadenas ligeras
- b Cadenas pesadas



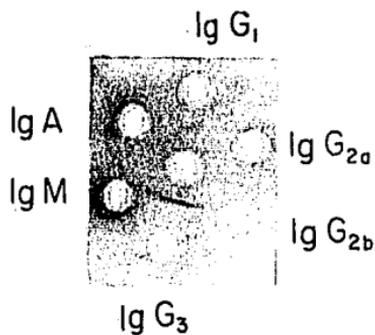
a

b

A B C D D' D''

FIGURA 9

Doble inmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón frente a antisueros de ratón producidos contra las diferentes clases de inmunoglobulinas del mismo.



F I G U R A 1 0

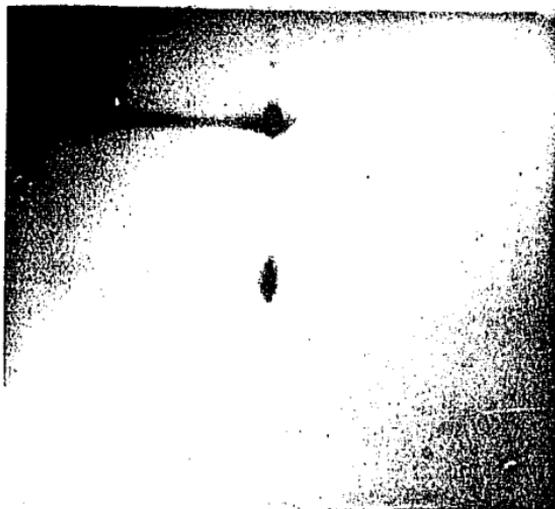
Isoelectroenfoque del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón, en condiciones reductoras.

- A Corrimiento en anfolinas de pH 3 a 10
 - B Electroforesis reductora en gel de poliacrilamida con 2-mercaptoetanol y DSS al 10%
-
- a Cadenas pesadas
 - b Cadenas ligeras



a b

A



a

b

B

cuerpos. Las Figs. 11, 12 y 13 muestran los porcentos de apagamiento de la fluorescencia en función de la concentración del hapteno presente tanto para unas γ -globulinas heterogéneas, como para la IgG_3 y la IgA . Graficando fluorescencia contra hapteno total o Q contra hapteno total se obtuvieron los valores de Q_{Max} , para el primer caso se resta del 100% el valor del punto donde la curva tiende a mantenerse o en el caso de Q vs. H_t donde la curva se tiende, esto es el valor del intercepto con las ordenadas. En las Tablas III a V se anotan los resultados de los ensayos de fluorescencia para los anticuerpos probados, así como los valores que se necesitaron para calcular los parámetros de las ecuaciones de Scatchard, Sips y Hill a partir de los valores de fluorescencia obtenidos. La IgA mostró una extinción de fluorescencia más elevado en comparación con las otras dos inmunoglobulinas probadas.

Para corroborar que las lecturas obtenidas no estaban influenciadas por el tiempo. Se midió el efecto de éste utilizando una solución de anticuerpo conocida a la cual se le agregó una concentración media de hapteno. Como puede observarse en la Fig. 14 no existe variación apreciable en los tiempos medidos (0 a 3 h).

Diálisis en equilibrio.

Por esta técnica sólo se ensayó la IgG_3 , los resultados que se muestran son de un solo experimento, aunque se hicieron varios pero con resultados muy erráticos. En la Tabla VI se muestran los valores para el cálculo de los parámetros de las ecuaciones

F I G U R A S 11, 12 y 13

En estas figuras se muestran las curvas de Apagamiento de la fluorescencia para cada uno de los anticuerpos utilizados.

- a) γ -globulinas heterogéneas
- b) IgG₃
- c) IgA

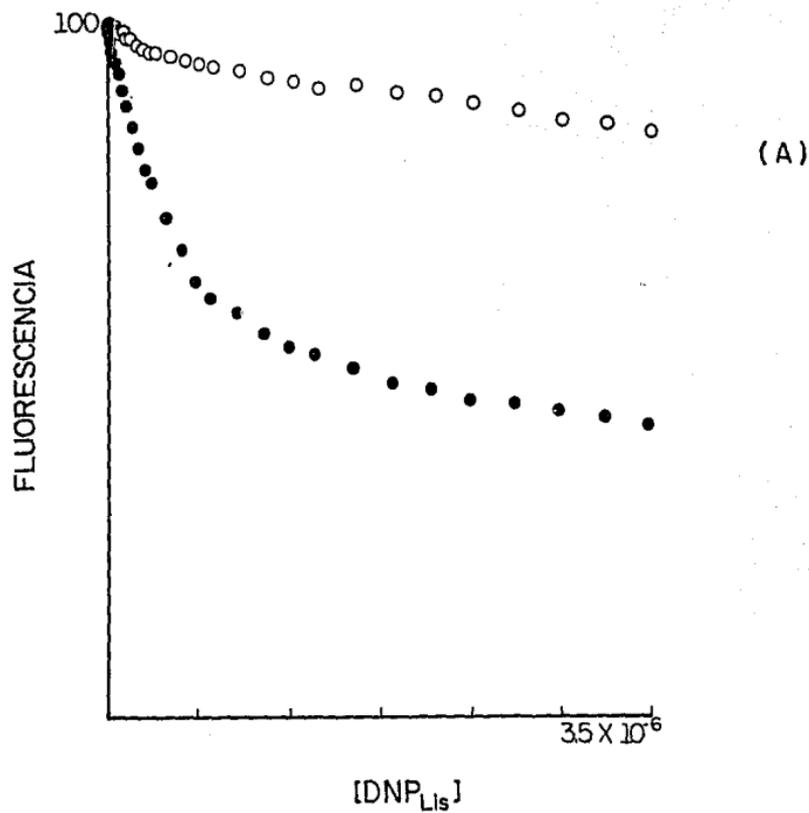


FIGURA II (Heterogeneas)

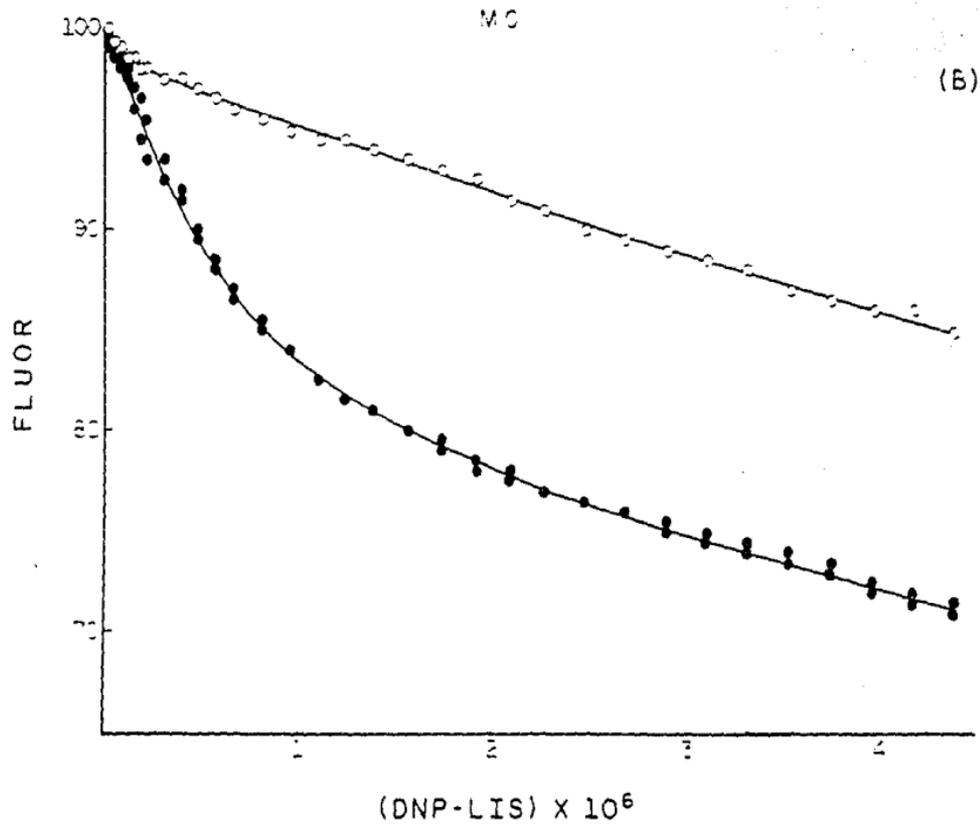


FIGURA 12 ($\lg G_3$)

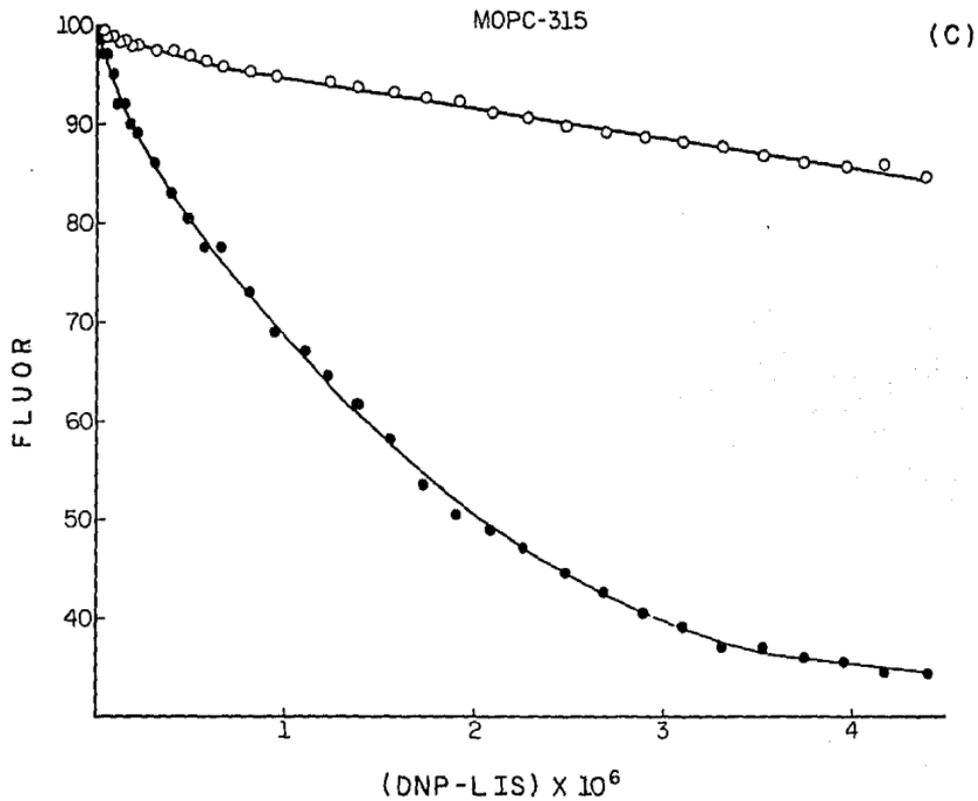


FIGURA 13 (IgA)

T A B L A III

	FB	FA	(H _{TOT})	F	Q	R	(B)	(H)	B/H	R/H	LOG H	LOG R ₁ /R
0	100.00	100.00										
14	99.00	99.00	1.13×10^{-8}	99.26	00.7975	0.0113	6.81×10^{-9}	4.52×10^{-9}	1.508	2.52×10^6	-8.34	-1.53
18	99.00	98.00	2.26×10^{-8}	98.52	1.5980	0.0283	1.36×10^{-8}	8.99×10^{-9}	1.515	2.53×10^6	-8.04	-1.63
12	98.50	96.50	3.38×10^{-8}	97.27	2.9060	0.0415	2.47×10^{-8}	9.14×10^{-9}	2.702	4.54×10^6	-8.03	-1.36
116	98.00	95.00	4.50×10^{-8}	96.01	4.2180	0.0602	3.57×10^{-8}	9.23×10^{-9}	3.873	6.52×10^6	-8.03	-1.19
120	97.5	93.50	6.46×10^{-8}	94.75	5.5360	0.0790	4.68×10^{-8}	1.77×10^{-8}	2.633	4.44×10^6	-7.75	-1.06
024	98.00	92.00	8.41×10^{-8}	93.47	6.8600	0.0979	5.78×10^{-8}	2.62×10^{-8}	2.205	3.73×10^6	-7.58	-0.96
028	97.00	89.50	1.03×10^{-7}	91.17	9.1090	0.1301	7.66×10^{-8}	2.68×10^{-8}	2.854	4.84×10^6	-7.57	-0.82
032	97.00	87.50	1.22×10^{-7}	89.37	10.8600	0.1552	9.11×10^{-8}	3.16×10^{-8}	2.882	4.90×10^6	-7.50	-0.73
036	96.00	84.50	1.58×10^{-7}	86.53	13.7400	0.1963	1.15×10^{-7}	4.34×10^{-8}	2.644	4.51×10^6	-7.36	-0.61
040	95.50	81.50	1.94×10^{-7}	83.67	12.7100	0.1816	1.06×10^{-7}	8.78×10^{-8}	1.207	2.06×10^6	-7.05	-0.65
1.044	95.00	78.50	2.29×10^{-7}	80.80	19.0200	0.2717	1.58×10^{-7}	7.09×10^{-8}	2.234	3.83×10^6	-7.14	-0.42
1.048	95.00	76.50	2.64×10^{-7}	78.95	20.6700	0.2952	1.71×10^{-7}	9.28×10^{-8}	1.849	3.18×10^6	-7.03	-0.37
0.052	94.50	71.50	3.47×10^{-7}	73.98	25.4600	0.3637	2.10×10^{-7}	1.36×10^{-7}	1.550	2.67×10^6	-6.86	-0.24
0.056	94.00	67.00	4.29×10^{-7}	69.50	29.7800	0.4254	2.46×10^{-7}	1.83×10^{-7}	1.344	2.32×10^6	-6.73	-0.15
0.060	93.50	62.50	5.10×10^{-7}	65.00	34.1400	0.4877	2.81×10^{-7}	2.29×10^{-7}	1.227	2.12×10^6	-6.64	-0.02
0.064	93.00	60.00	5.92×10^{-7}	62.56	36.4300	0.5205	2.99×10^{-7}	2.92×10^{-7}	1.024	1.77×10^6	-6.53	0.03
0.068	92.50	58.00	7.36×10^{-7}	60.63	38.2200	0.5460	3.13×10^{-7}	4.22×10^{-7}	0.741	1.29×10^6	-6.37	0.08
0.072	91.50	55.00	8.79×10^{-7}	57.64	40.7700	0.5824	3.33×10^{-7}	5.45×10^{-7}	0.610	1.06×10^6	-6.26	0.14
0.076	91.00	53.00	1.02×10^{-6}	55.69	42.6100	0.6087	3.47×10^{-7}	6.74×10^{-7}	0.515	9.02×10^5	-6.17	0.19
0.080	90.00	52.00	1.16×10^{-6}	54.77	43.5800	0.6197	3.53×10^{-7}	8.10×10^{-7}	0.435	7.65×10^5	-6.09	0.21
0.084	90.50	50.00	1.37×10^{-6}	52.80	44.9400	0.6421	3.64×10^{-7}	1.01×10^{-6}	0.359	6.33×10^5	-5.99	0.25
0.088	89.50	48.00	1.59×10^{-6}	50.82	46.8500	0.6692	3.79×10^{-7}	1.21×10^{-6}	0.312	5.51×10^5	-5.91	0.30
0.092	89.00	47.00	1.80×10^{-6}	49.88	47.6600	0.6808	3.84×10^{-7}	1.42×10^{-6}	0.270	4.79×10^5	-5.84	0.32
0.096	88.00	45.50	2.01×10^{-6}	48.41	48.7500	0.6964	3.92×10^{-7}	1.62×10^{-6}	0.241	4.28×10^5	-5.78	0.36
0.100	87.00	45.00	2.26×10^{-6}	48.00	48.7200	0.6960	3.91×10^{-7}	1.87×10^{-6}	0.208	3.71×10^5	-5.72	0.35
0.104	85.50	44.00	2.51×10^{-6}	47.05	49.5700	0.7081	3.97×10^{-7}	2.11×10^{-6}	0.188	3.35×10^5	-5.67	0.38
0.108	85.00	43.00	2.75×10^{-6}	46.10	50.1300	0.7161	4.00×10^{-7}	2.35×10^{-6}	0.170	3.04×10^5	-5.62	0.40
0.112	84.00	42.00	3.00×10^{-6}	45.14	51.0000	0.7286	4.06×10^{-7}	2.59×10^{-6}	0.156	2.81×10^5	-5.58	0.42

T A B L A IV

VI	FB	FA	(H _{TOT})	F	Q	R	(B)	(H)	B/H	R/H	LOG H	LOG R/1-R
0.000	100.0	100.0										
0.020	98.0	97.5	3.943×10^{-8}	98.8	0.51	0.0283	8.40×10^{-9}	3.10×10^{-8}	0.270	9.13×10^5	-7.51	-1.55
0.025	97.0	96.0	7.218×10^{-8}	97.6	1.03	0.0572	1.69×10^{-8}	5.53×10^{-8}	0.305	1.04×10^6	-7.26	-1.21
0.030	97.0	94.7	1.047×10^{-7}	96.65	2.32	0.1289	3.79×10^{-8}	6.68×10^{-8}	0.567	1.93×10^6	-7.17	-0.85
0.035	96.0	93.5	1.370×10^{-7}	95.68	2.60	0.1447	4.24×10^{-8}	9.46×10^{-8}	0.448	1.53×10^6	-7.02	-0.77
0.040	96.0	92.5	1.691×10^{-7}	94.97	3.64	0.2025	5.92×10^{-8}	1.01×10^{-7}	0.538	1.84×10^6	-6.96	-0.59
0.045	95.0	89.5	2.581×10^{-7}	92.19	5.79	0.3216	9.37×10^{-8}	1.64×10^{-7}	0.570	1.95×10^6	-6.78	-0.52
0.050	94.5	86.0	3.950×10^{-7}	88.87	8.99	0.4997	1.45×10^{-7}	2.50×10^{-7}	0.580	2.48×10^6	-6.60	-0.0005
0.055	94.0	85.0	4.344×10^{-7}	88.12	9.57	0.5319	1.54×10^{-7}	2.80×10^{-7}	0.549	1.90×10^6	-6.55	0.0052
0.060	93.0	82.0	5.216×10^{-7}	85.28	11.83	0.6571	1.89×10^{-7}	3.32×10^{-7}	0.571	1.98×10^6	-6.48	0.2825
0.065	91.5	78.7	6.967×10^{-7}	82.16	13.93	0.7741	2.22×10^{-7}	4.74×10^{-7}	0.469	1.63×10^6	-6.32	0.5530
0.070	90.5	76.7	8.707×10^{-7}	80.33	15.19	0.8411	2.42×10^{-7}	6.28×10^{-7}	0.385	1.34×10^6	-6.20	0.7535
0.075	89.0	74.7	1.043×10^{-6}	78.49	16.01	0.8895	2.54×10^{-7}	7.89×10^{-7}	0.322	1.13×10^6	-6.10	0.9058
0.080	88.0	73.0	1.215×10^{-6}	76.89	17.05	0.9470	2.69×10^{-7}	9.45×10^{-7}	0.285	1.00×10^6	-6.02	1.2520

Q_{max} = 18

T A B L A I V

VI	FB	FA	(H _{TOT})	F	Q	Z	(B)	(H)	B/H	R/H	LOG L	LOG N ₁ -R
0.000	100.0	100.0										
0.012	99.5	99.2	2.24 x 10 ⁻⁸	100.00	00.251	0.0139	8.58 x 10 ⁻⁸	1.88 x 10 ⁻⁸	0.4554	7.40 x 10 ⁻⁵	-7.72	-1.554
0.016	99.5	99.0	3.64 x 10 ⁻⁸	100.00	00.502	0.0279	1.71 x 10 ⁻⁸	1.93 x 10 ⁻⁸	0.8844	1.44 x 10 ⁻⁶	-7.71	-1.542
0.020	99.0	98.7	4.55 x 10 ⁻⁸	100.00	00.252	0.0140	8.58 x 10 ⁻⁸	3.69 x 10 ⁻⁸	0.2325	3.80 x 10 ⁻²	-7.43	-1.847
0.024	99.0	98.2	8.01 x 10 ⁻⁸	99.82	00.757	0.0421	2.56 x 10 ⁻⁸	5.44 x 10 ⁻⁸	0.4714	7.72 x 10 ⁻²	-7.26	-1.357
0.028	98.5	97.7	1.14 x 10 ⁻⁷	99.57	00.761	0.0423	2.57 x 10 ⁻⁸	8.88 x 10 ⁻⁸	0.2898	4.76 x 10 ⁻⁶	-7.05	-1.355
0.032	98.5	96.5	1.48 x 10 ⁻⁷	98.56	2.030	0.1128	6.84 x 10 ⁻⁸	8.04 x 10 ⁻⁸	0.8515	1.40 x 10 ⁻⁶	-7.09	-0.895
0.036	98.0	95.5	1.83 x 10 ⁻⁷	97.79	2.551	0.1417	8.58 x 10 ⁻⁸	9.72 x 10 ⁻⁸	0.8820	1.45 x 10 ⁻⁶	-7.01	-0.782
0.040	98.0	94.5	2.17 x 10 ⁻⁷	97.02	3.571	0.1984	1.19 x 10 ⁻⁷	9.71 x 10 ⁻⁸	1.2330	2.04 x 10 ⁻⁶	-7.01	-0.606
0.044	97.5	93.0	3.07 x 10 ⁻⁷	95.73	4.615	0.2564	1.54 x 10 ⁻⁷	1.53 x 10 ⁻⁷	1.0090	2.04 x 10 ⁻⁶	-6.81	-0.462
0.048	97.5	91.7	3.97 x 10 ⁻⁷	94.69	5.897	0.3276	1.96 x 10 ⁻⁷	2.00 x 10 ⁻⁷	0.9804	1.63 x 10 ⁻⁶	-6.69	-0.312
0.052	97.0	89.7	4.87 x 10 ⁻⁷	92.86	7.474	0.4152	2.48 x 10 ⁻⁷	2.38 x 10 ⁻⁷	1.0440	1.74 x 10 ⁻⁶	-6.62	-0.148
0.056	96.5	88.2	5.76 x 10 ⁻⁷	91.54	8.549	0.4750	2.83 x 10 ⁻⁷	2.92 x 10 ⁻⁷	0.9708	1.62 x 10 ⁻⁶	-6.53	-0.043
0.060	96.0	86.7	6.65 x 10 ⁻⁷	90.22	9.635	0.5353	3.19 x 10 ⁻⁷	3.45 x 10 ⁻⁷	0.9226	1.54 x 10 ⁻⁶	-6.46	0.061
0.064	95.5	85.2	8.17 x 10 ⁻⁷	88.89	10.730	0.5963	3.54 x 10 ⁻⁷	4.62 x 10 ⁻⁷	8.7667	1.28 x 10 ⁻⁶	-6.33	0.160
0.068	95.0	84.0	9.55 x 10 ⁻⁷	87.81	11.589	0.6433	3.81 x 10 ⁻⁷	5.74 x 10 ⁻⁷	0.6645	1.12 x 10 ⁻⁶	-6.24	0.226
0.072	94.5	82.5	1.09 x 10 ⁻⁶	86.46	12.760	0.7055	4.17 x 10 ⁻⁷	6.81 x 10 ⁻⁷	0.6123	1.03 x 10 ⁻⁶	-6.16	0.320
0.076	94.5	81.5	1.23 x 10 ⁻⁶	85.63	13.760	0.7643	4.51 x 10 ⁻⁷	7.83 x 10 ⁻⁷	0.5760	9.76 x 10 ⁻⁶	-6.10	0.519
0.080	94.0	81.0	1.38 x 10 ⁻⁶	85.32	13.830	0.7683	4.52 x 10 ⁻⁷	9.33 x 10 ⁻⁷	0.4843	8.22 x 10 ⁻⁶	-6.03	0.520
0.084	93.5	80.0	1.56 x 10 ⁻⁶	81.48	14.440	0.8021	4.71 x 10 ⁻⁷	1.09 x 10 ⁻⁶	0.4309	7.34 x 10 ⁻⁶	-5.96	0.608
0.088	93.0	79.2	1.74 x 10 ⁻⁶	83.90	14.780	0.8214	4.81 x 10 ⁻⁷	1.26 x 10 ⁻⁶	0.3815	6.51 x 10 ⁻⁶	-5.89	0.529
0.092	92.5	78.2	1.91 x 10 ⁻⁶	83.05	15.410	0.8559	5.00 x 10 ⁻⁷	1.41 x 10 ⁻⁶	0.3526	6.03 x 10 ⁻⁶	-5.84	0.723
0.096	91.5	77.7	2.09 x 10 ⁻⁶	82.73	15.039	0.8349	4.86 x 10 ⁻⁷	1.60 x 10 ⁻⁶	0.3026	5.19 x 10 ⁻⁶	-5.79	0.705
0.100	91.0	77.0	2.26 x 10 ⁻⁶	82.13	15.380	0.8547	4.96 x 10 ⁻⁷	1.77 x 10 ⁻⁶	0.2803	4.82 x 10 ⁻⁶	-5.75	0.760
0.104	90.0	76.5	2.47 x 10 ⁻⁶	81.80	15.000	0.8333	4.83 x 10 ⁻⁷	1.99 x 10 ⁻⁶	0.2421	4.17 x 10 ⁻⁶	-5.70	0.699
0.108	89.5	76.0	2.68 x 10 ⁻⁶	81.47	15.080	0.8580	4.84 x 10 ⁻⁷	2.20 x 10 ⁻⁶	0.2200	3.80 x 10 ⁻⁶	-5.65	0.715
0.112	89.0	75.2	2.89 x 10 ⁻⁶	80.87	15.540	0.85.8	4.95 x 10 ⁻⁷	2.40 x 10 ⁻⁶	0.2063	3.57 x 10 ⁻⁶	-5.62	0.782
0.116	88.5	74.7	3.10 x 10 ⁻⁶	80.53	15.540	0.8632	4.96 x 10 ⁻⁷	2.60 x 10 ⁻⁶	0.1907	3.31 x 10 ⁻⁶	-5.58	0.799
0.120	88.0	74.2	3.30 x 10 ⁻⁶	80.19	15.630	0.8681	4.98 x 10 ⁻⁷	2.80 x 10 ⁻⁶	0.1774	3.09 x 10 ⁻⁶	-5.55	0.818
0.124	87.0	73.7	3.52 x 10 ⁻⁶	79.85	15.230	0.8461	4.84 x 10 ⁻⁷	3.04 x 10 ⁻⁶	0.1593	2.78 x 10 ⁻⁶	-5.51	0.740
0.128	86.5	73.2	3.74 x 10 ⁻⁶	79.50	15.320	0.8510	4.86 x 10 ⁻⁷	3.25 x 10 ⁻⁶	0.1492	2.61 x 10 ⁻⁶	-5.48	0.756
0.132	86.0	72.2	3.96 x 10 ⁻⁶	78.61	15.990	0.8882	5.06 x 10 ⁻⁷	3.45 x 10 ⁻⁶	0.1465	2.57 x 10 ⁻⁶	-5.46	0.900
0.136	86.0	71.1	4.17 x 10 ⁻⁶	78.26	16.570	0.9205	5.23 x 10 ⁻⁷	3.65 x 10 ⁻⁶	0.1432	2.52 x 10 ⁻⁶	-5.43	1.064
0.140	85.0	71.2	4.39 x 10 ⁻⁶	77.90	16.189	0.8987	5.09 x 10 ⁻⁷	3.88 x 10 ⁻⁶	0.1312	2.31 x 10 ⁻⁶	-5.41	0.948
0.144	81.0	67.5	6.81 x 10 ⁻⁶	73.98	16.670	0.9259	5.23 x 10 ⁻⁷	6.29 x 10 ⁻⁶	0.0832	1.47 x 10 ⁻⁶	-5.20	1.097
0.148	77.0	64.0	9.22 x 10 ⁻⁶	70.31	16.880	0.9380	5.29 x 10 ⁻⁷	8.60 x 10 ⁻⁶	0.0608	1.07 x 10 ⁻⁶	-5.06	1.179
0.152	73.5	60.7	1.16 x 10 ⁻⁵	66.91	17.350	0.9637	5.42 x 10 ⁻⁷	1.10 x 10 ⁻⁵	0.0489	8.70 x 10 ⁻⁷	-4.95	1.421

T A B L A V

VI	PB	PA	(H _{TOT})	F	Q	R	(B)	(H)	B/H	R/H	LOG H	LOG R/R
0.000	90.0	90.0										
0.004	89.5	89.0	1.062 x 10 ⁻⁸	99.15	00.5587	0.0083	7.318 x 10 ⁻⁹	3.30 x 10 ⁻⁹	2.216	2.52 x 10 ⁶	-8.48	-2.07
0.008	89.0	88.0	2.118 x 10 ⁻⁸	98.30	1.1240	0.0167	1.468 x 10 ⁻⁸	6.50 x 10 ⁻⁹	2.258	2.58 x 10 ⁶	-8.18	-1.76
0.012	89.0	87.0	5.254 x 10 ⁻⁸	95.70	3.4090	0.0508	4.419 x 10 ⁻⁸	3.35 x 10 ⁻⁹	5.290	6.09 x 10 ⁶	-8.07	-1.27
0.016	88.5	86.0	7.935 x 10 ⁻⁸	94.83	4.0000	0.0597	5.171 x 10 ⁻⁸	2.76 x 10 ⁻⁸	1.871	2.16 x 10 ⁶	-7.55	-1.19
0.020	88.0	85.0	1.060 x 10 ⁻⁷	92.81	6.2860	0.0938	8.105 x 10 ⁻⁸	2.49 x 10 ⁻⁸	3.248	3.76 x 10 ⁶	-7.60	-0.78
0.024	87.5	84.0	1.326 x 10 ⁻⁷	91.92	7.4290	0.1109	9.553 x 10 ⁻⁸	3.70 x 10 ⁻⁸	2.577	2.99 x 10 ⁶	-7.43	-0.91
0.028	87.5	82.0	1.590 x 10 ⁻⁷	89.88	9.1950	0.1372	1.179 x 10 ⁻⁷	4.10 x 10 ⁻⁸	2.873	3.34 x 10 ⁶	-7.38	-0.79
0.032	87.5	81.0	1.852 x 10 ⁻⁷	88.93	10.3400	0.1544	1.323 x 10 ⁻⁷	5.28 x 10 ⁻⁸	2.504	2.92 x 10 ⁶	-7.27	-0.73
0.036	87.0	79.0	2.291 x 10 ⁻⁷	86.92	11.6300	0.1736	1.424 x 10 ⁻⁷	8.07 x 10 ⁻⁸	1.838	2.15 x 10 ⁶	-7.09	-0.67
0.040	87.0	78.0	2.727 x 10 ⁻⁷	84.28	14.5300	0.2169	1.850 x 10 ⁻⁷	8.77 x 10 ⁻⁸	2.109	2.47 x 10 ⁶	-7.05	-0.55
0.044	86.0	76.0	3.161 x 10 ⁻⁷	82.20	16.3700	0.2444	2.079 x 10 ⁻⁷	1.08 x 10 ⁻⁷	1.920	2.25 x 10 ⁶	-6.96	-0.49
0.048	86.0	73.5	3.593 x 10 ⁻⁷	80.11	18.7100	0.2793	2.369 x 10 ⁻⁷	1.22 x 10 ⁻⁷	1.956	2.28 x 10 ⁶	-6.91	-0.41
0.052	85.5	71.5	4.022 x 10 ⁻⁷	78.00	20.5900	0.3073	2.600 x 10 ⁻⁷	1.42 x 10 ⁻⁷	1.829	2.16 x 10 ⁶	-6.84	-0.35
0.056	85.5	69.5	4.669 x 10 ⁻⁷	75.30	23.5300	0.3512	2.964 x 10 ⁻⁷	1.70 x 10 ⁻⁷	1.738	2.06 x 10 ⁶	-6.76	-0.26
0.060	85.0	67.5	5.312 x 10 ⁻⁷	73.17	25.4400	0.3798	3.197 x 10 ⁻⁷	2.11 x 10 ⁻⁷	1.512	1.79 x 10 ⁶	-6.67	-0.21
0.064	85.0	65.0	5.954 x 10 ⁻⁷	71.03	27.3800	0.4087	3.432 x 10 ⁻⁷	2.51 x 10 ⁻⁷	1.362	1.62 x 10 ⁶	-6.59	-0.16
0.068	84.5	63.0	6.588 x 10 ⁻⁷	68.88	28.9200	0.4316	3.615 x 10 ⁻⁷	2.97 x 10 ⁻⁷	1.216	1.45 x 10 ⁶	-6.52	-0.11
0.072	84.0	61.0	7.221 x 10 ⁻⁷	66.71	31.3300	0.4675	3.906 x 10 ⁻⁷	3.31 x 10 ⁻⁷	1.178	1.41 x 10 ⁶	-6.48	-0.05
0.076	83.0	59.0	8.067 x 10 ⁻⁷	64.53	33.3300	0.4975	4.146 x 10 ⁻⁷	3.92 x 10 ⁻⁷	1.057	1.26 x 10 ⁶	-6.40	-0.01
0.080	83.0	57.0	8.890 x 10 ⁻⁷	62.34	35.3700	0.5278	4.308 x 10 ⁻⁷	4.50 x 10 ⁻⁷	0.974	1.17 x 10 ⁶	-6.34	0.04
0.084	82.5	55.0	9.746 x 10 ⁻⁷	60.14	37.4200	0.5586	4.631 x 10 ⁻⁷	5.11 x 10 ⁻⁷	0.905	1.09 x 10 ⁶	-6.29	0.10
0.088	82.0	53.0	1.058 x 10 ⁻⁶	57.93	39.5100	0.5896	4.877 x 10 ⁻⁷	5.70 x 10 ⁻⁷	0.855	1.03 x 10 ⁶	-6.24	0.15
0.092	81.5	51.0	1.170 x 10 ⁻⁶	56.89	40.7400	0.6081	5.017 x 10 ⁻⁷	6.68 x 10 ⁻⁷	0.750	9.09 x 10 ⁵	-6.17	0.19
0.096	81.0	49.0	1.252 x 10 ⁻⁶	55.25	42.2400	0.6304	5.188 x 10 ⁻⁷	7.33 x 10 ⁻⁷	0.707	8.59 x 10 ⁵	-6.13	0.23
0.100	81.0	48.0	1.362 x 10 ⁻⁶	53.00	44.3800	0.6623	5.437 x 10 ⁻⁷	8.18 x 10 ⁻⁷	0.664	8.09 x 10 ⁵	-6.08	0.29
0.104	80.5	46.5	1.472 x 10 ⁻⁶	51.35	46.2500	0.6903	5.653 x 10 ⁻⁷	9.06 x 10 ⁻⁷	0.623	7.61 x 10 ⁵	-6.04	0.34
0.108	80.0	44.5	1.581 x 10 ⁻⁶	49.68	47.8000	0.7134	5.827 x 10 ⁻⁷	9.98 x 10 ⁻⁷	0.583	7.14 x 10 ⁵	-6.00	0.39
0.112	80.0	43.0	1.690 x 10 ⁻⁶	48.00	49.3700	0.7369	6.004 x 10 ⁻⁷	1.99 x 10 ⁻⁶	0.551	6.76 x 10 ⁵	-5.96	0.44
0.116	79.5	41.5	1.834 x 10 ⁻⁶	46.92	50.3200	0.7510	6.104 x 10 ⁻⁷	1.22 x 10 ⁻⁶	0.498	6.13 x 10 ⁵	-5.91	0.47
0.120	79.0	40.5	1.976 x 10 ⁻⁶	45.83	51.2300	0.7654	6.206 x 10 ⁻⁷	1.35 x 10 ⁻⁶	0.457	5.64 x 10 ⁵	-5.86	0.51
0.124	78.5	39.0	2.118 x 10 ⁻⁶	44.73	51.9500	0.7753	6.271 x 10 ⁻⁷	1.49 x 10 ⁻⁶	0.420	5.20 x 10 ⁵	-5.82	0.53
0.128	78.0	38.0	2.259 x 10 ⁻⁶	43.63	53.2500	0.7947	6.412 x 10 ⁻⁷	1.61 x 10 ⁻⁶	0.396	4.91 x 10 ⁵	-5.79	0.58
0.132	77.5	37.0	2.400 x 10 ⁻⁶	42.52	54.2500	0.8097	6.517 x 10 ⁻⁷	1.74 x 10 ⁻⁶	0.372	4.63 x 10 ⁵	-5.75	0.62
0.136	77.0	36.0	2.602 x 10 ⁻⁶	41.40	54.9700	0.8204	6.587 x 10 ⁻⁷	1.94 x 10 ⁻⁶	0.339	4.22 x 10 ⁵	-5.71	0.66
0.140	76.5	35.0	2.804 x 10 ⁻⁶	41.51	54.6700	0.8159	6.535 x 10 ⁻⁷	2.15 x 10 ⁻⁶	0.303	3.79 x 10 ⁵	-5.66	0.64
0.144	75.5	34.0	3.000 x 10 ⁻⁶	40.38	55.7000	0.8314	6.643 x 10 ⁻⁷	2.33 x 10 ⁻⁶	0.284	3.56 x 10 ⁵	-5.63	0.69
0.148	75.0	34.0	3.204 x 10 ⁻⁶	39.25	56.7600	0.8471	6.752 x 10 ⁻⁷	2.52 x 10 ⁻⁶	0.267	3.35 x 10 ⁵	-5.59	0.74
0.152	74.5	33.0	3.402 x 10 ⁻⁶	38.73	57.1400	0.8529	6.782 x 10 ⁻⁷	2.72 x 10 ⁻⁶	0.249	3.15 x 10 ⁵	-5.56	0.75
0.156	74.0	32.0	3.634 x 10 ⁻⁶	37.59	58.2200	0.8689	6.893 x 10 ⁻⁷	2.94 x 10 ⁻⁶	0.234	2.95 x 10 ⁵	-5.53	0.82
0.160	73.5	31.5	3.864 x 10 ⁻⁶	37.07	58.3300	0.8706	6.890 x 10 ⁻⁷	3.17 x 10 ⁻⁶	0.217	2.74 x 10 ⁵	-5.49	0.82
0.164	73.0	30.5	4.094 x 10 ⁻⁶	35.92	59.4400	0.8872	7.004 x 10 ⁻⁷	3.39 x 10 ⁻⁶	0.206	2.61 x 10 ⁵	-5.46	0.89
0.168	72.0	30.0	4.323 x 10 ⁻⁶	35.38	59.3900	0.8934	7.036 x 10 ⁻⁷	3.61 x 10 ⁻⁶	0.194	2.46 x 10 ⁵	-5.44	0.92
0.172	71.5	29.0	4.550 x 10 ⁻⁶	34.84	60.2800	0.8998	7.070 x 10 ⁻⁷	3.84 x 10 ⁻⁶	0.184	2.34 x 10 ⁵	-5.41	0.95

Q_{max} = 67

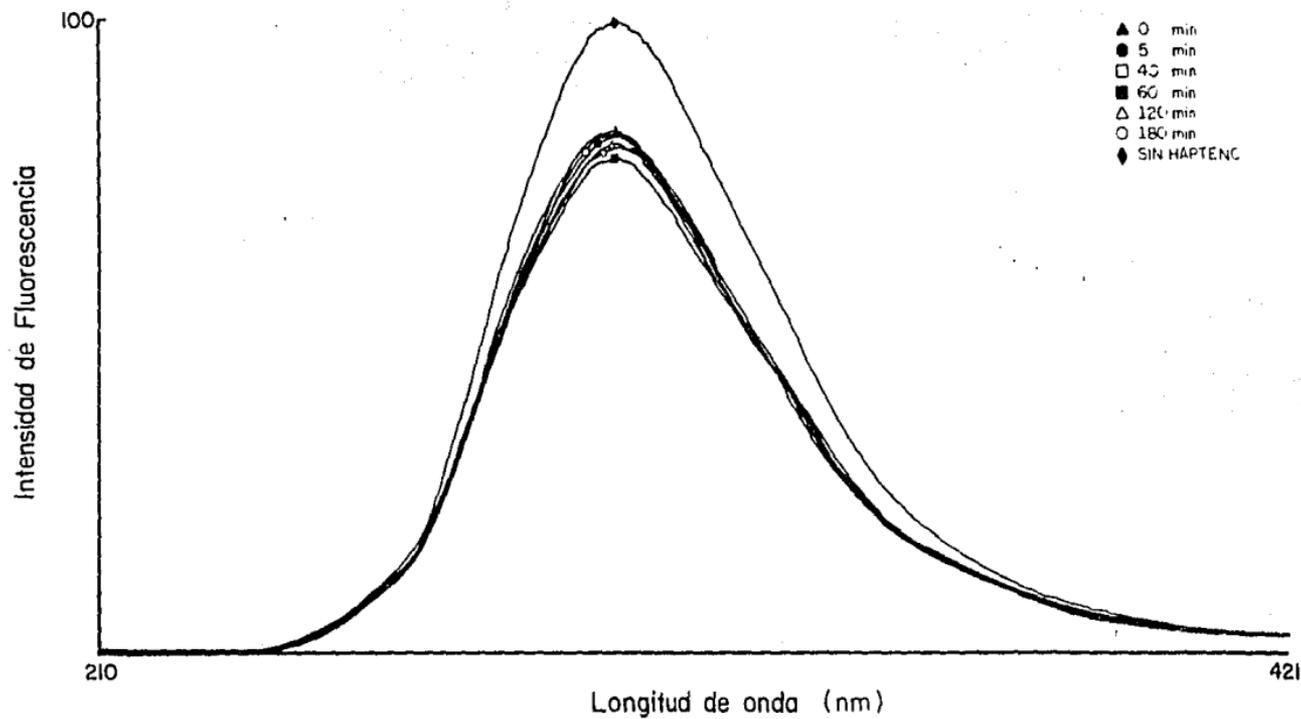
T A B L A V

VI	FB	FA	(H _{TOT})	F	Q	R	(B)	(H)	B/H	R/H	LOG L	LOG R/I-R
0.000	97.0	96.5										
0.004	96.5	96.0	2.118×10^{-8}	98.42	01.595	0.02493	1.76×10^{-8}	3.57×10^{-9}	4.925	6.97×10^6	-8.44	-1.592
0.008	96.0	96.0	3.169×10^{-8}	97.62	02.144	0.03350	2.35×10^{-8}	8.09×10^{-9}	2.915	4.13×10^6	-8.09	-1.460
0.012	95.5	95.5	4.214×10^{-8}	96.81	02.953	0.04615	3.24×10^{-8}	3.89×10^{-7}	0.083	1.18×10^5	-6.41	-1.315
0.016	95.0	95.5	5.254×10^{-8}	96.00	03.767	0.05886	4.12×10^{-8}	1.13×10^{-8}	3.651	5.21×10^6	-7.94	-1.204
0.020	95.0	95.0	7.935×10^{-8}	94.92	04.349	0.06795	4.74×10^{-8}	3.18×10^{-8}	1.490	2.13×10^6	-7.49	-1.137
0.024	94.0	94.5	1.060×10^{-7}	92.75	06.526	0.10260	7.10×10^{-8}	3.49×10^{-8}	2.035	2.91×10^6	-7.45	-0.944
0.028	94.0	94.0	1.326×10^{-7}	91.38	07.902	0.12350	8.58×10^{-8}	4.67×10^{-8}	1.835	2.64×10^6	-7.33	-0.851
0.032	93.5	94.0	1.590×10^{-7}	89.84	09.205	0.14380	9.97×10^{-8}	5.92×10^{-8}	1.683	2.42×10^6	-7.22	-0.774
0.036	93.0	93.5	1.852×10^{-7}	88.19	10.870	0.16990	1.17×10^{-7}	6.77×10^{-8}	1.735	2.50×10^6	-7.16	-0.689
0.040	93.0	93.0	2.291×10^{-7}	86.14	12.930	0.20210	1.39×10^{-7}	8.97×10^{-8}	1.553	2.25×10^6	-7.04	-0.596
0.044	92.5	93.0	2.727×10^{-7}	83.65	15.210	0.23770	1.63×10^{-7}	1.09×10^{-7}	1.498	2.17×10^6	-6.96	-0.506
0.048	92.0	92.5	3.161×10^{-7}	81.68	17.190	0.26860	1.84×10^{-7}	1.31×10^{-7}	1.399	2.03×10^6	-6.88	-0.435
0.052	92.0	92.0	3.593×10^{-7}	79.44	19.460	0.30400	2.08×10^{-7}	1.51×10^{-7}	1.376	2.01×10^6	-6.82	-0.359
0.056	91.5	92.0	4.022×10^{-7}	76.91	21.800	0.34060	2.32×10^{-7}	1.69×10^{-7}	1.370	2.00×10^6	-6.77	-0.286
0.060	91.0	91.5	4.669×10^{-7}	74.36	24.170	0.37760	2.57×10^{-7}	2.09×10^{-7}	1.226	1.80×10^6	-6.67	-0.217
0.064	90.5	91.0	5.312×10^{-7}	71.91	26.450	0.41320	2.80×10^{-7}	2.50×10^{-7}	1.120	1.64×10^6	-6.60	-0.152
0.068	90.0	90.5	5.951×10^{-7}	69.77	28.610	0.44710	3.02×10^{-7}	2.92×10^{-7}	1.036	1.53×10^6	-6.53	-0.092
0.072	90.0	90.0	6.588×10^{-7}	67.63	30.600	0.47810	3.23×10^{-7}	3.35×10^{-7}	0.962	1.42×10^6	-6.47	-0.038
0.076	89.5	89.5	7.221×10^{-7}	65.97	32.090	0.50140	3.38×10^{-7}	3.84×10^{-7}	0.879	1.30×10^6	-6.41	0.002
0.080	89.0	89.0	8.067×10^{-7}	62.92	35.220	0.55030	3.70×10^{-7}	4.36×10^{-7}	0.847	1.26×10^6	-6.36	0.087
0.084	88.5	89.0	8.969×10^{-7}	60.57	37.440	0.58500	3.92×10^{-7}	4.98×10^{-7}	0.787	1.17×10^6	-6.30	0.149
0.088	88.0	88.5	9.746×10^{-7}	58.76	39.280	0.61380	4.10×10^{-7}	5.64×10^{-7}	0.728	1.08×10^6	-6.24	0.201
0.092	88.0	88.0	1.058×10^{-6}	56.84	41.080	0.64190	4.28×10^{-7}	6.29×10^{-7}	0.680	1.02×10^6	-6.20	0.253
0.096	87.5	87.5	1.170×10^{-6}	55.02	42.790	0.66860	4.45×10^{-7}	7.25×10^{-7}	0.613	9.22×10^5	-6.14	0.304
0.100	87.0	87.0	1.252×10^{-6}	53.35	44.340	0.69280	4.60×10^{-7}	7.92×10^{-7}	0.580	8.74×10^5	-6.10	0.353
0.104	86.5	86.5	1.362×10^{-6}	51.46	46.300	0.72340	4.79×10^{-7}	8.82×10^{-7}	0.542	8.19×10^5	-6.05	0.417
0.108	86.5	86.0	1.472×10^{-6}	49.77	48.030	0.75050	4.95×10^{-7}	9.76×10^{-7}	0.507	7.68×10^5	-6.01	0.478
0.112	86.0	86.0	1.581×10^{-6}	48.48	49.210	0.76890	5.06×10^{-7}	1.07×10^{-6}	0.471	7.15×10^5	-5.96	0.522
0.116	85.5	85.5	1.690×10^{-6}	47.07	50.380	0.78720	5.17×10^{-7}	1.17×10^{-6}	0.441	6.71×10^5	-5.93	0.568
0.120	84.5	85.0	1.834×10^{-6}	45.59	51.770	0.80890	5.30×10^{-7}	1.30×10^{-6}	0.407	6.20×10^5	-5.88	0.620
0.124	84.0	84.5	1.976×10^{-6}	45.56	52.840	0.82560	5.40×10^{-7}	1.43×10^{-6}	0.376	5.75×10^5	-5.84	0.675
0.128	84.0	84.0	2.118×10^{-6}	43.52	53.770	0.84020	5.48×10^{-7}	1.57×10^{-6}	0.349	5.35×10^5	-5.80	0.720
0.132	83.0	84.0	2.259×10^{-6}	42.48	54.850	0.85710	5.57×10^{-7}	1.70×10^{-6}	0.328	5.03×10^5	-5.76	0.778
0.136	83.0	83.5	2.400×10^{-6}	41.43	55.810	0.87200	5.66×10^{-7}	1.83×10^{-6}	0.308	4.75×10^5	-5.73	0.833
0.140	82.5	83.0	2.602×10^{-6}	40.38	56.640	0.88500	5.73×10^{-7}	2.02×10^{-6}	0.282	4.36×10^5	-5.69	0.886
0.144	81.5	82.5	2.804×10^{-6}	39.32	57.620	0.90040	5.81×10^{-7}	2.22×10^{-6}	0.261	4.05×10^5	-5.65	0.956
0.148	81.5	81.5	3.004×10^{-6}	38.37	58.490	0.91390	5.89×10^{-7}	2.41×10^{-6}	0.244	3.78×10^5	-5.61	1.026
0.152	81.0	81.0	3.204×10^{-6}	37.59	59.180	0.92470	5.94×10^{-7}	2.60×10^{-6}	0.227	3.54×10^5	-5.58	1.089
0.156	80.5	80.5	3.402×10^{-6}	37.16	59.500	0.92960	5.96×10^{-7}	2.80×10^{-6}	0.212	3.31×10^5	-5.55	1.121
0.160	79.5	80.5	3.634×10^{-6}	36.20	60.270	0.94170	6.02×10^{-7}	3.03×10^{-6}	0.198	3.10×10^5	-5.51	1.208
0.164	79.0	79.5	3.864×10^{-6}	35.53	60.850	0.95080	6.07×10^{-7}	3.25×10^{-6}	0.186	2.91×10^5	-5.48	1.286
0.168	78.5	79.0	4.094×10^{-6}	34.97	61.320	0.95810	6.10×10^{-7}	3.48×10^{-6}	0.175	2.75×10^5	-5.45	1.359
0.172	78.0	78.5	4.323×10^{-6}	34.11	62.110	0.97050	6.16×10^{-7}	3.70×10^{-6}	0.166	2.61×10^5	-5.43	1.517
0.176	77.5	78.0	4.550×10^{-6}	33.78	62.080	0.97000	6.14×10^{-7}	3.93×10^{-6}	0.156	2.46×10^5	-5.40	1.510

F I G U R A 14

Efecto del tiempo sobre las lecturas obtenidas. A una solución de anticuerpo se le agregó una concentración media de hapteno y se midió a diferentes tiempos (0 a 3 h).

FIGURA 14



T A B L A VI

Concentración molar 3H-DNP-Lis	CPM H	CPM B	H	B	B/H	LOG H	LOG r/1-r	r
7.35×10^{-6}	489,000	100,000	1.5×10^{-5}	2.05×10^{-6}	.136	-4.8239	1.612	0.976
	449,000	66,700	1.38×10^{-5}	3.10×10^{-6}	.223	-4.8601	-	1.476
3.67×10^{-6}	207,000	59,800	6.38×10^{-6}	1.84×10^{-6}	.289	-5.1952	0.849	0.876
	242,000	9,200	7.47×10^{-6}	2.84×10^{-6}	.038	-5.1267	-0.805	0.135
1.83×10^{-6}	63,100	198,000	1.94×10^{-6}	3.34×10^{-6}	1.720	-5.7122	-	1.670
	89,200	59,900	2.75×10^{-6}	1.56×10^{-6}	.570	-5.5607	-0.460	0.742
	62,200	88,700	1.91×10^{-6}	2.73×10^{-6}	1.420	-5.7190	-	1.300
9.10×10^{-7}	25,900	45,500	7.98×10^{-7}	1.40×10^{-6}	1.750	-6.0980	0.301	0.666
4.55×10^{-7}	10,400	27,000	3.22×10^{-7}	8.33×10^{-7}	2.58	-6.4921	-0.1821	0.396
	8,440	24,400	2.60×10^{-7}	7.52×10^{-7}	2.89	-6.5850	-0.2534	0.358
2.27×10^{-7}	5,270	12,600	1.62×10^{-7}	3.90×10^{-7}	2.40	-6.7905	-0.6419	0.185
	4,960	14,000	1.53×10^{-7}	4.32×10^{-7}	2.82	-6.8153	-0.5867	0.205
	4,750	13,000	1.46×10^{-7}	4.00×10^{-7}	2.74	-6.8356	-0.6283	0.190
1.38×10^{-7}	2,960	5,410	9.13×10^{-8}	1.66×10^{-7}	1.82	-7.0395	-1.0660	0.079
	2,890	6,260	8.90×10^{-8}	1.93×10^{-7}	2.17	-7.0506	-0.9948	0.091
	2,980	7,020	9.19×10^{-8}	2.16×10^{-7}	2.35	-7.0367	-0.9406	0.102
	3,010	6,570	9.28×10^{-8}	2.02×10^{-7}	2.18	-7.0325	-0.9729	0.096
6.9×10^{-8}	1,600	4,300	4.93×10^{-8}	1.32×10^{-7}	2.68	-7.3072	-1.1700	0.062
	1,400	3,710	4.33×10^{-8}	1.14×10^{-7}	2.64	-7.3635	-1.2410	0.054
3.95×10^{-8}	985	1,400	3.93×10^{-8}	4.58×10^{-7}	1.51	-7.5186	-1.6519	0.021
	944	1,550	2.91×10^{-8}	4.78×10^{-7}	1.64	-7.5361	-1.6328	0.022

de Scatchard, Hill y Sips.

Scatchard.

En las Figs. 15,16,17 y 18 se muestran los trazos de Scatchard obtenidos tanto por apagamiento de fluorescencia como por diálisis en equilibrio. Como control se utilizaron unas γ -globulinas heterogéneas que por reportes anteriores (49) se conocía presentaban un brazo ascendente al probarlos por diálisis en equilibrio. En la Fig. 15 se muestra la presencia de este brazo ascendente a concentraciones bajas de ligando pegado y a valores altos de la relación B/H. Sin embargo, este brazo es pequeño y rápidamente cae en un trazo casi rectilíneo.

Al mismo tiempo se probaron unas δ -globulinas normales sin actividad anti-DNP. En la Fig. 15 se puede observar que la fijación de ligando es nula en comparación con la fijación que presentan las δ -globulinas heterogéneas con actividad anti-DNP.

Para el caso de la IgA, la Fig. 16 presenta un trazo en el cual a bajas concentraciones de ligando pegado y a una relación alta de B/H existe una pequeña dispersión de puntos, pero al ir aumentando la concentración de pegado, los puntos caen en una línea recta, esto es a medida que la relación B/H disminuye y aumenta el pegado, la recta desciende hasta interceptar con las abscisas (B). A partir de este intercepto se puede conocer la concentración total de sitios activos (S_0); al hacer una regresión de los puntos, se puede conocer el intercepto en la ordena

F I G U R A 15

En esta figura se muestran a) Los trazos de Scatchard para unas δ -globulinas heterogéneas con actividad anti-DNP como los trazos para unas δ -globulinas normales.
b) La curva de apagamiento (Q) vs. Hapteno total para las δ -globulinas heterogéneas.

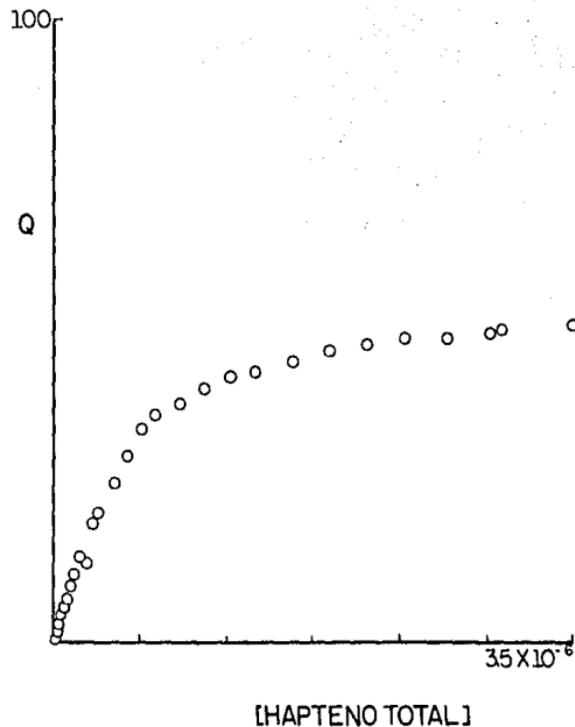
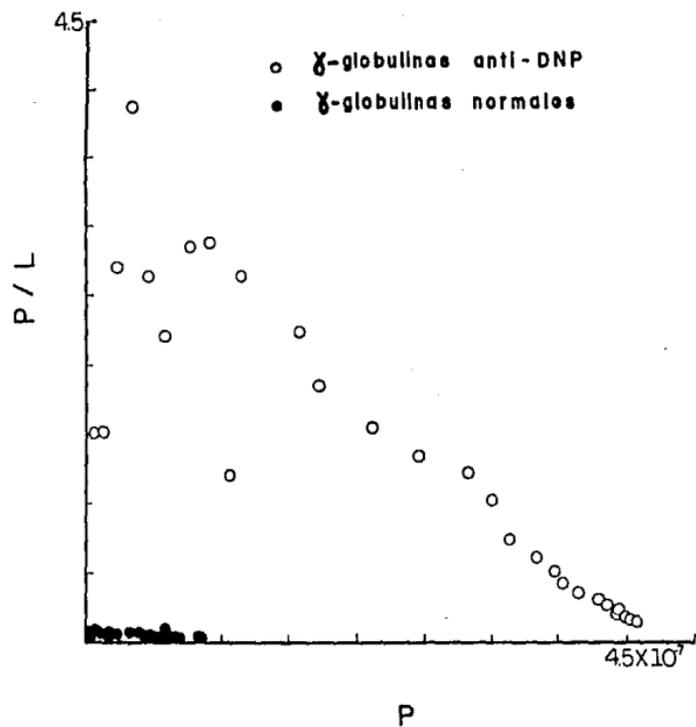


FIGURA 15 (Heterogeneous)

FIGURA 16

En esta figura se muestran a) La curva de Apagamiento de la fluorescencia (Q) vs. Hapteno total de la IgA. b) Los trazos de Scatchard para el mismo anticuerpo.

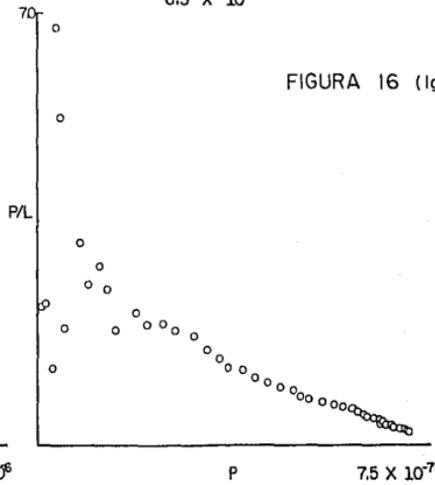
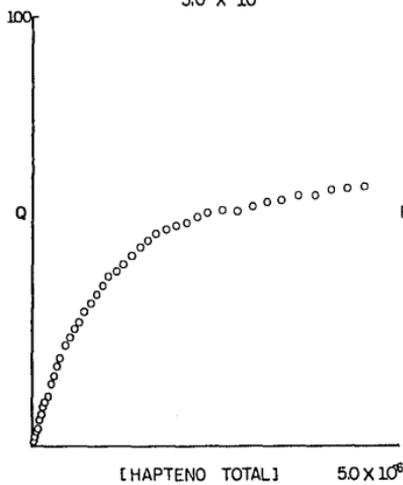
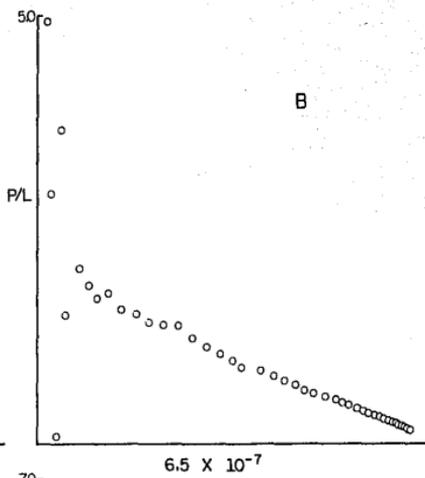
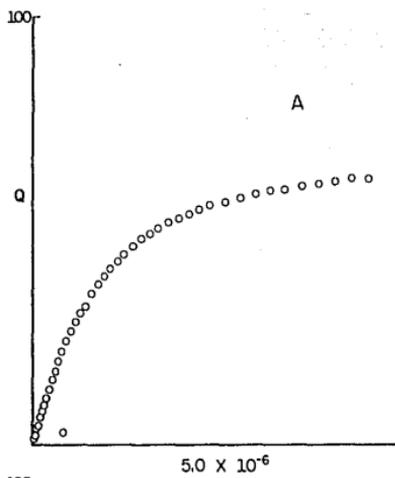


FIGURA 16 (lg A)

F I G U R A 17

En esta figura se muestran a) La curva de Apagamiento de la fluorescencia (Q) vs. Hapteno total del anticuerpo monoclonal IgG₂. b) Los trazos de Scatchard para el mismo anticuerpo.

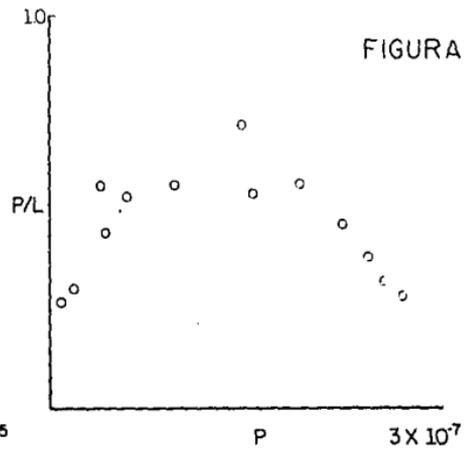
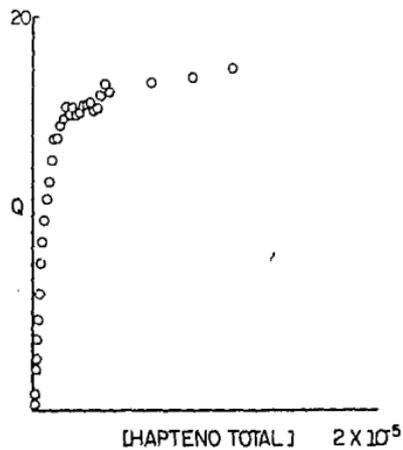
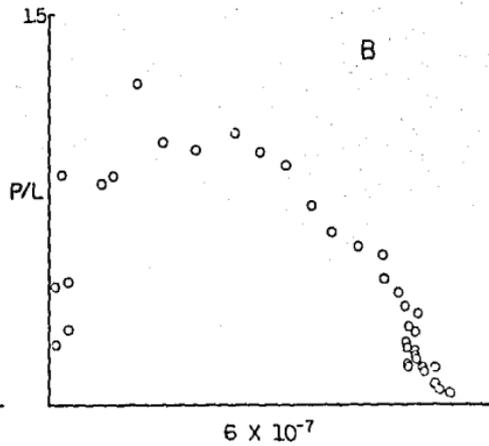
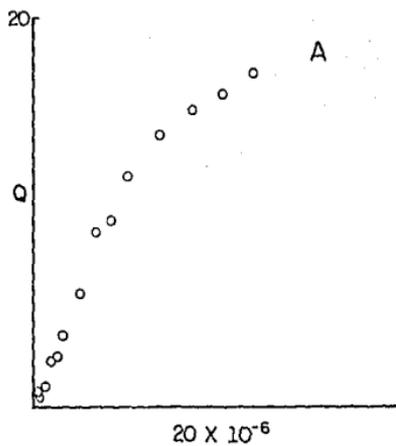
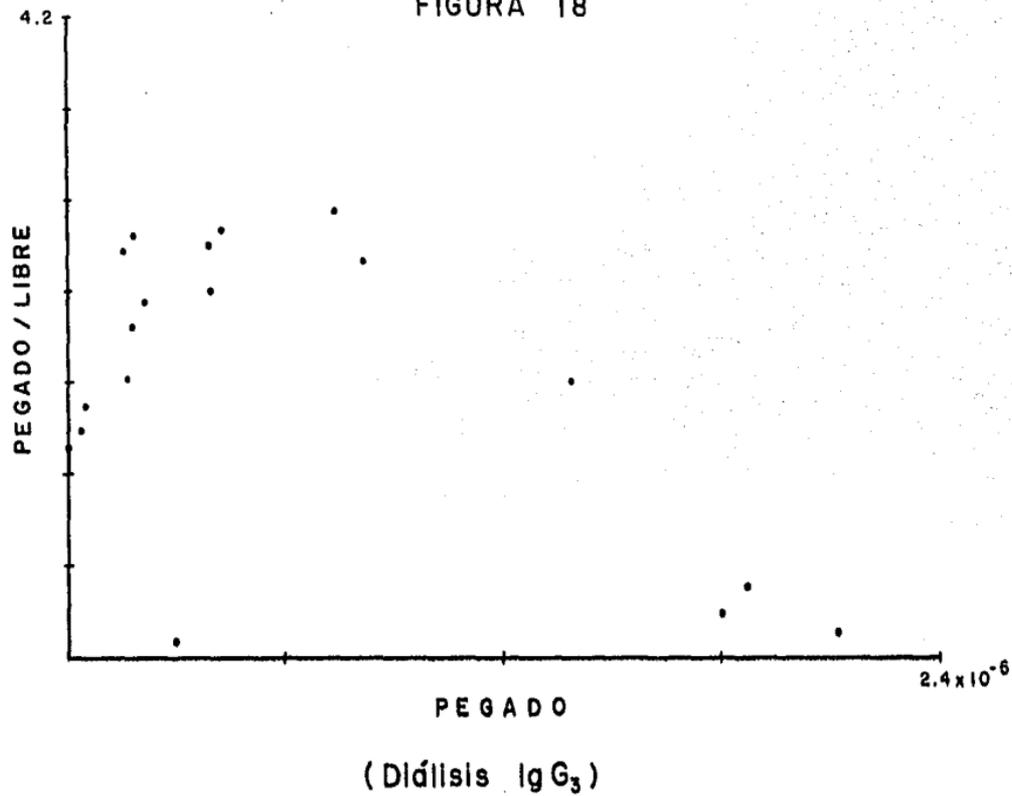


FIGURA 17 (lg G₃)

F I G U R A 18

En esta figura se muestran los trazos de
Scatchard para el anticuerpo monoclonal
IgG₃ obtenidos por Diálisis en equilibrio.

FIGURA 18



da (B/H) y así el valor de K_1A_0 y K_2 por el valor de la pendiente ($-2K_2$).

Para la IgG_3 que se probó por los dos métodos, el trazo de Scatchard que se presenta es muy similar en ambos casos; a bajas concentraciones de ligando pegado se presenta un brazo ascendente, el cual se caracteriza por un máximo que se mantiene a concentraciones de pegado intermedias y desciende en un trazo rectilíneo a concentraciones mayores, Figs. 17 y 18.

En la Tabla VII se muestran los valores de los estimados para las constantes del primero y segundo sitio activo (K_1 y K_2) cu ya relación nos permite conocer el valor de β y de esa manera saber si estos valores cumplen con la condición del máximo.

En la Tabla VIII se muestran los valores de los estimados de la relación K_2/K_1 que fueron calculados de acuerdo a las ecuaciones 20, 21 y 22 con los valores de B_{Max} y B/H_{Max} obtenidos a partir de 3 métodos diferentes:

- a) A partir de $B_{Max} = S_0 - S_0/\sqrt{2}$.
- b) Del cálculo del coeficiente de Hill
- c) Directamente de la gráfica

Aunque existen discrepancias para estimar el valor de K_2 a partir de estas ecuaciones, en todos los casos el valor de K_2 es consistente con $K_2 > K_1/4$. Hay que hacer notar que es la ecuación

T A B L A VII

DATOS PARA CONOCER LOS ESTIMADOS DE K_1 Y K_2 EN ANTICUERPOS HOMOGENEOS (IgG₃ e IgA).

Concentración molar de proteína x 10 ⁻⁷	$\Lambda_0 \times 10^{-7}$	(B/H)max	Bmax x 10 ⁻⁷	$K_1 \times 10^{6^1}$	$K_2 \times 10^{6^2}$	C.H.	∞^3	N ⁴	B ⁵
3.0* ^G	1.5	a. 0.625 b. 0.670 c. 0.720	a. 0.878 b. 1.268 c. 1.400	1.333	-----	1.7326	1.57	a. 9.51 b. 10.99 c. 12.70	a. 38.04 b. 43.81 c. 50.85
5.2* ^G	2.6	a. 1.025 b. 0.970 c. 0.980	a. 1.523 b. 1.140 c. 2.000	1.290	-----	1.281	1.14	a. 9.08 b. 8.17 c. 8.28	a. 36.32 b. 32.40 c. 33.14
0.21* ^f	0.105	a. 2.880 b. 2.860 c. 2.880	a. 6.150 b. 6.323 c. 7.520	1.168	-----	1.430	1.13	a. 5.25 b. 5.25 c. 5.25	a. 20.99 b. 20.99 c. 21.16
8.80*	4.4	-----	-----	6.360	1.374	-----	0.87	0.21	0.8642
7.10*	3.55	-----	-----	5.630	1.604	-----	1.05	0.28	1.1396

* IgG₃

‡ Apagamiento de la fluorescencia

f Diálisis en equilibrio

+ IgA

a. Bmax obtenida de $S_0 - S_0 / \sqrt{2}$
 b. Bmax obtenida de $S_0 - S_0^2 / C.H.$
 c. Bmax obtenida de la gráfica

1.- Valor obtenido de $K_1 \Lambda$
 2.- Valor obtenido de $-2K_2$
 3.- ∞ índice de heterogeneidad
 4.- Relación K_2/K_1
 5.- $4K_2/K_1$

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

T A B L A VIII

ANTICUERPOS HOMOGENEOS (IgG₂) ANTI-DNP PURIFICADOS
ESTIMADOS DE LA RELACION ENTRE LAS CONSTANTES EXPERIMENTALES
DEL 1ero. y 2o. SITIO DE REACCION

K ₂ /K ₁ SIMULACION	APAGAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA				DIALISIS EN EQUILIBRIO		
	I	I	II	I	a I		
K ₂ /K ₁ SIMULACION	6.47	25.90	5.51	22.09	4.3571	17.42	
K ₂ /K ₁ ecuación (20)	a.	9.51	38.04	9.082	36.32	5.24	20.99
	b.	10.99	43.81	8.10	32.40	5.24	20.00
	c.	12.71	50.83	8.286	33.14	5.29	21.16
K ₂ /K ₁ ecuación (21)	a.	1.70	6.79	1.707	6.82	1.7038	6.81
	b.	10.70	42.82	1.043	4.17	1.8304	7.31
	c.	56.49	225.95	4.90	19.77	3.3537	13.41
K ₂ /K ₁ ecuación (22)	a.	3.77	15.09	3.68	14.72	2.83	11.33
	b.	10.86	43.47	2.57	10.29	2.95	11.80
	c.	27.00	108.02	6.33	25.33	4.15	16.16

a. Bmax obtenida de $S_0 - S_0 / \sqrt{2}$
b. Bmax obtenida de $S_0^0 - S_0^0 / C.H.$
c. Bmax obtenida de la gráfica.

1. $\alpha = 4K_2/K_1 =$ grado de cooperatividad

ción 20 donde se presenta en menor grado esta variación al estimar el valor de K_2 por los 3 métodos mencionados y un valor promedio de esta constante es cerca de 33 veces mayor de lo esperado sino hubiera interacciones.

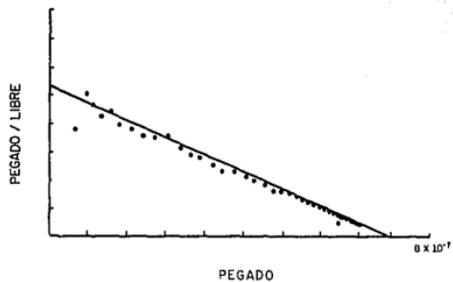
Curva de ajuste y simulación.

Debido a que los 3 métodos utilizados para calcular β dan resultados muy discrepantes Tabla VII, se recurrió a un mecanismo de evaluación de los valores de β obtenidos por los distintos métodos. Para esto se instrumentó un método mediante el cual a partir de los valores de K_1 , K_2 y A_0 se obtuviera una curva simulada o teórica que describiera mejor los puntos experimentales Figs. 19, 20 y 21. Sin embargo, la selección de la mejor curva seguía haciéndose de una manera subjetiva, por consiguiente, se instrumentó un método objetivo que nos indicó cuál era la curva que describía mejor los puntos experimentales y de esta manera se obtuvieron los valores de K_1 , K_2 y A_0 así como β que se presentan en la Tabla IX.

F I G U R A 19

En esta figura se muestran las curvas de Simulación y Ajuste para la IgA obtenidos por Apagamiento de la fluorescencia.

SIMULACION



AJUSTE

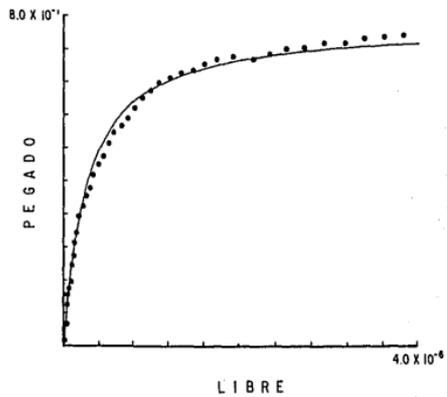
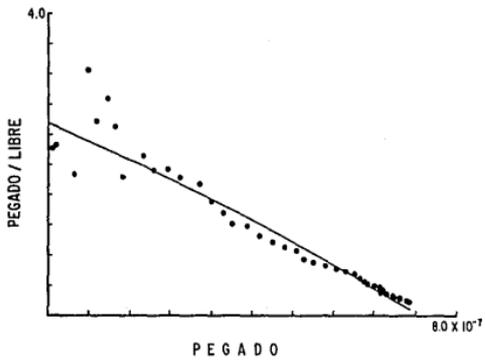
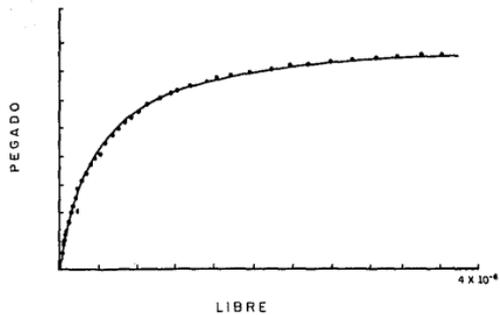


FIGURA. 19

F I G U R A 20

En esta figura se muestran las curvas de Simulación y Ajuste para el anticuerpo monoclonal IgG₃ obtenidas por Apagamiento de la fluorescencia.

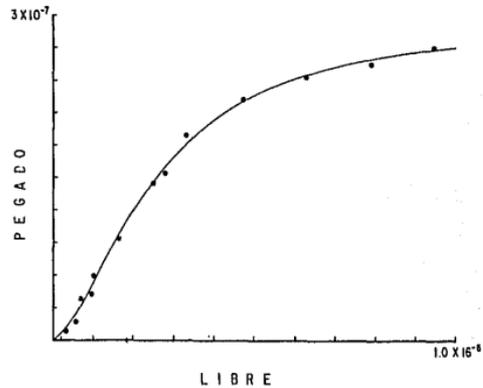
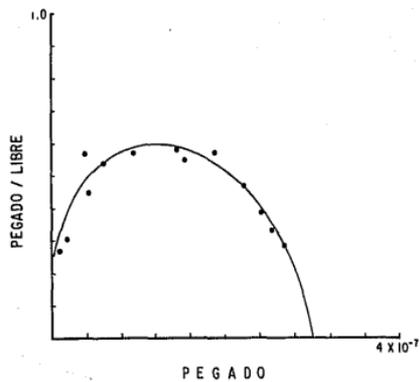
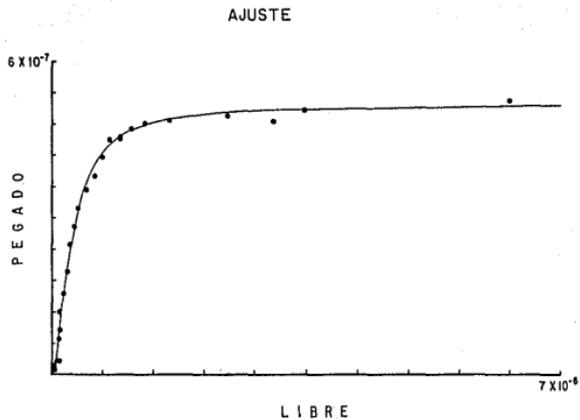
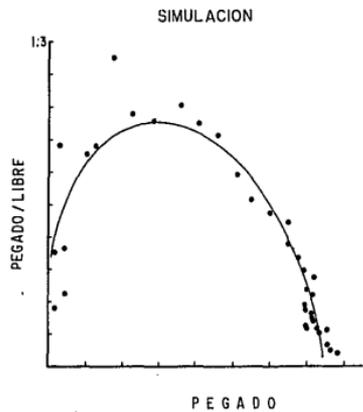


FIGURA 20

F I G U R A 21

En esta figura se muestran las curvas de Simulación y Ajuste para el anticuerpo monoclonal IgG₃ obtenidas por Diálisis en equilibrio.

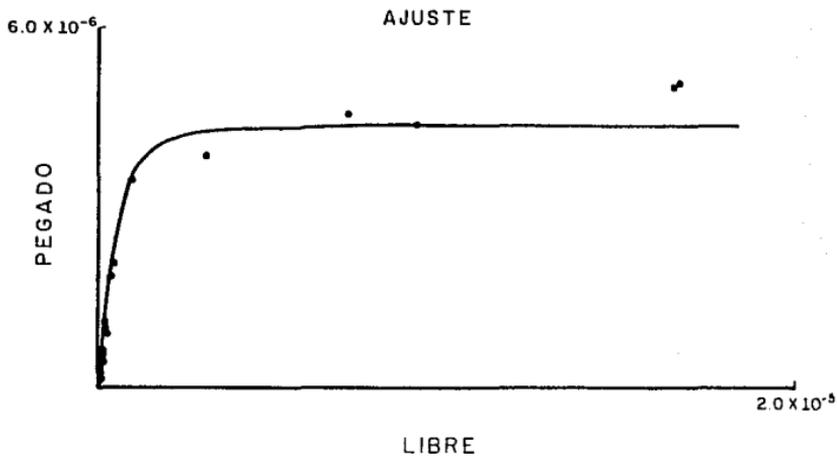
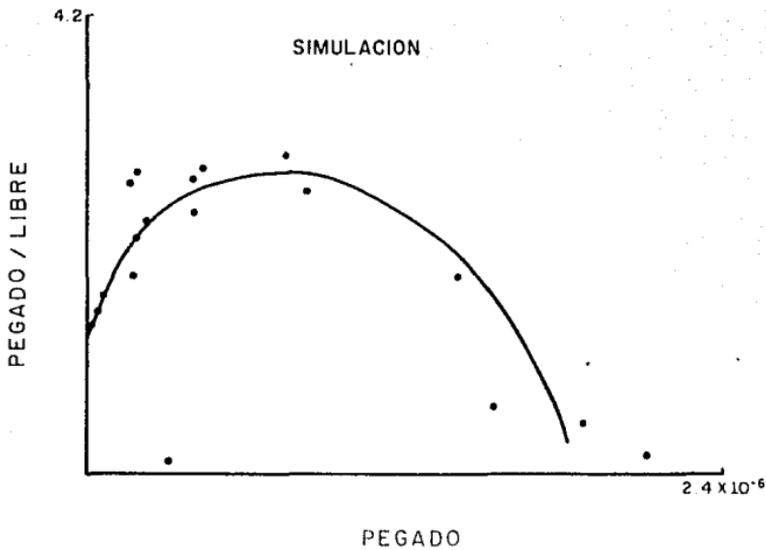


FIGURA 21

T A B L A IX

VALORES DE LOS ESTIMADOS DE K_1 Y K_2 OBTENIDOS POR EL METODO DE
SIMULACION-AJUSTE PARA ANTICUERPOS HOMOGENEOS (IgG₃ e IgA)

concentración molar de proteína x 10 ⁻⁷	A ₀ x 10 ⁻⁷	K ₁ x 10 ⁶	K ₂ x 10 ⁶	B ¹	N ²
3.0*‡	1.5	1.52	9.84	25.89	6.47
5.2*‡	2.6	1.54	8.68	22.25	5.63
18.0*‡	9.0	1.4	6.10	17.42	4.35
7.5*‡	3.6	6.98	2.07	1.18	0.29
7.1	3.55	6.49	1.41	0.87	0.21

$$(1) B = 4K_2/K_1$$

$$(2) N = K_2/K_1$$

* IgG₃

+ IgA

‡ Apagamiento de la fluorescencia

‡ Diálisis en equilibrio

DISCUSION

En este reporte se presentan evidencias de que durante la reacción de un anticuerpo monoclonal con su hapteno monovalente se observa al igual que en un anticuerpo policlonal, un brazo ascendente indicativo de cooperatividad.

Este estudio era deseable ya que sabemos que las poblaciones heterogéneas de anticuerpos producidos en respuesta a la estimulación antigénica, representan el producto de numerosas clonas celulares que produce cada una de ellas un anticuerpo homogéneo (1,6). De esta manera, la respuesta inmune humoral inducida por un conjugado hapteno-proteína se caracteriza por la producción de una población heterogénea y altamente específica de anticuerpos.

En la teoría de la selección clonal se implica que el sistema inmune responde al antígeno por selección, activación y expansión de las clonas de linfocitos precomprometidos con un determinante antigénico en particular; por lo tanto, la respuesta inmune humoral es el resultado de la suma del producto de muchas clonas individuales.

Siendo la célula formadora de anticuerpos, una célula en "estado final" es incapaz de llevar a cabo mayor diferenciación y sólo

bajo transformación maligna puede producir grandes cantidades de inmunoglobulina homogénea.

Sin embargo, actualmente bajo ciertas condiciones una célula inmune puede fusionarse con una célula tumoral y generar un híbrido que sintetiza anticuerpos homogéneos o monoclonales. En este trabajo se utilizó la técnica desarrollada por Köhler y Milstein para hibridación celular somática para la obtención de un anticuerpo monoclonal específico de la clase IgG y con actividad anti-DNP. Por el esquema de inmunización empleado era de esperarse se obtuviera una inmunoglobulina de la clase G, que por otra parte era necesaria para el tipo de ensayo en que se le iba a utilizar.

Se hace notar que para la finalidad del trabajo, no fué necesario determinar el número de clonas, ni los porcentajes de hibridación, ya que se requería únicamente de una IgG con actividad anti-DNP homogénea.

La técnica utilizada para clonación fué la dilución limitante. Aunque no se comprobó por microscopía que en la última dilución hubiera una sola célula, la homogeneidad del anticuerpo quedó de manifiesto por las pruebas de isoelectroenfoque y por la banda de precipitación obtenida por DID, que nos indica que el anticuerpo pertenece a la subclase IgG₃. Además, el que los trazos de Scatchard desciendan en forma casi rectilínea es compatible con homogeneidad.

Al someter al anticuerpo a una curva de distribución de afinidades se encontró que presenta una sola curva, lo cual, además de confirmar lo anteriormente dicho coincide con los resultados obtenidos en la IEF, en la DID, en el IEE y en los trazos de Scatchard.

En este trabajo se utilizaron dos anticuerpos homogéneos, uno producto del mieloma MOPC-315 que es de la clase IgA y otro producto de un hibridoma que es de la clase IgG₃, ambos con actividad anti-DNP, para evaluar mediante las técnicas de Apagamiento de la fluorescencia y la Diálisis en equilibrio la presencia de interacciones en la reacción antígeno-anticuerpo.

Por los resultados obtenidos se confirma la existencia de interacciones positivas en uno de los anticuerpos homogéneos (IgG₃) por la presencia de un brazo ascendente a valores bajos de ligando pegado en la reacción de fijación entre los anticuerpos bivalentes y el hapteno monovalente. Este brazo ascendente es consistente con cooperatividad entre los sitios activos del anticuerpo de acuerdo al Modelo Teórico (Anexo 1) y al de otros autores (13,59).

Aunque estos resultados no coinciden con la hipótesis más comúnmente aceptada de que la unión del antígeno ocurre en forma independiente del sitio de unión del anticuerpo (NO interacciones) puesto que, en los trabajos donde se apoya dicha hipótesis se utilizaron anticuerpos heterogéneos y se explica el fenómeno

como producto de la heterogeneidad inicial y no mediante la heterogeneidad generada durante el transcurso de la reacción, debido a que bajo estas condiciones es difícil diferenciarlas.

Pese a lo anterior se ha reportado la presencia de interacciones positivas en inmunoglobulinas divalentes heterogéneas con antígenos monovalentes y polivalentes (8,10,49) por la presencia de un brazo ascendente en los trazos de Scatchard, detectado a concentraciones bajas de ligando pegado en una gráfica de Pegado/Libre contra Pegado. Sin embargo, estos resultados no fueron concluyentes, debido a que se trabajó con anticuerpos heterogéneos y la reacción fué medida por Diálisis en equilibrio, por lo que estos resultados fueron considerados como producto de un artefacto experimental. Para descartar este efecto en este trabajo se ensayaron anticuerpos homogéneos tanto por apagamiento de la fluorescencia como por diálisis en equilibrio.

Como en la diálisis en equilibrio existe una gran variación, particularmente a las concentraciones a las cuales se detecta el brazo ascendente, esto podría favorecer el que este brazo fuera producto de un artefacto, lo anterior se rechaza al comparar los trazos muy similares tanto con los valores de diálisis como con los de apagamiento Figs. 17 y 18. Por la técnica de apagamiento no existe la variante de los pequeños volúmenes, ni el error por manipulación al obtener la muestra, así como el que la reacción se encuentre en equilibrio sin importar los tiempos a los cuales se agrega la muestra. El que las curvas experimentales sean muy

similares a las curvas teóricas' apoya el que el brazo ascendente no pueda ser explicado por otro tipo de razonamiento que no sea el de cooperatividad.

Aunque el apagamiento de la fluorescencia es más confiable que la diálisis en equilibrio, pueden todavía existir posibles artefactos como fuentes de error:

1) Tiempo para alcanzar el equilibrio. Este artefacto puede ser eliminado, ya que al probar el efecto del tiempo contra la concentración media de hapteno, se observa que se alcanza dicho equilibrio desde el tiempo cero hasta las 3 h. Fig. 14. Por lo tanto los valores obtenidos no son efecto de una cinética.

2) Estimación de la concentración de proteína. Para hacer los cálculos de obtención de los parámetros de la ecuación de Scatchard (B y H) se infiere la concentración molar de proteína (concentración de proteína por D.O. a 280 nm y se infiere que el 100% de la proteína está activa, así como la confiabilidad de la lectura, por lo que se recalcularon en un 2, 2.5, 0.75 y 0.5 veces de su valor. A valores altos de concentración molar de proteína se obtienen valores negativos para el ligando libre en los primeros puntos de la titulación, error que se ve incrementado a medida que el factor de error aumenta. Sin embargo, cuando el valor de la concentración molar de proteína es bajo, el tamaño de la curva decrece sin desaparecer el trazo tipo, en este caso el brazo ascendente, aunque con valores menores para la constante de afinidad. No es así para el caso de la diálisis en equili

brio, en donde el valor de la concentración molar de sitios activos se conoce a partir del intercepto en las abscisas (S_0), ventaja que tiene sobre el apagamiento de la fluorescencia. Pero mediante la técnica de ajuste y simulación se reduce el efecto antes mencionado para dicha técnica.

3) Cálculo de la Q_{max} . El apagamiento de la fluorescencia tiene como defecto el cálculo de la Q_{max} para anticuerpos heterogéneos que vendría a ser el valor promedio de todos los anticuerpos diferentes que existen en la muestra. Al utilizar un anticuerpo homogéneo el valor de Q_{max} es idéntico para todos los anticuerpos, lo cual no tiene efecto para este caso

La IgA se tomó como una molécula patrón y sólo fué ensayada por apagamiento de la fluorescencia. Por el trazo que presenta se puede decir que es indicativo de NO interacciones, lo cual coincide con los valores de la relación de K_2/K_1 que son cercanos a 0.25 y los valores de β los cuales no cumplen con la condición del máximo, ya que son cercanos a uno Tabla VIII. Todo lo anterior coincide con lo reportado en la literatura para esta proteína.

La IgG₃ fué ensayada tanto por apagamiento como por diálisis y en ambos casos es evidente la presencia de un brazo ascendente que es sinónimo de cooperatividad (17,18), lo que a su vez concuerda con los estimados para las constantes del primero y segundo sitio activo (K_1 y K_2) cuya relación tiene un valor mayor de 0.5 y los valores de β que son mayores de 2 para la condición

del máximo. Los datos en las Tablas VIII y IX apoyan el que esta proteína sea cooperativa a diferencia de la IgA que no lo es.

Los valores de K_2 varían dependiendo del método utilizado para calcular los valores de $(B/H)_{max}$ y B_{max} , así como las ecuaciones utilizadas para calcularla. Sin embargo, todos los valores son consistentes con $K_2 = K_1/4$ (Tabla VIII). El valor de K_2 que menos varía es el que se obtiene por la ecuación 20 independientemente del método utilizado para calcular el máximo y el valor promedio de esta constante es cerca de 33 veces mayor de lo esperado sino hubiera interacciones. Este valor tan elevado nos da un indicio de la homogeneidad de la preparación y del grado de cooperatividad de la misma. Además el trazo obtenido es muy similar al de curvas teóricas en las que se trabaja con anticuerpos homogéneos y mezclas porcentuales de éstos. Entre sí tanto la curva de apagamiento como la de diálisis son muy similares lo cual descarta aún más el que este fenómeno sea producto de un artefacto experimental.

Tanto la IgA como la IgG₃ presentan trazos que descienden en una línea recta, lo cual coincide con los valores obtenidos para el índice de heterogeneidad (α) a partir de la ecuación de Sips. Estos valores apoyan aún más el que ambas proteínas son homogéneas, ya que son cercanos a uno y este valor para las γ -globulinas heterogéneas es menor de uno (0.7) Tabla VIII.

Para eliminar la disyuntiva de qué método y qué ecuación utili-

zar, se instrumentó el método de simulación y ajuste, siendo los valores obtenidos por este método los que describen mejor y más objetivamente a la curva experimental. Como puede observarse en la Fig. 22 se graficaron los valores obtenidos para cada método y para cada ecuación y aunque algunas de ellas describen bien a los puntos experimentales, el método de ajuste simulación es el mejor porque las desviaciones de los puntos experimentales son mínimas con respecto a la curva simulada.

Comparando los trazos de anticuerpos homogéneos y heterogéneos (cooperativos), las formas de los brazos ascendentes son diferentes, ya que para el caso de los heterogéneos el brazo ascendente se encuentra muy cerca del eje de las ordenadas y no intercepta en un punto definido en las abscisas, además de que no cae en un trazo rectilíneo. Mientras que para los anticuerpos homogéneos el máximo no está cerca al eje de las ordenadas e intercepta en un punto preciso en las abscisas, ya que cae en un trazo rectilíneo, lo que apoya que sea homogéneo.

El hecho de que dos inmunoglobulinas presenten trazos diferentes esto es, dos tipos de interacciones, una positiva y otra negativa, podría sugerir que en una respuesta inmune heterogénea no todas las poblaciones son de tipo cooperativo y que si este efecto no ha sido clásicamente demostrado podría ser debido a un enmascaramiento ya sea por que el número de clonas que secretan anticuerpos de tipo cooperativo sean muy reducidas o porque existan interacciones tanto positivas como negativas y lo que se llega

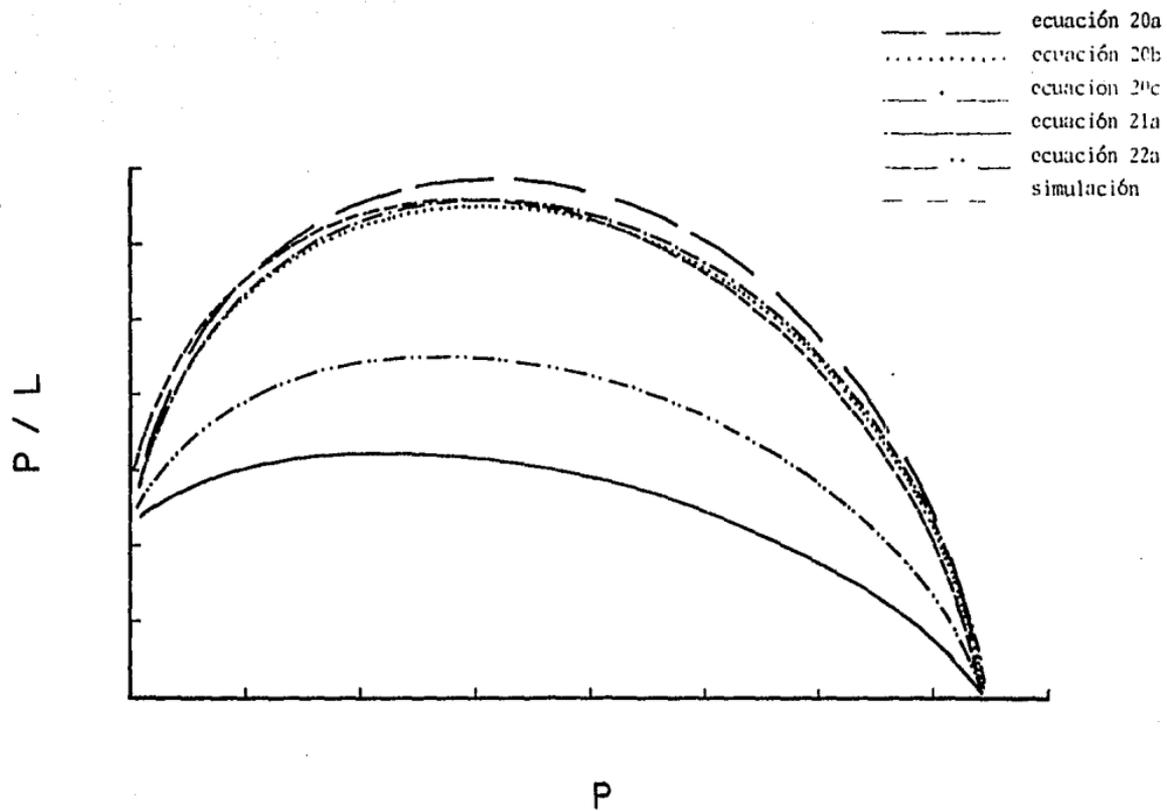


FIGURA 22

a observar es un efecto conjunto.

Sería importante clonar más híbridos y determinar la frecuencia de aparición de este fenómeno y de esta manera probar si es un efecto que presenta según la clase de inmunoglobulina y que es dependiente de su función o se puede presentar aleatoriamente. También se podrían mezclar anticuerpos cooperativos con anticuerpos homogéneos no cooperativos tratando de crear poblaciones con diferentes grados de heterogeneidad y así valorar el papel de la heterogeneidad en la aparición de interacciones.

Queda por demostrar si el brazo ascendente es resultado de cooperatividad entre los sitios activos de la molécula de inmunoglobulina; si esto es así los fragmentos monovalentes no mostrarán este efecto.

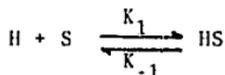
A N E X O

I

MODELO TEORICO

Sitios Activos Idénticos e Independientes en Anticuerpos Monovalentes.

Scartchard (62), postula que la interacción entre un solo activo del anticuerpo [S] y un hapteno monovalente [H] con constantes de asociación y disociación K_1 y K_{-1} en el equilibrio se puede representar:



De acuerdo a la ley de Acción de Masas, la velocidad de formación del complejo es proporcional a la concentración de los reactivos. Por lo tanto, la velocidad de asociación es $K_1[H][S]$ y la velocidad de disociación es $K_{-1}[HS]$. En el equilibrio ambas velocidades son iguales:

$$K_1 [H] [S] = K_{-1} [HS]$$

$$K_o = \frac{[HS]}{[H][S]} = K_1/K_{-1}$$

donde K_o = a la constante de afinidad en el equilibrio. Si la concentración total de sitios activos es S_o ; $[S]$ se puede sustituir por $([S_o] - [HS])$ en la ecuación anterior:

$$K_o = \frac{[HS]}{[H] ([S_o] - [HS])} \quad \text{y por rearrreglo}$$

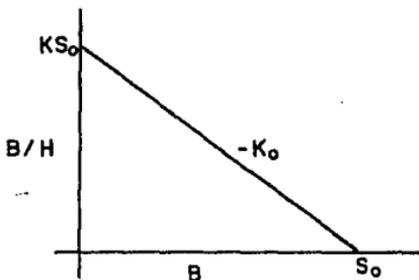
$$K_o ([S_o] - [HS]) = \frac{[HS]}{[H]} \quad \text{por tanto}$$

$$\begin{aligned} \frac{[HS]}{[H]} \quad \text{ó} \quad \frac{B}{H} &= K[S_o] - K[HS] \quad \text{ó} \\ &= K S_o - KB \end{aligned} \quad (1)$$

Esta ecuación tiene las siguientes propiedades:

a. Es la ecuación de una recta, ya que al graficar B/H ó $[HS]/[H]$ contra $[HS]$ ó B debe de dar una línea recta cuya pendiente es $-K_o$.

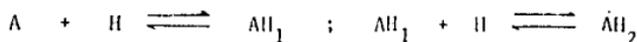
b. Cuando la concentración de ligando libre $[H]$ es muy pequeña $[HS]/[H]$ tiende a $K S_o$ o sea al producto de la concentración de todos los sitios activos por su constante de afinidad y cuando $[H]$ es muy grande $[HS]/[H]$ tiende a $[S_o]$ o sea la concentración de todos los sitios activos. Figura 23.



Sitios Activos Idénticos e Independientes en Anticuerpos Bivalentes.

Klotz. (32) da el siguiente tratamiento al caso en que una molécula bivalente se una a dos ligandos:

La molécula A es capaz de unirse a una o dos moléculas de H dando los complejos AH_1 y AH_2 o sea:



De aquí que las constantes de equilibrio medidas experimentalmente K_1 y K_2 están definidas así:

$$K_1 = \frac{[AH_1]}{[A][H]} = \frac{K_1}{K-1}$$

$$K_2 = \frac{[AH_2]}{[AH_1][H]} = \frac{K_2}{K-2} \quad \text{De aquí que ...}$$

$$AH_1 = K_1 [A] [H] \quad \text{y} \quad (2)$$

$$AH_2 = K_2 [AH_1] [H] \quad \text{pero } AH_1 = K_1 [A][H] \quad \text{entonces..}$$

$$AH_2 = K_2 K_1 [A] [H]^2 \quad (3)$$

y

$$[A] = [A_0] - [AH_1] - [AH_2] \quad \text{donde ...} \quad (4)$$

$[A_0]$ = concentración molar total de anticuerpos bivalentes y K_1 y K_2 son las constantes de afinidad experimentales de la primera y segunda reacción.

$$\text{Si } AH_1 = K_1 [A][H] \quad \text{y}$$

$$[A] = [A_0] - AH_1 - AH_2 ,$$

$$AH_2 = K_2 [AH_1] [H] \quad \text{entonces...}$$

$$AH_1 = \frac{K_1 [H] [A_0]}{1 + K_1 [H] + K_1 K_2 [H]^2} \quad (5)$$

y si

$$AH_2 = K_2 [AH_1] [H] = K_2 K_1 [A] [H]^2 \quad \text{y } [A] = [A_0] - AH_1 - AH_2$$

entonces .

$$AH_2 = \frac{K_1 K_2 [H]^2 A_0}{1 + K_1 [H] + K_1 K_2 [H]^2} \quad (6)$$

por lo tanto el ligando total (B_t) es:

$$B_t = AH_1 + 2AH_2 = \frac{K_1 A_0 [H]}{1 + K_1 [H] + K_1 K_2 [H]^2} + \frac{2K_1 K_2 A_0 [H]^2}{1 + K_1 [H] + K_1 K_2 [H]^2}$$

donde

$$B_t = \frac{K_1 A_0 [H] + 2K_1 K_2 A_0 [H]^2}{1 + K_1 [H] + K_1 K_2 [H]^2} \quad \text{y de aquí} \quad (7)$$

$$H = \frac{-K_1 (A_0 - B_t) \pm \sqrt{(K_1^2 (A_0 - B_t)^2 + 4B_t K_1 K_2 (2A_0 - B_t)}}{2K_1 K_2 (2A_0 - B_t)}$$

Se divide entre K_1 y se toma la raíz positiva de manera que

$H = 0$ cuando $B_t = 0$

$$H = \frac{B_t - A_0 + \sqrt{(A_0 - B_t)^2 + 4B_t K_2 / K_1 (2A_0 - B_t)}}{2K_2 (2A_0 - B_t)} \quad (8)$$

La relación de pegado sobre libre deriva de la ecuación (7)

$$B_t = AH_1 + 2AH_2 = \frac{K_1 A_o [H] + 2K_1 K_2 A_o [H]^2}{1 + K_1 [H] + K_1 K_2 [H]^2}$$

Dividiendo ambos términos de la ecuación entre H tenemos...

$$B_t = \frac{K_1 A_o + 2K_1 K_2 A_o [H]^2}{H} = B_t/H = \frac{K_1 A_o [H] + 2K_1 K_2 A_o [H]^2}{1 + K_1 [H] + K_1 K_2 [H]^2}$$

entonces,

$$B_t/H = \frac{K_1 A_o + 2K_1 K_2 A_o [H]}{1 + K_1 [H] + K_1 K_2 [H]^2} \quad (9)$$

y de H y B_t/H se puede obtener la pendiente que es:

$$\frac{d(B_t/H)}{dB_t} = \frac{d(B_t/H)}{dH} \cdot \frac{dH}{dB_t} = \frac{2K_2 - K_1 - 2K_1 K_2 H - 2K_1 K_2^2 H^2}{1 + 4K_2 H + K_1 K_2 H^2} \quad (10)$$

Cuando los sitios son idénticos y NO hay interacciones, Klotz ha demostrado que K_1 y K_2 están relacionadas a K y entre sí de la siguiente manera:

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

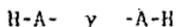
n = número total de sitios activos por molécula de proteína.

i = número de sitios ocupados por molécula en la i -ésima reacción.

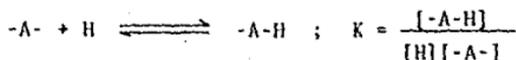
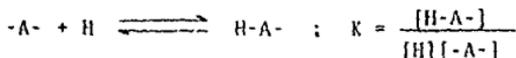
En el caso de anticuerpos monoméricos $n = 2$ e $i = 1$ ó 2 por lo tanto:

$$K_2/K_1 = 0.25 \quad (12)$$

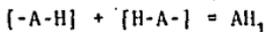
En ciertas situaciones K_1 y K_2 pueden estar relacionadas en forma sencilla. Si los dos sitios activos en A son idénticos en su afinidad intrínseca por H, pero son indistinguibles el uno del otro, se pueden designar para estos propósitos colocando a un enlace a la derecha y otro a la izquierda de A :



se puede considerar que cada una de estas especies mantiene su propio equilibrio con las especies componentes -A- y H, por lo tanto:



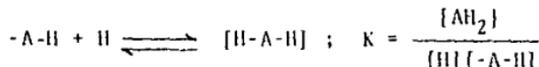
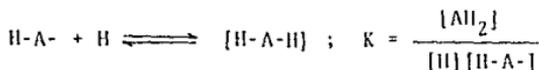
como los dos sitios son idénticos por su afinidad intrínseca por H, las constantes de equilibrio intrínsecas K , son la misma. Esta constante intrínseca se puede relacionar entonces con la constante experimental K_1 ó K_2 tomando en cuenta que:



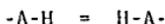
de aquí se deduce:

$$K_1 = \frac{[AH_1]}{[H][A]} = \frac{[-A-H] + [H-A-]}{[H][A]} = \frac{[-A-H]}{[H][A]} + \frac{[H-A-]}{[H][A]} = K + K = 2K$$

Por medio de un proceso similar se relaciona K_2 con la constante intrínseca (K). Ya que la formación de AH_2 ocurre de las siguientes maneras:



se puede inferir que ambas K son iguales, ya que los dos sitios son idénticos en su afinidad por H y se puede concluir que:



entonces,

$$K_2 = \frac{[AH_2]}{[AH_1][H]} = \frac{[AH_2]}{([-A-H] + [H-A-])[H]} = \frac{[AH_2]}{[2H-A-][H]} = K/2$$

De ambas ecuaciones y tomando en cuenta que los dos sitios en A son idénticos en su afinidad intrínseca por H y no hay interacciones entre ellas, las constantes experimentales K_2 y K_1 se relacionan de la siguiente manera:

$$K_1/K_2 = 2K/K/2 = 4 \text{ o su equivalente } K_2/K_1 = K/2/2K = 0.25$$

Si $K_1 = 4K_2$ ó $K_2 = 0.25 K_1$ en tal caso las ecuaciones (8) y

(9) resultan en:

$$H = \frac{B_t}{2K_2 (2A_o - B_t)} \quad (13)$$

y

$$B_t/H = \frac{4K_2A_o}{2K_2H} \quad (14)$$

De estas ecuaciones se puede obtener:

$$B_t/H = K_1A_o - 2K_2B_t \quad (15)$$

Una relación lineal entre B_t/H y B_t con un intercepto en el eje de las ordenadas igual al producto K_1A_o , un intercepto en el eje de las abscisas a $2A_o$ y una pendiente igual a $-2K_2$.

Esto quiere decir que en ausencia de interacciones, la suposición de que el anticuerpo sea una molécula bivalente no altera la linealidad de una gráfica de Scatchard.

Sitios Activos Idénticos con Interacciones en Anticuerpos Bivalentes.

Existen interacciones positivas cuando $K_2 > K_1/4$ e interacciones negativas cuando $K_2 < K_1/4$. En ambos casos la gráfica lineal se curva, para el caso de cooperatividad negativa hacia abajo y para el caso de cooperatividad positiva hacia arriba. Sin embargo, los interceptos no se alteran por las interacciones.

y como se puede deducir de la ecuación (9):

$$(B_t/H) \longrightarrow A_0 K_1 \quad (16)$$

cuando

$$H \longrightarrow 0$$

$$B_t \longrightarrow 0$$

y de la ecuación (8), considerando....

$$H \longrightarrow \infty$$

cuando

$$B_t \longrightarrow 2A_0$$

$$B_t/H \longrightarrow 0$$

Para anticuerpos bivalentes la condición para obtener un máximo en la gráfica de Scatchard es que $K_2 > K_1/2$. Esto se deduce a partir de la ecuación (10). Cuando

$$\frac{dB_t/H}{dB_t} = 0$$

Se obtiene que:

$$H = \frac{-K_1 + ([4K_1K_2 - K_1^2]^{1/2})}{2K_1K_2} \quad (17)$$

y $K_2 > K_1/2$ para que H tenga valores positivos, o sea que K_2/K_1 debe ser mayor de 0.5.

Para obtener las ecuaciones para el máximo, se sustituye la ecuación (17) en las ecuaciones (7) y (9); con lo que se

obtienen las coordenadas del máximo que son:

$$X = (B_t)_{\text{Max}} = \frac{\Lambda_0 (1 - [4K_1 K_2 - K_1^2])^{1/2}}{4K_2 - K_1} \quad (18)$$

$$Y = (B_t/H)_{\text{Max}} = \frac{2\Lambda_0 K_2 ([4K_1 K_2 - K_1^2])^{1/2}}{4K_2 - K_1} \quad (19)$$

En gráficas de Scatchard que presentan un máximo se pueden obtener estimados de K_1 y K_2 a partir de la ecuación (19).

$$K_2 = \frac{Y^2 + [|Y^2 [Y^2 - \Lambda_0^2 K_1^2] |]^{1/2}}{2\Lambda_0^2 K_1} \quad (20)$$

$$K_1 = \frac{4Y^2 K_2}{4\Lambda_0^2 K_2^2 + Y^2}$$

y de la ecuación (18):

$$K_2 = \frac{K_1}{4} - \left(\left(\frac{[\Lambda_0^2]}{(\Lambda_0 - X)^2} \right) + 1 \right) \quad (21)$$

$$K_1 = \frac{(\Lambda_0 - X)^2 4K_2}{\Lambda_0^2 + [\Lambda_0^2 - X]^2}$$

y las ecuaciones (18) y (19):

$$K_2 = \frac{Y}{2(A_0 - X)} \quad (22)$$

$$K_1 = 4 K_2 - \frac{2K_2X + Y}{2A_0K_2}$$

K_1 también se puede estimar del intercepto con el eje de las ordenadas, K_2 de la pendiente de la curva con el intercepto del eje de las abscisas y la relación K_2/K_1 del intercepto con el eje de las ordenadas y $(B_t/H)_{Max}$:

$$N = \frac{(B_t/H) B_t \rightarrow 0}{(B_t/H)_{Max}} \quad 6$$

$$N = \frac{K_1 A_0}{Y} \quad (23)$$

o de la ecuación (19):

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{1 + \{[1 - N^2]\}^{\frac{1}{2}}}{2(N)^2} \quad (24)$$

Otra manera de conocer el grado de cooperatividad es B en el modelo de Thakur y Delisi. (69)

Las ecuaciones para el cálculo de cooperatividad en receptores bivalentes homogéneos son:

A partir de la ecuación (21)

$$K_2 = K_1/4 \left(\frac{[A_0]^2}{[A_0 - X]^2} \right) + 1 \quad \text{ó} \quad 4K_2/K_1 = B = \frac{[A_0]^2}{[A_0 - X]^2} + 1$$

(25)

Este autor propone que:

$$\frac{r}{1-r} = (K[H])^a$$

linealizando la ecuación se tiene :

$$\log \frac{r}{1-r} = a \log K + a \log [H] \quad (26)$$

donde a , es un índice de heterogeneidad de los sitios de fijación.

Una gráfica de esta ecuación nos permite conocer el valor de la constante promedio de asociación K y la distribución de las constantes de afinidad individuales en la constante promedio de asociación.

A N E X O

II

H I B R I D O M A S

Los anticuerpos pueden utilizarse como instrumentos versátiles para el análisis y purificación de moléculas en mezclas complejas. Sin embargo, su utilidad había estado restringida por limitaciones en la especificidad de los antiseros convencionales. Tales limitaciones pueden superarse con el uso de la técnica de fusión celular para generar líneas celulares secretoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas).

Los tumores asociados con la producción de inmunoglobulinas son los llamados linfomas y los plasmacitomas. Ambos tumores representan derivados neoplásicos de varios tipos celulares dentro de las células del sistema inmunológico; la inmunoglobulina puede ser secretada o estar unida a la superficie celular o ambas.

Tabla X.

Los tumores productores de inmunoglobulina más ampliamente estudiados en ratón son los plasmacitomas, ya que parecen originarse de células especializadas de tal forma que pueden producir únicamente un solo tipo molecular de inmunoglobulina. Los plas

T A B L A X

TUMORES PRODUCTORES DE INMUNOGLOBULINAS EN RATONES^a

Inmunocitos normales de los cuales se originan los tumores	Producción de Inmunoglobulina		Designación patológica del tumor
	Superficie Celular	Secretora	
Linfocito B	+	-	Neoplasma linfocítico
Linfocito T	? ^b	-	Neoplasmas (leucemias)
Inmunoblastos	?	+	Leucemia celular plasmática, neoplasmas celular reticular tipo B ^c
Célula Plasmática	+ ^d	+	Plasmacitoma (mieloma)
Linfoplasmacito	?	+	Linfoma

a Tomada de Shevach, 1982 (65)

b No se ha demostrado convincentemente la presencia de inmunoglobulina sobre la superficie de los linfocitos T.

- Los neoplasmas de células T (leucemias en ratón) son los neoplasmas linforeticulares más comunes en ratón. En estos tumores no se ha demostrado la presencia de receptores para inmunoglobulinas.

c El neoplasma celular reticular tipo B es un tumor pleomórfico en la clasificación de Dunn. Este neoplasma contiene una mezcla de tipos celulares que pueden ser muy dendríticos y que están asociados con fibras reticulares.

d En algunos plasmacitomas se ha demostrado que tienen inmunoglobulinas en su superficie.

mucitomas son de origen monoclonal en base a la inmunoglobulina homogénea que produce cada tumor. Pueden inducirse experimentalmente en ratones de cepas singénicas. Merwin y Algire (41) fueron los primeros en inducir plasmacitomas en ratones de la cepa BALB/c, al probar la sobrevida de un tejido alogénico en cámaras de millipore implantadas en cavidad peritoneal. Posteriormente, se utilizaron otros agentes inductores como la mezcla adyuvante-estafilococo (53), aceite mineral (54), pritán (2,6,10,14-hexil octadecano). Este último fué aislado en 1917 por Tsujimoto del hígado de tiburón (3). Estudios posteriores han mostrado que su origen es probablemente biogénico ya que constituyete entre el 1-3% del cuerpo de varias especies marinas de copépodos.

Antes de 1964 se había tenido mucha dificultad en establecer líneas continuas de plasmacitomas murinos en cultivo. No fué sino hasta 1966 que Pettingill y Sorenson después de un cuidadoso período de adaptación pudieron establecer la línea X5563 (51). Esta línea había sido transplantada en ratón en 1956 y hasta la fecha produce la misma inmunoglobulina. Por el mismo tiempo Sachs y col. (55) adaptaron la línea MOPC-21 (P3) a cultivo, la cual producía grandes cantidades de IgG₁. Esta línea no pudo ser recuperada después de haber sido congelada. Posteriormente otra línea P3K fué establecida por Horibata y Harris (28) y al ser recuperada después de haber sido congelada se distribuyó a otros laboratorios. Por otro lado, Scharff y col. (63) establecieron la línea MPC-11.

Las líneas celulares P3 y MPC-11 fueron utilizadas para estudios de síntesis de inmunoglobulinas in vitro, así como en estudios de clonación y mutagénesis. Lo que dió por resultado la existencia de mutantes no secretoras. Por otro lado, Milstein (11) derivó una sublínea de P3 resistente a 8-azaguanina (8-aza), ahora llamada P3/X63-Ag8. Esta línea fué utilizada primeramente para estudiar fusión de dos células plasmáticas lo que reveló que las células híbridas producían ambas proteínas de mieloma, por lo que Köhler y Milstein (1975) fusionaron una célula plasmática normal con X63 y obtuvieron un resultado espectacular donde el híbrido producía tanto la proteína de la línea MOPC-21 como un anticuerpo contra glóbulos rojos de carnero. Debido a este estudio se les considera como los pioneros de la técnica de hibridación celular (hibridomas), la cual esencialmente "inmortaliza" células individuales formadoras de anticuerpos y permite la producción de cantidades ilimitadas de anticuerpos monoespecíficos homogéneos contra casi cualquier antígeno sin que necesariamente éste último esté puro. Además mostraron que la fusión entre una célula normal secretora de anticuerpo y una célula de mieloma, podía llevarse a cabo utilizando virus de Sendai. Las células resultantes continuaban secretando inmunoglobulinas de ambas células y retenían además las propiedades malignas del mieloma parental. Por lo tanto, debido a la naturaleza clonal de la respuesta inmune esta técnica podía resultar en la producción de anticuerpos absolutamente específicos.

FUSION CELULAR

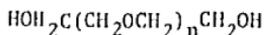
Durante la primera década del siglo XIX con el descubrimiento de las células multinucleadas, se dieron los primeros indicios de que podía ocurrir la fusión entre células somáticas. Sin embargo, a pesar de los adelantos en el siglo XIX los híbridos celulares no fueron descubiertos sino hasta 1960; de aquí en adelante el conocimiento acerca de este tema tuvo un gran avance que culminó con el desarrollo de la técnica de hibridomas.

Tabla XI.

Aunque gran parte de la importancia histórica de los estudios de células somáticas híbridas estaba basada en la fusión celular espontánea, actualmente se conoce que la fusión celular puede ser inducida por el uso de ciertos agentes, tales como los virus las lectinas y el polietilenglicol (PEG).

En 1974 el PEG fué introducido como un agente aglutinante para protoplastos de vegetales. También se observó un alto índice de fusión celular. Un año después Pontecorvo (52) lo experimentó en un sistema de células animales, obteniendo los mismos resultados por lo que propició su utilización como agente fusio-nante.

El PEG es un polímero de peso molecular elevado cuya estructura química se expresa como sigue:



T A B L A X I

CRONOLOGIA DE EVENTOS EN LA HISTORIA DE LA HIBRIDACION DE
CELULAS SOMATICAS

- 1960 Barski, Soricul y Cornefert (4,5), descubren híbridos celulares formados in vitro por fusión celular espontánea.
- 1957 Okada (44,45 y 46) demostró que el virus de Sendai
1962 inactivado con luz ultravioleta, puede usarse in vitro para fusionar y generar homocariotes. Soricul y Ephrussi (68), confirman los resultados de Barski y col.
- 1963 Gershon y Sachs (24) confirman los resultados de Barski y col.
- 1964 Littlefield (36), introduce el uso de células mutantes y medio de cultivo selectivo para la separación de células híbridas.
- 1965 Harris y Watkins (25), e independientemente Okada y Murayama (47), producen el primer heterocarión específico usando el virus de Sendai inactivado. Ephrussi y Weiss (20), producen el primer sincarión interespecífico por fusión espontánea.
- 1966 Yerganian y Nell (77), demostraron que el virus de Sendai puede usarse para producir híbridos. Davidson, Ephrussi y Yamamoto(14), usando células de melanoma y células no pigmentadas, demostraron que un marcador fenotípico de diferenciación histiotípica (p.e. pigmentación) puede irse eliminando selectivamente en los híbridos.
- 1967 Weiss y Green (74), descubrieron la eliminación preferencial de los cromosomas humanos en los híbridos ratón-humano y demostraron que este fenómeno puede usarse para mapear genes en el hombre. Watkins y Dulbecco (71), e independientemente Kropowski y col. (35), demostraron la liberación de virus cuando par-

tículas activas SV40 emergen de híbridos derivados de células transformadas permisivas.

- 1969 Harris, Klein y sus colegas (26), iniciaron experimentos donde mostraron que la malignidad no necesariamente domina en sincariones derivados de células normales y oncogénicas.
- 1970 Lucy y col (38), iniciaron los experimentos para inducir fusión celular con lectinas. Cocking y col. (58), posteriormente fusionaron protoplastos de plantas.
- 1971 Rudle, Bodmer, Miller, Siniscalco, Bootsma y col. (61), comenzaron con el uso sistemático de la hibridación celular como un sistema experimental para el mapeo de cromosomas humanos.
- 1972 Carlson, Smith y Dearing (9), produjeron un híbrido interespecífico de la fusión de protoplastos de plantas.
- 1975 Köhler y Milstein (33), desarrollaron la técnica de hibridoma como una fuente de anticuerpos homogéneos con actividad monoespecífica.

Además es un compuesto relativamente no tóxico para las células que produce una alta incidencia de fusión celular, la cual va en relación con su concentración y a su peso molecular. Se han obtenido mejores resultados cuando el PEG se usa a una concentración del 50% y con un peso molecular entre 300 y 6000 daltones. Esto sugiere que en el PEG hay un peso molecular mínimo (300) o un número mínimo de subunidades repetitivas (alrededor de 5), debajo de las cuales tiende a perder su actividad de agente fusionante. Existen otros factores como el pH y la densidad celular que pueden afectar la eficiencia de la fusión (15).

Para poder conocer algo sobre el mecanismo de fusión es necesario considerar la arquitectura de la membrana plasmática. La membrana plasmática está constituida en un 60-80% de proteínas, 20-40% de lípidos. En los años cincuentas se postuló un modelo conocido como el de Davson-Danielli-Robertson o modelo de la bicapa(16), en donde la membrana está constituida en su interior por lípidos, cuyos extremos hidrofílicos se encuentran orientados hacia afuera, y en donde ambos extremos se encuentran cubiertos por proteínas. Durante la década de los sesentas este modelo perdió popularidad ya que no explicaba fenómenos como la fusión, por su relativa ausencia de carbohidratos, su simetría bilateral rígida y su composición de proteínas en configuración B (31). El modelo que se acepta más ampliamente es el de la bicapa de lípidos. En este modelo, las proteínas de la membrana plasmática no están excluidas de la bicapa de lípidos la

cual se encuentra en estado fluído, permitiendo el movimiento extensivo de las proteínas bajo muchos estímulos. El modelo ha sido denominado modelo del mosaico fluído o modelo de Singer (66).

Además de lípidos y proteínas, la membrana plasmática contiene carbohidratos que se encuentran como azúcares neutros (galactosa, manosa y fucosa), aetilaminoazúcares o ácidos siálicos que generalmente se encuentran unidos covalentemente a lípidos y proteínas, por lo que juegan un papel importante en muchas funciones biológicas (75). Al encontrarse los carbohidratos en el exterior de la membrana plasmática están implicados en la fusión celular, lo cual se ve reforzado por los siguientes hechos: i) Son determinantes de la especificidad antigénica (grupos sanguíneos), ii) Son responsables de la carga negativa típica de las células a pH fisiológico, iii) Proveen los medios para el reconocimiento célula-célula, iv) Determinan los sitios receptores para virus, bacterias agentes aglutinantes e inductores de exocitosis y v) Son importantes en el control de la permeabilidad a iones.

Se ha observado que después de la fusión celular hay una mezcla rápida de los antígenos de la superficie celular. Este movimiento puede ser semejante al que se lleva a cabo con cationes divalentes como Ca^{++} , lectinas, anticuerpos o cationes multivalentes como los virus, efectuando un desplazamiento de receptores hacia un área y dejando libre otra, fenómeno conocido como "capping" en el caso de anticuerpos y lectinas. Además, las car

gas de las glicoproteínas contribuyen a despejar la superficie celular y permiten el acercamiento de las dos membranas durante la fusión (60). Por otro lado, Lucy, 1970 (38) ha sugerido que un cambio en los lípidos de la membrana, de bimolecular a micelial, favorece la fusión.

Dingle (17) en base a estudios sobre termodinámica de superficie ha postulado que la fusión de dos membranas que se ponen en contacto y que presentan alta tensión superficial es probable a menos que existan en el medio factores estabilizadores como proteínas. Todo parece indicar que el rearrreglo estructural de los lípidos no es suficiente para la fusión celular, ya que se requiere de un mecanismo que estabilice las membranas de tal forma que se preserve su estructura integral. Se ha sugerido que dicha actividad requiere de energía que en las células proviene de su actividad de ATPasa, del Na, del K, de la asociada a Ca^{++} y no de la proveniente de la mitocondria.

Al llevarse a cabo la fusión entre una célula normal y una célula tumoral, el cultivo será rápidamente sobrepasado numéricamente por las células tumorales y es necesario asegurarse de alguna manera que sólo los híbridos crezcan. La estrategia más popular descrita por Littlefield en 1964 (36), consistió en la selección de dos líneas celulares, una de ellas carente de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT) y la otra deficiente en la enzima timidina kinasa (TK).

La droga aminopterina bloquea la ruta principal de purinas y pi-

rimidinas y por lo tanto en su presencia las células que poseen las enzimas TK y HPGRT pueden sobrepasar el efecto tóxico de esta droga si el medio de cultivo contiene timidina e hipoxantina; estas últimas pueden ser metabolizadas directamente por las enzimas a nucleótidos (ruta primitiva). Sin embargo, las células TK⁻ y HPGRT⁻ carecen de esta ruta y por ende la síntesis de ADN cesa y la célula muere. Si estas células deficientes se fusionan con células normales los híbridos resultantes, al adquirir las enzimas de la célula normal pueden crecer en medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT).

Hasta la fecha se han reportado diferentes posibilidades de aplicación práctica para los anticuerpos monoclonales. A continuación se presentan algunos ejemplos.

APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS
MONOCLONALES

- Diagnóstico serológico y tipificación de tejidos
- Identificación y epidemiología de agentes infecciosos
- Identificación de antígenos tumorales, clasificación de leucemias y linfomas
- Identificación de subpoblaciones funcionales de células linfoides
- Inmunización pasiva contra agentes infecciosos
- Potenciación de rechazo de tumores
- Manipulación de la respuesta inmune
- Determinación de metástasis.

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

- 1.- Askonas, B.A., Williamson, A.R. y Wright, B.E.G. Selection of a single antibody-formation cell clone and its propagation in syngeneic mice. P.N.A.S. USA. 67 : 1398-1403, 1970.
- 2.- Augener, W., Gray, H.M., Cooper, N.R. y Müller-Eberhard, H. J. The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with C₁. Immunochemistry 8 : 1011-1020, 1971.
- 3.- Avigan, J., Milne, G.W.A. y Highet, R.J. The occurrence of pristane and phytane in man and animals. Biochem. Biophys. Acta 144 : 127-131, 1967.
- 4.- Barski, G., Sorreul, S. y Cornefert, F. Production dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires en association des cellules de caractere "hybride". C.R. Hebd. Seances. Acad. Sci. 251 : 1825-1827, 1960.
- 5.- Barski, G. "Hybrid" type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains. J. Natl. Cancer. Inst. 26 : 1269-1291, 1961.
- 6.- Bosma, M. y Keiler, E. The clonal nature of antibody formation. J. Immunol. 104 : 203-214, 1970.
- 7.- Boyse, E.A., Old, L.J. y Chouroulinkov, I. Cytotoxic test

for demonstration of mouse antibody. VI. Meth. Med. Res.

10 : 39-47, 1964.

- 8.- Carayon, P. y Carella, C. Evidence for positive cooperativity in antigen-antibody reactions. FEBS Letters 40 : 13-17, 1974.
- 9.- Carlson, P.S., Smith, H.H. y Dearing, R.D. Parasexual interspecific plant hybridization. P.N.A.S. USA. 69 : 2292-2294, 1972.
- 10.- 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 reaction of dinitrophenylated human serum albumin with anti-DNP and anti-HSA antibodies coupled to agarose. Immunochemistry 14 : 553-559, 1977.
- 11.- Cowan, N.J., Secher, D.S. y Milstein, C. Intracellular immunoglobulins chain synthesis in non-secreting variants of a mouse myeloma: Detection of inactive light-chain messenger RNA. J. Mol. Biol. 90 : 691-701, 1974.
- 12.- Croce, C.M., Sawicki, W., Kritchevsky, D. y Koprowski, H. Inductions of homokaryocyte, heterokaryocyte and hybrid formation by lysolecithin. Exp. Cell. Res. 67 : 427-435, 1971.
- 13.- Dahlquist, F.W. The quantitative interpretation of maximum in Scatchard plots. FEBS Letters 49 : 267-268, 1974.
- 14.- Davidson, R.L., Ephrussi, B. Y Yamamoto, K. Regulation of pigment synthesis in mammalian cells as studied by somatic hybridization. P.N.A.S. USA. 56 : 1437-1440, 1966.

- 15.- Davidson, R.L. y Gerald, P.S. Induction of mammalian somatic cell hybridization by polyethylene glycol. *Meth. Cell. Biol.* 15 : 325-338, 1977.
- 16.- Fox, C.F. The structure of cell membranes. *Sci. Am.* 226 : 2-10, 1972.
- 17.- Dingle, J.T. Vacuoles, vesicles and lysosomes. *Br. Med. Bull.* 24 : 141-145, 1968.
- 18.- Eisen, H.N., Michaelides, M.C., Underdown, B.J., Schulenbrug, E.P. y Simms, E.S. Myeloma proteins with antihapten antibody activity. *Fed. Proc.* 29 : 78-84, 1970.
- 19.- Eisen, H.N. y McGuigan, J.E. Quenching of antibody fluorescence by haptens and antigens: A method for determining antibody-ligand affinity. En *Methods in Immunology and Immunochemistry. III.* C.A., Williams y M.W., Chase, Eds. Academic Press, New York, 1971. pp. 395-406.
- 20.- Ephrussi, B. y Weiss, M.C. Interspecific hybridization of somatic cells. *P.N.A.S. USA.* 53 : 1040-1042, 1965.
- 21.- Fletcher, J.E., Spectorand, A.A. y Ashbrook, J.D. Analysis of macromolecule-ligand binding by determination of stepwise equilibrium constants. *Biochemistry* 9 : 4580-4587, 1970.
- 22.- Garvy, J.S., Cremmer, N.E. y Sussdorf, D.H. *Methods in Immunology.* W.A. Benjamin. USA. 1979. pp. 700.

- 23.- Gefter, N.L., Margulies, D.H. y Scharff, M.D. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somat. Cell. Genet.* 3 : 231-236, 1977.
- 24.- Gershon, D. y Sachs, L. Properties of a somatic hybrid between mouse cells with different genotypes. *Nature (London)*. 198 : 912-913, 1963.
- 25.- Harris, H. y Watkins, J.F. Behaviour of differentiated nuclei in heterokaryons of animals cells from different species. *Nature (London)*. 206 : 583-588, 1965.
- 26.- Harris, H., Miller, O.J., Klein, G., Worst, P. y Tachibara, T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature (London)* 223 : 363-368, 1969.
- 27.- Henney, C.S. y Ishizaka, K. Antigenic determinants specific for aggregated δ -globulins. *J. Immunol.* 100 : 718-725, 1968.
- 28.- Horibata, K. y Harris, A.W. Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp. Cell. Res.* 60 : 61-77, 1970.
- 29.- Jerne, N.K. y Nordin, A.A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140 : 405, 1963.
- 30.- Karush, F. The structural basis of antibody specificity. *Advn. Immunol.* 2 : 1-40, 1962.
- 31.- Kavanau, J.L. Structure and function in biological membranes I y II. Holden-Day. San Francisco. CA. pp 500. 1965.

- 32.- Klotz, I.M. Proteins interactions. En The proteins. I-B.727. Neurath y Bailey, eds. Academic Press, New York, 1953. pp.727-806.
- 33.- Köhler, G. y Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256 : 495-497, 1975.
- 34.- Köhler, G. Isoelectro focusing. Course on technology of hybridomas. Bello Horizonte, Brasil. 1979.
- 35.- Koprowski, H., Jensen, F.C. y Steplewski, Z. Activation of production of infectious tumor virus SV 40 in heterokaryon cultures. P.N.A.S. USA. 58 : 127-133, 1967.
- 36.- Littlefield, J.W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 145 : 709-710, 1964.
- 37.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275, 1951.
- 38.- Lucy, J.A. The fusion of biological membranes. Nature (London) 227 : 815-817, 1970.
- 39.- Macris, N.T. y Chase, M.W. Further studies on dinitrophenylation and picrylation of proteins. Fed. Proc. 24 : 185, 1965.
- 40.- March, S.C., Parikh, I. y Cuatrecasas, P.A. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography.

- graphy. Anal. Biochem. 60 : 149-152, 1974.
- 41.- Merwin, R.M. y Algire, G.H. Induction of plasma cell neoplasms and fibrosarcomas in BALB/c mice carrying diffusion chambers. Proc. Soc. Explt. Biol. Med. 101 : 437-439, 1959.
- 42.- Nabholz, M. Criopreservacion. Course on technology of hybridomas. Bello Horizonte, Brasil. 1979.
- 43.- O'Farrel, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250 : 4007-4021, 1975.
- 44.- Okada, Y. The fusion of Ehrlich's tumor cells caused by HVJ virus in vitro. Briken's J. 1 : 103-110, 1958.
- 45.- Okada, Y. Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. Exp. Cell Res. 26 : 98-107, 1962.
- 46.- Okada, Y. Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. II. Relationships between cell condition and fusion reaction or cell degeneration reaction. Exp. Cell Res. 26 : 119-128, 1962.
- 47.- Okada, Y. y Murayama, F. Multinucleated giant cell formation by fusion between cells of two different strains. Exp. Cell Res. 40 : 154-158, 1965.
- 48.- Ovary, Z. Y Taranta, A. Passive cutaneous anaphylaxis with

antibody fragments. *Science* 140 : 193-195, 1963.

- 49.- Pérez-Montfort, R. Cooperativity and antibody function. En: *Molecules, Cells and Parasites in Immunology*. C. Larralde, K. Willms, L. Ortíz-Ortíz, M. Sela. Eds. Academic Press. New York, 1980. pp. 29-42.
- 50.- Perutz, M.F. The haemoglobin molecule. *Proc. R. Soc. B.* 173 : 113-140, 1968.
- 51.- Pettingill, O.S. y Sorensen, G.D. Murine myeloma cells in suspension cultures. *Exp. Cell Res.* 47 : 608-613, 1967.
- 52.- Pontecorvo, G., Riddle, P.N. y Hales, A. Time and mode of fusion of human fibroblasts treated with polyethylene glycol. *Nature (London)* 265 : 257-258, 1977.
- 53.- Potter, M. y Robertson, C.L. Development of plasma cell neoplasms in BALB/c mice after intraperitoneal injection of parafin-oil adjuvant, heat-killed *Staphylococcus* mixtures. *J. Natl. Cancer. Inst.* 25 : 847-861, 1960.
- 54.- Potter, M., Boyce, C. Induction of plasma cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature* 193 : 1086-1087, 1962.
- 55.- Potter, M., Apella, E. y Geisser, S. Variations in the heavy polypeptide chain structure of gamma myeloma immunoglobulines from inbred strain of mice and a hypothesis as to their origen. *J. Mol. Biol.* 14 : 361-372, 1965.

- 56.- Potter, M. Antigen-binding myeloma proteins of mice. *Advn. Immunol.* 25 : 141-211, 1977.
- 57.- Porath, J., Axen, R. y Ernback, S. Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature (London)* 215 : 1491-1492, 1967.
- 58.- Power, J.B., Cummins, S.E. y Cocking, E.C. Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature (London)* 225 : 1016-1018, 1970.
- 59.- Rodbard, D. y Bertino, R.E. Theory of radioimmunoassays and hormone-receptor interactions. II. Simulation of antibody divalency, cooperativity and allosteric effects. En: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 36 : 327-341, 1973.
- 60.- Rosenblith, J.Z., Ukena, T.E., Yin, H.H., Berlin, R.D. y Karnovsky, M.J. A comparative evaluation of the distribution of Concanavalin A-binding sites on the surface of normal, virally-transformed and protease-treated fibroblasts. *P.N.A.S. USA.* 70 : 1625-1629, 1973.
- 61.- Ruddle, F.H., Chapman, V.M., Ricciuti, F., Murnane, M., Klebe, R. Y meera, Khan, P. Linkage relationships of seventeen human gene loci as determined by man-mouse somatic cells hybrids. *Nature (London), New Biol.* 232 : 69-73, 1971.
- 62.- Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51 : 660-672, 1949.
- 63.- Scharff, M.D., Bargellesi, A., Baumal, R., Buxbaum, J, m Coffino, P. y Lakov, R. Variations in the synthesis and assembly of

- immunoglobulins by mouse myeloma cells: A genetic and biochemical analysis. *J. Cell Physiol.* 76 : 331-348, 1970.
- 64.- Schulman, M., Wilde, C.D. y Köhler, G.A. A better cell line for making hybridomas secreting antibodies. *Nature* 276 : 269-270, 1978.
- 65.- Shevach, E.M., Stabo, J.D. y Green, I. Immunoglobulins and Θ -bearing murine leukemias and lymphomas. *J. Immunol.* 108 : 1146-1150, 1972.
- 66.- Singer, S.J. y Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 : 720-731. 1972.
- 67.- Sips, R. On the structure of a catalytic surface. *J. Chem. Phys.* 16 : 490-495, 1948.
- 68.- Sorieul, S. Y Ephrussi, B. Karyologicae demonstration of hybridization of mammalian cells *in vitro* . *Nature (London)* 190 : 653-654, 1961.
- 69.- Takur, A.K. y Delisi, C. Theory of ligand binding to heterogeneous receptor populations: Characterization of the free-energy distribution function. *Biopolymers* 17 : 1075- 1089, 1978.
- 70.- Velick, S.F., Parker, C.W. y Eisen, H.N. Energy transfer and quantitative study of antibody-hapten interactions. *P.N.A.S. USA.* 46 : 1470-1475, 1960.

- 71.- Watkins, J.F. y Dulbecco, R. Production of SV 40 virus in heterokaryons of trnasformed and susceptible cells. P.N.A.S. USA. 58 : 1396-1403, 1967.
- 72.- Weber, K., Pingle, J.R. y Osborn, M. Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS acrylamide gel. Meth. Enzimol. 26 : 315-335, 1972.
- 73.- Weintraub, B.D., Rosen, S.W., McCammon, J.A. y Perlman, R. L. Apparent cooperativity in radioimmunoassay of human corionic gonadotropin. Endocrinology 92 : 1250-1255, 1973.
- 74.- Weiss, M.C. y Green, H. Human-Mouse hybrid cell lines conataining partial complements of human cromosomes and functioning human genes. P.N.A.S. USA. 58 : 1104-1111, 1967.
- 75.- Whaley, W.G., Dauwalder, M. y Kephart, J.E. Golgi Apparatus: Influence on cell surfaces. Science 175 : 596-599, 1972.
- 76.- Williams, C.A. y Chase, M.W. Equilibrium dialysis. En: Methods in Immunology and Immunochemistry. III. Academic Press, New York, 1971. pp. 383-394.
- 77.- Yerganian, G. y Nell, M.B. Hybridization of dwarf hamster cells by U.V.-inactivated Sendai Virus. P.N.A.S. USA. 55 : 1066-1073, 1966.