

00362

10

1 ej

INMUNOQUIMICA Y FISIOLOGIA
COMPOSICION DE LOS COMPLEJOS ANTIGENO-ANTICUERPO Y
SU CAPACIDAD PARA DISPARAR FENOMENOS BIOLOGICOS

OCTAVIO MANUEL ROBINSON NAVARRO

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

1982

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	
ABREVIATURAS	
RESUMEN	i
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y METODOS	4
Aspecto Físico-Químico de la Reacción Antígeno-Anticuerpo	4
a) Efecto de la Concentración de Antígeno Polivalente en la Distribución de los Distintos Complejos Antígeno-Anticuerpo	4
- La Reacción en Ausencia de Competidor	4
- La Reacción en Presencia de Competidor Monovalente	5
- La Reacción en Presencia de Competidor Polivalente	7
b) Diálisis en Equilibrio	12
- Hapteno y Antígenos Polivalentes	15
1. Preparación de Antígenos	16
2. Preparación de Distintas Concentraciones de Hapteno	17
- Obtención de Anticuerpos	18
- Sistema de Reacción	18
1. Fijación de Hapteno sin Competidor	20
2. Fijación de Hapteno en Presencia de Competidor	22
Influencia de los Complejos Antígeno-Anticuerpo en Sistemas Biológicos	24
a) Efecto de la Valencia del Antígeno Polivalente en la Inhibición de la Reacción de Hemaglutinación Pasiva	24
- Sensibilización de Glóbulos Rojos de Carnero	26
- Obtención de Suero Anti-DNP ₂₉ BSA en Conejo	26
b) Efecto de la Valencia del Antígeno en la Inducción y Desencadenamiento de Hipersensibilidad cutánea Activa	27
c) Efecto de la Valencia del Antígeno en la Contracción del Músculo Liso Traqueal de Cobayo	29
- Diseño Experimental	29
- Sensibilización y Registros	30
- Antígenos	31
- Antisuero	31

III. RESULTADOS	32
Aspecto Físico-Químico de la Reacción Antígeno-Anticuerpo	32
a) Fijación de Hapteno en Ausencia de Antígeno Competidor	32
b) Fijación de Hapteno en Presencia de Antígeno Competidor	52
Influencia de los Complejos Antígeno-Anticuerpo, en Sistemas Biológicos	69
a) Inhibición de la Hemaglutinación Pasiva	69
b) Hipersensibilidad Cutánea Activa	72
c) Contracción del Músculo Liso Traqueal de Cobayo (Prueba de Schultz-Dale)	77
IV. DISCUSION	84
a) Diálisis en Equilibrio	84
b) Inhibición de la Hemaglutinación	87
c) Hipersensibilidad Cutánea Activa	88
d) Prueba de Schultz-Dale	89
V. BIBLIOGRAFIA	91

ABREVIATURAS

- Ag - antígeno
- Ab - anticuerpo
- Ag-Ab - antígeno-anticuerpo
- Ig - inmunoglobulina
- H - hapteno monovalente
- S - un sitio activo del anticuerpo
- k - constante de afinidad del hapteno por un sitio activo del anticuerpo
- r_H - proporción de sitios activos ocupados por hapteno
- $|S|_0$ - concentración molar total de sitios activos
- A - antígeno competidor
- K - constante de afinidad del antígeno competidor por un sitio activo del anticuerpo
- r_H^i - proporción de sitios activos ocupados por hapteno en presencia de un antígeno competidor
- r_A^i - proporción de sitios activos ocupados por el competidor
- \bar{i} - valencia promedio
- i - número de determinantes antigénicos ocupados por S
- α - es la valencia de A (número de moles de DNP conjugados a un mol de proteínas)
- $|SA|^i$ - concentración molar total de S ocupado por A
- $|HS|$ - concentración molar de sitios activos ocupados por H
- $|HS|^i$ - concentración molar de sitios activos ocupados por H en presencia de A
- p_i - es la relación existente entre $|AS_1|$ y cualquier $|AS_i|$
- $|P|$ - concentración molar de hapteno pegado a los anticuerpos
- L - concentración molar de hapteno libre
- DNP - dinitrofenol

DPM - desintegraciones por minuto
BSA - albúmina sérica bovina
 $^3\text{H-DNP-lis}$ - $\xi\text{-DNP-3,5-}^3\text{H-L-lisina}$
DNBS - ácido 2,4-Dinitrobencensulfónico
 K_2CO_3 - carbonato de potasio
PBS - regulador de fosfato-salina
(NaCl 0.15M, PO_4 0.01M; pH 7.2)
NCS* - solubilizador de tejidos, Amersham/Searle
PPO - 2-5-Difeniloxazol (Merck)
POPOP- 2-2'-p-Fenilen-bis(5-feniloxazol) (Merck)
FCA - adyuvante de Freund completo (Difco)
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - sulfato de amonio
CPM - cuentas por minuto
SRBC - glóbulos rojos de carnero
HSA - albúmina sérica humana
GGB - gama globulina bovina
R-K - ringer Krebs
HA - hemaglutinación
Inh - inhibidor
Tit - título de hemaglutinación

RESUMEN

En esta tesis analizamos algunos parámetros importantes de la reacción Ag-Ab involucrados en la formación de complejos inmunes, y la vinculación de la forma y tamaño de estos complejos en el disparo de diversos fenómenos biológicos. Los parámetros estudiados fueron la concentración de los reactantes y la valencia del Ag en distintos sistemas: fijación de hapteno en ausencia y presencia de un Ag competidor, inhibición de la reacción de hemaglutinación con antígenos distintamente substituidos, evocación de hipersensibilidad cutánea activa en cobayos inmunizados con distintas valencias, e inducción de la contracción del músculo liso traqueal de cobayo con diferentes complejos Ag-Ab.

En la fijación de hapteno en presencia de un competidor, se observó que al incrementar la concentración del competidor disminuyó la proporción de sitios activos ocupados por hapteno (r_H') y se incrementó la proporción de sitios activos ocupados por el Ag competidor (r_A'). Este efecto se vió más marcado cuando se utilizaron como antígenos competidores DNP_{10} BSA y DNP_{19} BSA, y menos con DNP_6 BSA.

En la distribución de los complejos Ag-Ab, se observó que el incremento en la concentración de Ag desplazó al complejo predominante hacia valores bajos de la valencia promedio (\bar{T}). Las valencias de los antígenos recalculadas por regresión de \bar{T} en $\log |A|_0$ no coincidieron con las valencias calculadas espectrofotométricamente.

En los experimentos de inhibición de la hemaglutinación con antígenos

diferentemente substituidos con un hapteno, se encontró que el grado de inhibición estaba relacionado con el número de grupos hapténicos portados por el aca-reador, de tal manera que a mayor substitución del Ag se obtenía mayor inhibición de la hemaglutinación.

Los resultados de hipersensibilidad cutánea activa en cobayos mostraron que los antígenos pobremente substituidos no evocaron hipersensibilidad mientras que los que tienen mayor número de determinantes antigénicos si lo hicieron, y el diámetro del eritema producido aumentó conforme se incrementaba la concentración de Ag hasta llegar a un máximo, permaneciendo constante aún a mayores concentraciones de Ag, lo cual sugiere la existencia de un complejo inmune óptimo.

En los estudios de la contracción del músculo liso traqueal de cobayo, se ensayaron tres parámetros: concentración del antisuero sensibilizante del músculo traqueal, la concentración del Ag y la valencia del mismo. De estas tres variables la que resultó claramente significativa fue la concentración del antisuero tanto en un análisis no paramétrico como en el análisis de variancia. La concentración de Ag y la valencia por si solos resultaron poco relevantes en este fenómeno en los dos tipos de análisis estadísticos, aunque en el análisis de variancia se observó que la interacción de la concentración de Ag con la valencia se acercaba a los límites de la significancia estadística. Usando la prueba de X^2 de Fisher de agregación de las probabilidades, las tres variables resultaron significativas. Ambos análisis sugieren la existencia de un complejo Ag-Ab óptimo para el disparo de la serie de eventos que termina en la contracción muscular.

Analizando los resultados en forma global podemos decir que la concentración de Ig fue el parámetro principal en la formación de complejos inmunes y del disparo de cada uno de los eventos biológicos revisados en este trabajo. La concentración del Ag y la valencia del mismo también fueron importantes en la formación de agregados moleculares óptimos, de manera variable para cada fenómeno estudiado. Concluimos que efectivamente, el disparo de cada fenómeno mediado inmunológicamente exige distintos eventos inmunes, aunque para una comprensión más exacta del papel de los complejos inmunes se deberán analizar rangos de valencia más bajos.

LISTA DE TABLAS

Tabla #		Página
I	Coefficientes de variación de la proporción de sitios ocupados (r_H)	23
II	Fijación de hapteno radiactivo en ausencia de competidor, experimento 1	33
III	Fijación de hapteno radiactivo en ausencia de competidor, experimento 2	34
IV	Fijación de hapteno radiactivo en ausencia de competidor, experimento 3	35
V	Fijación de hapteno radiactivo en ausencia de competidor, experimento 4	42
VI	Fijación de hapteno radiactivo en ausencia de competidor, experimento 5	43
VII	Fijación de hapteno radiactivo en ausencia de competidor, experimento 6	44
VIII	Constantes de afinidad intrínseca, concentración molar total de sitios activos e índice de heterogeneidad	51
IX	Fijación de hapteno radiactivo en presencia del competidor DNP ₆ BSA	53
X	Fijación de hapteno radiactivo en presencia del competidor DNP ₁₀ BSA	54
XI	Fijación de hapteno radiactivo en presencia del competidor DNP ₁₉ BSA	55
XII	Fijación de hapteno radiactivo en presencia del competidor DNP ₁₉ BSA	56
XIII	Resultados de inhibición de la hemaglutinación	70
XIV	Resultados de hipersensibilidad cutánea activa del grupo de cobayos inmunizado con DNP ₁₉ BSA	73
XV	Resultados de hipersensibilidad cutánea activa del grupo de cobayos inmunizado con DNP ₃₉ BSA	75
XVI	Análisis no paramétrico de las respuestas isométricas de los experimentos de Schultz-Dale	78
XVII	Análisis de variancia de las respuestas isométricas de los experimentos de Schultz-Dale	80

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación gráfica de la diálisis en equilibrio entre una solución de anticuerpos y hapteno	13
2. Inmunodifusión doble del sistema DNP_{19} BSA anti DNP_{21} HSA	19
3. Aparato para multidiálisis	21
4. Curva de fijación de hapteno en ausencia de competidor, experimento 1	36
5. Regresión lineal de Sips, experimento 1	37
6. Curva de fijación de hapteno en ausencia del competidor, experimento 2	38
7. Regresión lineal de Sips, experimento 2	39
8. Curva de fijación de hapteno en ausencia del competidor, experimento 3	40
9. Regresión lineal de Sips, experimento 3	41
10. Curva de fijación de hapteno en ausencia de competidor, experimento 4	45
11. Regresión lineal de Sips, del experimento 4	46
12. Curva de Fijación de hapteno en ausencia del competidor, experimento 5	47
13. Regresión lineal de Sips, del experimento 5	48
14. Curva de fijación de hapteno en ausencia del competidor, experimento 6	49
15. Regresión lineal de Sips, del experimento 6	50
16. Regresión de r_A^i y r_H^i en la concentración inicial de DNP_6 BSA	57
17. Regresión de r_A^i y r_H^i en la concentración inicial de DNP_{10} BSA	58
18. Regresión de r_A^i y r_H^i en la concentración inicial de DNP_{19} BSA	59
19. Regresión de r_A^i y r_H^i en la concentración inicial de DNP_{19} BSA	60
20. Distribución de los complejos antígeno-anticuerpo con DNP_6 BSA	61
21. Distribución de los complejos antígeno-anticuerpo con DNP_{10} BSA	62
22. Distribución de los complejos antígeno-anticuerpo con DNP_{19} BSA	63
23. Distribución de los complejos antígeno-anticuerpo con DNP_{19} BSA	64

24. Regresión de \bar{T} en $\log A _O$ con DNP_6 BSA	65
25. Regresión de \bar{T} en $\log A _O$ con DNP_{10} BSA	66
26. Regresión de \bar{T} en $\log A _O$ con DNP_{19} BSA	67
27. Regresión de \bar{T} en $\log A _O$ con DNP_{19} BSA	68
28. Inhibición de la hemaglutinación pasiva con tres antígenos distintamente dinitrofenilados	71
29. Efecto de la valencia y la dosis de antígeno en desencadenar fenómenos de hipersensibilidad cutánea en un grupo de cobayos inmunizado con DNP_{19} BSA	74
30. Efecto de la valencia y la dosis de antígeno en desencadenar fenómenos de hipersensibilidad cutánea en un grupo de cobayos inmunizado con DNP_{39} BSA	76
31. Efecto de la concentración de antígeno y la valencia en la respuesta de tensión de las preparaciones traqueales cuando se incuban con distintas concentraciones de antisuero	81
32. Efecto de la concentración del antígeno y del antisuero sobre la respuesta de tensión de las preparaciones traqueales cuando el antígeno porta distintas valencias	82

I

INTRODUCCION

La formación de complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ab) ocurre normalmente cuando los vertebrados se enfrentan a una molécula o partícula extraña (antígeno, Ag) capaz de inducir la síntesis de anticuerpos. Este proceso puede resultar benéfico para el huésped al neutralizar o eliminar algunas moléculas de naturaleza antigénica a través del sistema fagocítico mononuclear (1,2). Sin embargo, estos complejos inmunes, bajo ciertas condiciones, cambian su molecularidad y se depositan en vasos y tejidos produciendo lesiones múltiples por diversos mecanismos como activación del complemento, liberación de histamina, etc. (3). Todavía no está claro cual es la participación de los complejos inmunes en la regulación de la respuesta inmune y en su vinculación con el resto del organismo, pero sí que interactúan con receptores de inmunoglobulinas en la superficie de linfocitos T y B y macrófagos (4), logrando así ejercer presiones regulatorias sobre el sistema inmune y sobre otros sistemas orgánicos. En esta tesis examinamos la relación que existe entre los complejos inmunes y su capacidad para desencadenar distintos fenómenos biológicos a través de un complejo Ag-Ab óptimo.

La interacción de un Ag con el anticuerpo (Ab) respectivo produce múltiples complejos Ag-Ab, los que varían de tamaño, forma y calidad dependiendo de múltiples variables relacionadas con los reactantes y con el medio en el que ocurre la reacción. Entre las relacionadas con los reactantes sobresale la concentración y la valencia de los mismos y la afinidad y la clase de inmunoglobulina (Ig) involucrada. Entre las variables relacionadas con el medio en el que acontece la reacción Ag-Ab se distinguen el pH, la concentración de sales, la concentración de iones metálicos y la de las proteínas en solución (5,6,7,8).

En cuanto al Ag, son sus características fisicoquímicas valencia, peso molecular, y composición química, las más importantes. Así se ha visto que los Ag monovalentes no forman agregados (2,9) y se ha demostrado la influencia de la multivalencia del Ag en la constante de afinidad de la reacción Ag-Ab (10), y en la cantidad y afinidad de los Ab inducidos en la respuesta inmune primaria (11). La concentración relativa de los reactantes también determina el peso molecular de los complejos: en exceso de Ag ó en exceso de Ab. En exceso de Ag se obtienen complejos pequeños que no fijan complemento y que no desencadenan procesos inflamatorios, (2). Los complejos inmunes formados en exceso de Ab son grandes e insolubles, capaces de fijar complemento, pero también son rápidamente fagocitados, disminuyendo así su vida media y, por ende, su oportunidad de disparar eventos biológicos. (2).

Parece inescapable inferir del breve resumen anterior que el efecto biológico de la respuesta inmune (protección, daño, regulación) puede depender en buena medida del tipo de complejo inmune formado. Dilucidar las variables que determinan al complejo inmune, seguramente facilitará el entendimiento y el control de esta fenomenología.

Aquí se propone la formación de un complejo Ag-Ab óptimo, con características únicas en lo que respecta a peso molecular y composición química, para desencadenar cada uno de los diversos procesos mediados por complejos inmunes, tanto dañinos (enfermedad del suero, choque anafiláctico, lupus eritematosus sistémico, liberación de histamina, etc.) (2,3,12), como benéficos (fagocitosis, facilitación de la respuesta inmune, etc.) (1,13,14).

La demostración de esta hipótesis (formación de un complejo Ag-Ab óptimo) ayudaría a entender el mecanismo fisiológico de los fenómenos mediados por complejos inmunes, así como plantear algunas medidas para eliminar complejos Ag-Ab (15) cuando estos medien efectos nocivos.

El estudio de la formación de un complejo Ag-Ab óptimo se enfocó desde dos puntos de vista:

- a) El aspecto físico-químico de la reacción Ag-Ab.
- b) El papel de distintos complejos Ag-Ab en sistemas biológicos.

Para explorar el aspecto físico-químico de la reacción Ag-Ab en lo que se refiere a las condiciones que favorecen cierto tipo de complejos por distintas valencias del Ag se hicieron experimentos de diálisis en equilibrio. Para evaluar la participación de complejos inmunes de distintas composiciones en sistemas biológicos se hicieron experimentos de inhibición de la hemaglutinación pasiva, de hipersensibilidad cutánea activa, y de contracción muscular (ensayo de Schultz-Dale).

II

MATERIALES Y METODOS

ASPECTO FISICO-QUIMICO DE LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO

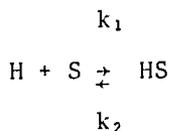
a) EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ANTIGENO POLIVALENTE EN LA DISTRIBUCION DE LOS DISTINTOS COMPLEJOS ANTIGENO-ANTICUERPO

El estudio de la reacción antígeno-anticuerpo se ve dificultado principalmente por la gran velocidad de la reacción, la polivalencia de los reactantes que resulta en múltiples productos y la habitual similitud físico-química entre el antígeno y el anticuerpo que dificulta la estimación de las concentraciones de los productos y reactantes durante el desarrollo y en el equilibrio de la reacción. Aquí proponemos un sistema para estudiar la distribución de los diferentes complejos antígeno-anticuerpo en el equilibrio de reacciones entre antígenos multi-substituidos con algún hapteno y anticuerpos antihapteno.

El método descansa en la competencia por los sitios activos del anticuerpo que se establece entre el antígeno conjugado y el hapteno radiactivo y en las ecuaciones de Klotz (16), para asociaciones múltiples.

LA REACCION EN AUSENCIA DE COMPETIDOR

La reacción del hapteno (H) monovalente con un sitio activo del anticuerpo (S) en ausencia de competidor es:



y la constante de afinidad (k):

$$k = \frac{k_1}{k_2} = \frac{|HS|}{|H| |S|} \quad (1)$$

La ecuación (1) también suele presentarse como la proporción de sitios activos ocupados por hapteno (r_H):

$$\frac{|HS|}{|S|_0} = r_H = \frac{k |H| |S|}{|S|_0} = \frac{k |H| (|S|_0 - |HS|)}{|S|_0}$$

$$r_H = k |H| (1 - r_H) = k |H| - k |H| r_H$$

$$r_H = \frac{k |H|}{1 + k |H|} \quad (2)$$

donde $|S|_0$ es la concentración molar total de sitios activos.

LA REACCION EN PRESENCIA DE COMPETIDOR MONOVALENTE

La adición al sistema de un competidor (A) monovalente con afinidad (K) por el sitio activo, modifica a r_H por su efecto en $|S|_0$

$$r'_H = k |H| \frac{(|S|_0 - |HS| - |AS|)}{|S|_0}$$

$$r'_H = k |H| (1 - r'_H - r'_A)$$

$$r'_H = \frac{k |H|}{1 + k |H| + K |A|} \quad (3)$$

y resulta en una disminución de r_H^1 con respecto a r_H por la aparición del producto $K |A|$, la constante de afinidad de A y la concentración de A libre, en el denominador de la ecuación (3).

También para el competidor:

$$r_A^1 = \frac{K |A|}{1 + K |A| + k |H|} \quad (4)$$

de tal suerte que:

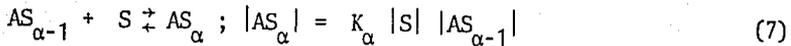
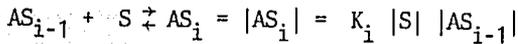
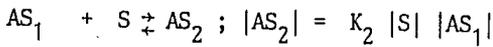
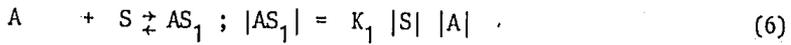
$$\frac{r_H^1}{r_A^1} = \frac{k |H|}{K |A|} \quad (5)$$

conociendo a k , la pendiente de la regresión lineal de r_H^1/r_A^1 en $|H|/|A|$ provee un estimado de K ó, si no, cuando menos, la relación entre ambas constantes.

LA REACCION EN PRESENCIA DE COMPETIDOR POLIVALENTE

Si A es polivalente entonces puede formar tantos complejos como valen-

cias tenga:



donde i es el número de determinantes antigénicos ocupados por S y α es la va-

lencia de A.

El efecto en r_H es ahora:

$$r_H' = k|H| \frac{(|S|_0 - |HS| - |AS_1| - \dots - |AS_2| - \dots - |AS_i| - \dots - |AS_\alpha|)}{|S|_0}$$

$$r_H' = k|H| (1 - r_H' - r_{A1}' - \dots - r_{A2}' - \dots - r_{Ai}' - \dots - r_{A\alpha}')$$

$$r_H' = \frac{k|H|}{1 + k|H| + K_1|A| + K_2|AS_1| + \dots + K_i|AS_{i-1}| + \dots + K_\alpha|AS_{\alpha-1}|} \quad (8)$$

de donde difícilmente se pueden extraer estimados confiables de $K_1, K_2, \dots, K_i, \dots, K_\alpha$ o $|AS_1|, |AS_2|, \dots, |AS_i|, \dots, |AS_\alpha|$.

Sin embargo, en el mismo sistema de competencia con el hapteno radioactivo se puede tener un estimado de la concentración molar total de S ocupado por A ($|SA|'$) que finalmente permitirá estimar las concentraciones de los productos a una concentración de S libre:

$$|SA|' = |HS| - |HS|' \quad (9)$$

donde $|HS|$ es la concentración de sitios activos ocupados por H en ausencia del competidor y $|HS|'$ es lo mismo pero en presencia del competidor. (Notar que $|SA|'$ no es la concentración de A unido a S).

Estimada así la cantidad de sitios activos ocupados por antígeno podemos preguntarnos por el valor de $|AS_i|$ ya que:

$$|SA| = |AS_1| + 2|AS_2| + \dots + i|AS_i| + \dots + \alpha|AS_\alpha| \quad (10)$$

y podemos conocer:

$$p_i = \frac{|AS_i|}{|AS_i|} \quad (11)$$

aplicando la ecuación de Klotz para las constantes de afinidad (K_i) de las reacciones de asociación múltiple (16):

$$K_i = \frac{\alpha - i + 1}{i} \cdot k$$

para obtener:

$$p_1 = \frac{|AS_1|}{|AS_1|} = \frac{K_1 |S| |A|}{K_1 |S| |A|} = \frac{\alpha k |S| |A|}{\alpha k |S| |A|} = 1$$

$$p_2 = \frac{|AS_2|}{|AS_2|} = \frac{K_1 |S| |A|}{K_1 K_2 |S|^2 |A|} = \frac{1}{((\alpha - 2 + 1)/2) k |S|}$$

$$p_3 = \frac{|AS_1|}{|AS_3|} = \frac{K_1 |S| |A|}{K_1 K_2 K_3 |S|^3 |A|} = \frac{1}{((\alpha-2+1)/2) ((\alpha-3+1)/3) k^2 |S|^2}$$

⋮

$$p_i = \frac{|AS_1|}{|AS_i|} = \frac{K_1 |S| |A|}{K_1 K_2 \dots K_i |S|^i |A|} =$$

⋮

$$\frac{1}{((\alpha-2+1)/2) ((\alpha-3+1)/3) \dots ((\alpha-i+1)/i) k^{i-1} |S|^{i-1}}$$

⋮

$$p_\alpha = \frac{|AS_1|}{|AS_\alpha|} = \frac{K_1 |S| |A|}{K_1 K_2 \dots K_i \dots K_\alpha |S|^\alpha |A|}$$

$$= \frac{1}{((\alpha-2+1)/2) ((\alpha-3+1)/3) \dots ((\alpha-i+1)/i) \dots ((\alpha-\alpha+1)/\alpha) \dots k^{\alpha-1} |S|^{\alpha-1}}$$

y, en general para $i > 1$:

$$p_i = \frac{|AS_1|}{|AS_i|} = \frac{i! \cdot (\alpha-i)!}{(\alpha-1)!} \cdot \frac{1}{k^{(i-1)} |S|^{(i-1)}} \quad (12)$$

Substituyendo las $|AS_i|$ por p_i la ecuación (10) es ahora:

$$|SA|' = |AS_1| + 2 \frac{|AS_1|}{p_2} + \dots + i \frac{|AS_1|}{p_i} + \dots + \alpha \frac{|AS_1|}{p_\alpha}$$

$$|AS_1| = \frac{|SA|'}{1 + 2/p_2 + \dots + i/p_i + \dots + \alpha/p_\alpha} \quad (13)$$

Conociendo $|AS_1|$ se resuelven ahora todas las p_i :

$$p_i = \frac{|AS_1|}{|AS_i|}$$

para $|AS_i|$.

Y así se estiman, a una concentración de S y A libres, las concentraciones de los distintos productos de la reacción. Claro que también se puede estimar la concentración libre de A pues solo es:

$$|A| = |A|_0 - (\Sigma |AS_i|) \quad (14)$$

b) DIALISIS EN EQUILIBRIO

En un sistema de diálisis en equilibrio (17, 18), los estimados pertinentes para resolver las ecuaciones (10, 11 y 12) se obtienen de la siguiente manera:

- a) La concentración de hapteno del lado de los anticuerpos representa a la suma del hapteno pegado a los anticuerpos ($|P|$) más el hapteno libre en solución ($|L|$), donde $|L|$ es la concentración de hapteno del lado sin anticuerpos.
- b) La concentración del hapteno pegado a los receptores, $|P|$, se calcula como la diferencia de concentraciones a cada lado de la membrana, (figura 1):

$$(|P| + |L|) - |L| = |P| .$$

Tomando estimados de $|P|$ a diferentes concentraciones de $|L|$ se puede calcular la constante de afinidad de la reacción entre el anticuerpo y el hapteno (k). Según la Ley de Acción de Masas y asumiendo que los anticuerpos son idénticos y que no hay interacción entre ellos:

$$\frac{|P|}{|L|} = k |S|_0 - k |P| ,$$

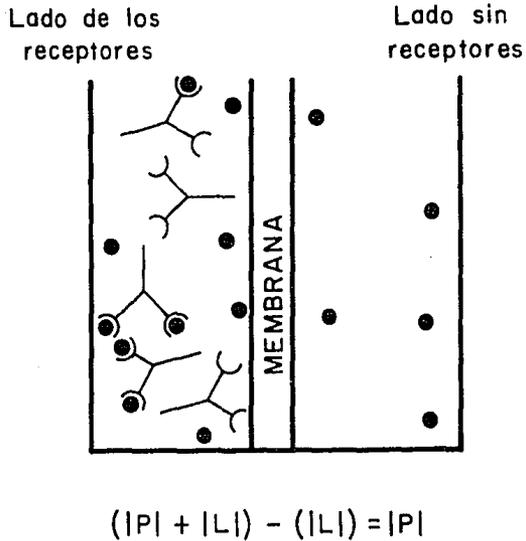


Figura 1. Representación gráfica de la diálisis en equilibrio entre una solución de anticuerpos y hapteno.

que es una línea recta cuya pendiente es igual a $-k$ y su intercepto es $(k \cdot |S|_0)$, donde $|S|_0$ es la concentración total de sitios activos en el sistema. Rara vez se obtiene una línea recta, lo que se ha explicado como resultante de una población heterogénea de anticuerpos (19). Así que la k estimada por este método no es confiable. $|S|_0$, en cambio, si es confiable pues se estima en el eje de las X cuando $|P| / |L| = 0$, entonces $|P| = |S|_0$, donde no aparece k .

Calculando r_H ($r_H = |P| / |S|_0$), la ecuación de Sips para sistemas heterogéneos (20,21), permite estimar k , la constante de afinidad promedio de los anticuerpos (22 y 23) (la que se obtiene cuando el 50% de los sitios activos están ocupados por el hapteno):

$$\frac{r_H}{n - r_H} = (k |L|)^a$$

$$\log \frac{r_H}{n - r_H} = a \log k + a \log |L|$$

donde n es la valencia de los anticuerpos (que se tomó igual a 1) y a es el índice de heterogeneidad de los anticuerpos.

Para los experimentos en presencia de competidor se elige una concentración inicial de hapteno que produzca valores de r_H cercanos a 0.5 o mayores y se agregan distintas concentraciones del competidor A en el lado de la membrana donde se colocan los anticuerpos.

La concentración de sitios activos unidos al competidor ($|SA|'$) es solo la diferencia entre los que se esperaban unidos al hapteno en ausencia del competidor ($|HS|$) y los que se encuentran en presencia del competidor ($|HS|'$):

$$|SA|' = |HS| - |HS|'$$

Ahora se procede a resolver las ecuaciones (12) para cada una de las p_i , la (10) para $|AS_1|$, y la (11) para todas las $|AS_i|$, en ese orden.

HAPTENO Y ANTIGENOS POLIVALENTES

En nuestro sistema el conjugado $DNP_\alpha BSA$ es el competidor de la reacción entre anticuerpos anti-DNP y ξ -DNP-3,5-³H-L-lisina (³H-DNP-lis) donde α es el número de moles de DNP conjugados a una mol de BSA (albúmina sérica bovina).

El determinante antigénico dinitrofenol (DNP) se eligió para estos estudios porque hay abundante información acerca de sus propiedades químicas e inmunológicas (24). La albúmina sérica bovina (BSA, Miles Research Laboratories) fue elegida como acarreador del DNP en la preparación de los conjugados $DNP_\alpha BSA$.

1. PREPARACION DE ANTIGENOS

Los diferentes $\text{DNP}_\alpha\text{BSA}$ se preparan siguiendo el método de Eisen (25), que consiste en variar la concentración de los reactantes, BSA y ácido 2,4-dinitro-bencensulfónico (DNBS) en K_2CO_3 al 2^o/. A la concentración deseada de DNBS 3 X cristalizado se agrega BSA para alcanzar 10 a 20 mg/ml. La reacción es protegida de la luz y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. El DNBS no acoplado se elimina por diálisis exhaustiva contra un regulador de fosfato-salina (PBS; NaCl 0.15 M, PO_4 0.01 M; pH 7.2), o por cromatografía en columna usando Sephadex G-25 grueso. La dinitrofenilación ocurre casi exclusivamente en los grupos ξ -amino de los residuos lisil y en los grupos amino terminal libres de las proteínas (25).

El α de los conjugados $\text{DNP}_\alpha\text{BSA}$ se estima como la concentración molar de DNP-lisina en el antígeno conjugado dividido por la concentración molar de BSA. La concentración molar de DNP-lisina se determina por densidad óptica del conjugado $\text{DNP}_\alpha\text{BSA}$ a 363 nm (el coeficiente de extinción molar de la DNP-lisina = 17530, (26)). La concentración de proteína se determina por la reacción de Nessler (27).

2. PREPARACION DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE HAPTENO

El hapteno utilizado en las reacciones de fijación fue $^3\text{H-DNP-lis}$ de New England Nuclear, con una actividad específica de 5.01 curies/mM. Se prepararon las siguientes soluciones de $^3\text{H-DNP-lis}$ en PBS:

Solución	$^3\text{H-DNP-lis}$ Conc. Molar	DPM/ml	CPM/100 μl	% Eficiencia
1	2×10^{-4}	390.7×10^6	14,285,700	36.6
2	1×10^{-4}	195.3×10^6	9,999,990	51.2
3	0.05×10^{-4}	97.6×10^6	5,131,573	52.9
4	0.25×10^{-4}	48.8×10^6	2,564,100	53.4
5	1.25×10^{-4}	24.4×10^6	1,298,919	54.1
6	6.25×10^{-6}	12.2×10^6	629,546	52.4
7	3.12×10^{-6}	6.1×10^6	326,256	53.4
8	1.56×10^{-6}	3.06×10^6	155,251	51.7
9	7.5×10^{-7}	1.53×10^6	80,627	53.7
10	3.7×10^{-7}	0.77×10^6	40,478	52.5
11	1.8×10^{-7}	0.39×10^6	20,211	51.8
12	9.6×10^{-8}	0.20×10^6	10,391	51.9

La radiactividad de las soluciones se estimó en 100 μl de cada una de ellas, más 0.4 ml de NCS*, más 15 ml de líquido de centelleo (4g PPO, 400 mg de POPOP por litro de tolueno) en un contador de centelleo líquido. El porcentaje promedio de eficiencia para estas soluciones fue de 51.3 que se igualó a 50% para facilitar los cálculos aritméticos.

OBTENCION DE ANTICUERPOS

Anticuerpos anti-DNP fueron obtenidos inyectando subcutáneamente un borrego con 5 mg de DNP_{21} HSA en 2.5 ml de PBS mezclado con 2.5 ml de Adyuvante de Freund Completo (FCA) de Difco en la primera inmunización. Luego, cada semana, durante 8 semanas, con la misma dosis de antígeno pero sin adyuvante. La respuesta inmune del borrego fue seguida a lo largo de la inmunización haciendo sangrado cada 8 días a partir de la primera inyección y estudiando el nivel de anticuerpos por inmunodifusión doble en gel de agar (28). Los sangrados 5o. y 6o. fueron seleccionados para todos los experimentos, atendiendo a la precipitación mostrada en inmunodifusión contra DNP_{19} BSA, (figura 2).

Las inmunoglobulinas del suero de los sangrados 5o. y 6o. fueron purificadas por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 33% de saturación, seguida de 4 ó 5 precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% (29). El precipitado final se disolvió en PBS y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eliminado por diálisis exhaustiva o pasando a través de Sephadex G-25 grueso.

La globulina purificada por este método, fue cuantificada por la reacción de Nessler (27).

SISTEMA DE REACCION

Se utilizó el método de diálisis en equilibrio que consiste en colocar a los

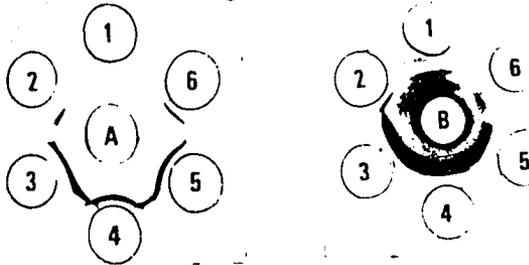


Figura 2. Inmunodifusión doble del sistema $\text{DNP}_{19}\text{BSA-anti-DNP}_{21}\text{HSA}$

1. Dilución	1:100	del conjugado	$\text{DNP}_{19}\text{BSA}$
2. "	1:100	"	"
3. "	1:200	"	"
4. "	1:400	"	"
5. "	1:800	"	"
6. "	1:1600	"	"

A. γ -globulina anti- $\text{DNP}_{21}\text{HSA}$ del quinto sangrado

B. " " sexto "

anticuerpos y al hapteno separados por una membrana permeable solo para el hapteno. Al término del tiempo necesario (68-72 hrs.) para que se equilibre la concentración de hapteno libre, se estima la radioactividad a ambos lados de la membrana, lo que provee con los estimados de hapteno libre y pegado, necesarios para la estimación de las constantes de afinidad.

1. FIJACION DE HAPTENO SIN COMPETIDOR

El experimento se lleva a cabo en un aparato para multidiálisis como el que se observa en la figura 3 (Hoefler Scientific Instruments) que permite montar hasta 24 cámaras de diálisis por experimento, todos con la misma concentración de anticuerpos pero con diferentes concentraciones de hapteno. Se colocan 100 μ l de una solución de anticuerpos en uno de los lados de cada una de las 24 cámaras del multidiálizador y del otro lado se colocan 100 μ l de cada solución de $^3\text{H-DNP-lis}$ por duplicado. Una vez completa esta operación, se pone a agitar en el cuarto frío (de 4° a 10°C) durante 68 a 72 hrs. aproximadamente. Al término de este período de incubación se extraen de cada cámara 50 μ l, se colocan en un vial, se adicionan 0.4 ml de NCS (Amersham Searle Corporation) y 15 ml de líquido de centelleo. Las CPM (cuentas por minuto) corregidas por eficiencia, dilución y actividad específica, obtenidas del lado de los anticuerpos, estiman la concentración de hapteno pegado más la del hapteno libre; las CPM del lado sin anticuerpo estiman la concentración de hapteno libre.

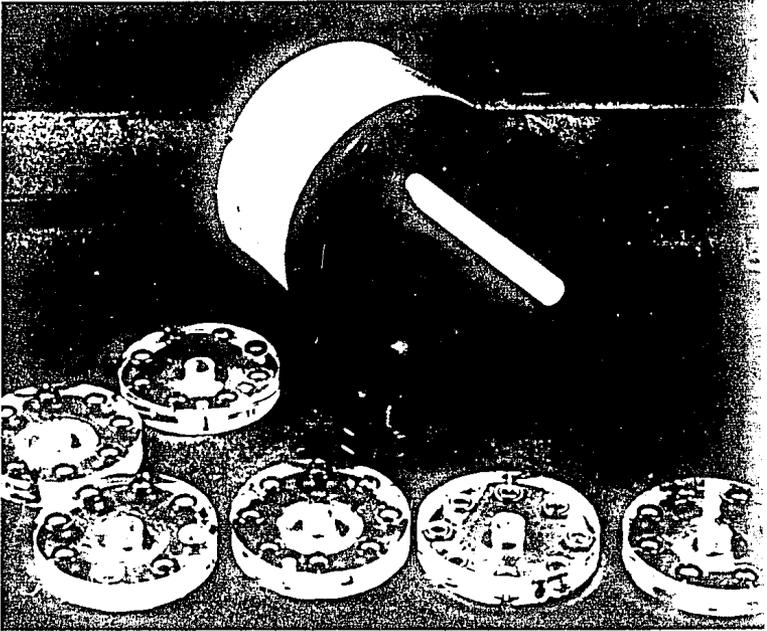
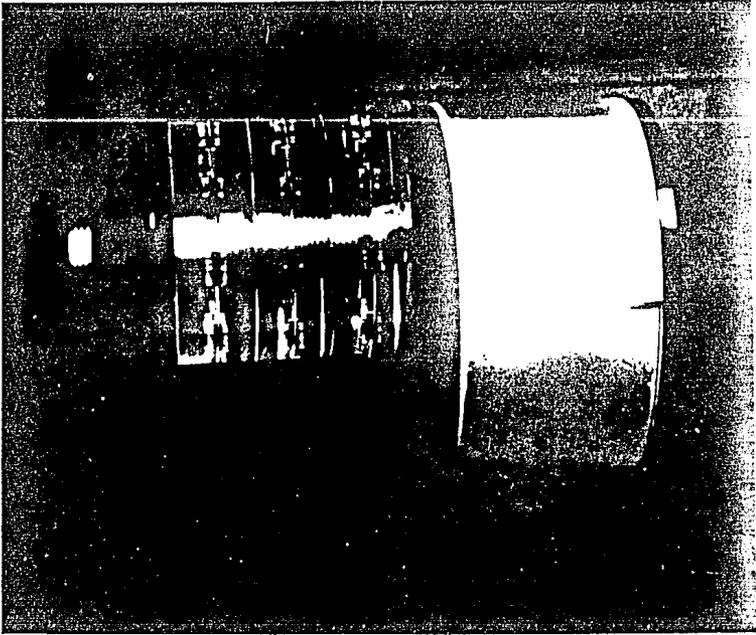


Figura 3. Aparato para multidiálisis.

2. FIJACION DE HAPTENO EN PRESENCIA DE COMPETIDOR

Los experimentos de competencia entre antígeno y hapteno se realizaron a una misma concentración de $^3\text{H-DNP-lis}$, aquélla que fuera lo suficientemente sensible para detectar cualquier variación en r_{H} por la presencia del competidor y cuya variación entre experimentos fuera mínima. La elección de la concentración ideal de $^3\text{H-DNP-lis}$ se hizo analizando el coeficiente de variación de r_{H} de cuatro concentraciones diferentes de $^3\text{H-DNP-lis}$ en tres experimentos con dos repeticiones por experimento. El coeficiente de variación más próximo a 0 indica un promedio máximo y una desviación estandar mínima. La solución No. 6 de $^3\text{H-DNP-lis}$ ($6.25 \times 10^{-6} \text{ M}$) fue la que mejor se ajustó a este criterio y la que se empleó en todos los experimentos de competencia (Tabla I).

Como competidores se utilizaron 3 antígenos con distinto grado de dinitrofenilación: DNP_6BSA , $\text{DNP}_{10}\text{BSA}$, $\text{DNP}_{19}\text{BSA}$ en las siguientes concentraciones molares en PBS:

Solución	A DNP_6BSA	A $\text{DNP}_{10}\text{BSA}$	A $\text{DNP}_{19}\text{BSA}$
1	-	-	-
2	$1.5 \times 10^{-11} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-11} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-11} \text{ M}$
3	$1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$
4	$1.5 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-9} \text{ M}$
5	$1.5 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-8} \text{ M}$
6	$1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$
7	$1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$
8	$1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$

TABLA I
COEFICIENTE DE VARIACION DE LA PROPORCION
DE SITIOS OCUPADOS (r_H)

Experimento	Concentración Molar de $^3\text{H-DNP-lis}$			
	$0.25 \times 10^{-4}\text{M}$	$1.25 \times 10^{-5}\text{M}$	$6.25 \times 10^{-6}\text{M}$	$3.12 \times 10^{-6}\text{M}$
1	0.840 0.870	0.525 0.600	0.360 0.350	0.240 0.240
2	0.667 1.321	0.566 0.241	0.502 0.407	0.312 0.312
5	0.832 0.778	0.609 0.734	0.451 0.405	0.352 0.375
r_H Promedio \bar{X}	= 0.884	= 0.545	= 0.412	= 0.305
Variancia σ^2	= 0.0423	= 0.226	= 0.0027	= 0.0026
Desviación Estandar σ	= 0.205	= 0.150	= 0.052	= 0.051
Error Estandar σ/\sqrt{n}	= 0.0836	= 0.0612	= 0.0212	= 0.0208
Coefficiente de Variación $\frac{\sigma}{\bar{X}}$	= 0.2319	= 0.2752	= 0.1262	= 0.1672

INFLUENCIA DE LOS COMPLEJOS Ag-Ab EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

a) EFECTO DE LA VALENCIA DEL ANTIGENO EN LA INHIBICION DE LA REACCION DE HEMAGLUTINACION PASIVA

La inhibición de la hemaglutinación pasiva es una técnica que se usa para la detección de bajas concentraciones de antígeno en fluidos biológicos (suero, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.). Básicamente consiste en la competencia que se establece por los sitios activos de un anticuerpo entre un antígeno inmovilizado en una superficie inerte (glóbulos rojos de carnero) (30), y un antígeno o hapteno soluble. La molécula inhibidora debe tener una estructura idéntica o muy similar al determinante específico unido al glóbulo rojo. El grado de inhibición está relacionado no únicamente a la cantidad de inhibidor, sino también a su afinidad por los sitios del anticuerpo (31). En la literatura existen datos que apoyan la idea de que al incrementar la valencia del antígeno (número de moles de DNP/Mol de proteína) se aumenta su constante de afinidad aparente en la reacción con su anticuerpo (10).

Cuando una concentración de anticuerpos y un volumen constante de SRBC sensibilizados se hacen reaccionar en la presencia de varias concentraciones crecientes de inhibidor, la relación entre la proporción de SRBC aglutinados y la concentración de inhibidor usado, resulta en una curva sigmoideal, la cual puede ser transformada en una línea recta, tomando unidades de probabilidad o probits del % de SRBC aglutinados y el logaritmo de la concentración de inhibidor.

Basados en este argumento, preparamos tres antígenos con distinto grado de

dinitrofenilación (DNP₇HSA, DNP₁₃HSA y DNP₂₆HSA) para usar como inhibidores en la reacción de hemaglutinación pasiva, con la esperanza de que la capacidad inhibitoria de cada antígeno estuviera también relacionada con su valencia, es decir, que DNP₂₆HSA fuese mejor inhibidor que DNP₁₃HSA y éste a su vez mejor que DNP₇HSA.

La inhibición de la hemaglutinación se efectuó siguiendo el método de Stavisky (32). En placas de microtitulación se colocaron 25μl de cada una de las diluciones seriadas 1:2 del antisuero, las cuales se hicieron reaccionar con 25μl de cada una de las concentraciones de inhibidor. Se dejaron incubando 1 hora a temperatura ambiente, después se adicionaron 25μl de SRBC sensibilizados, se mezclaron y se dejaron 2 horas más a temperatura ambiente, para posteriormente leer el título de hemaglutinación, que se consideró como el logaritmo de la última dilución de antisuero en la cual se observa inhibición de la aglutinación.

Como control negativo se usó suero normal de conejo a las mismas diluciones que el suero inmune que se empleó como control positivo de hemaglutinación.

Los antígenos usados como inhibidores fueron: DNP₇HSA, DNP₁₃HSA y DNP₂₆HSA, a las siguientes concentraciones:

Solución No.	DNP ₇ HSA	DNP ₁₃ HSA	DNP ₂₆ HSA
1	$2.608 \times 10^{-4}M$	$2.608 \times 10^{-4}M$	$2.608 \times 10^{-4}M$
2	$2.608 \times 10^{-5}M$	$2.608 \times 10^{-5}M$	$2.608 \times 10^{-5}M$
3	$2.608 \times 10^{-6}M$	$2.608 \times 10^{-6}M$	$2.608 \times 10^{-6}M$
4	$2.608 \times 10^{-7}M$	$2.608 \times 10^{-7}M$	$2.608 \times 10^{-7}M$
5	$2.608 \times 10^{-8}M$	$2.608 \times 10^{-8}M$	$2.608 \times 10^{-8}M$
6	$2.608 \times 10^{-9}M$	$2.608 \times 10^{-9}M$	$2.608 \times 10^{-9}M$

Todas las diluciones se hicieron con amortiguador para hemaglutinación (Div. Becton, Dickinson and Company).

Los eritrocitos de carnero usados en estos experimentos fueron obtenidos de un borrego joven y recibidos en una solución de Alsevers (27), dejándolos envejecer en el cuarto frío (4°C) durante una semana para obtener la estabilización de los mismos, antes de efectuar la sensibilización.

SENSIBILIZACION DE GLOBULOS ROJOS DE CARNERO (SRBC)

La preparación de eritrocitos sensibilizados se efectuó siguiendo el método de Avrameas (30). Se disolvieron 21.7 mg / ml de DNP₁₀ GGB en 10 ml de amortiguador de fosfatos, a los cuales se les adicionó 0.5 ml de eritrocitos empacados y lavados 3 veces. Mientras la suspensión se estaba mezclando suavemente en un agitador magnético, se adicionó lentamente 1 ml de glutaraldehído (Sigma Chemical, Co) al 2.5% en solución acuosa y se continuó con la agitación 2 horas a temperatura ambiente. Después de transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron 5 veces en amortiguador de fosfatos para eliminar la proteína y el glutaraldehído que no reaccionaron.

OBTENCION DE SUERO ANTI-DNP₂₉ BSA EN CONEJO

Suero de conejo anti-DNP₂₉ BSA fue obtenido inyectando subcutáneamente 5 conejos de 2.5 Kg aproximadamente con 500µg de DNP₂₉ BSA/ml en FCA

(0.5 ml con la concentración de proteína adecuada más 0.5 ml de FCA), en la primera inmunización. Posteriormente, cada semana durante 6 semanas, con la misma dosis de antígeno pero sin adyuvante, después de la última inmunización, a los seis días se sangraron los conejos de la vena marginal de la oreja. El suero obtenido fue deplegado, calentándolo durante 30 minutos a 56°C. Y la presencia de anticuerpos se demostró por precipitación en capilar.

b) EFECTO DE LA VALENCIA DEL ANTIGENO EN LA INDUCCION Y DESENCADENAMIENTO DE HIPERSENSIBILIDAD CUTANEA ACTIVA

Ha sido demostrado que la valencia del antígeno es una variable fundamental en varios aspectos de la respuesta inmune:

1. Antígenos multivalentes inducen respuesta inmune y tolerancia a dosis más bajas que antígenos oligovalentes (33,34,35,36,37).
2. La molecularidad de los complejos antígeno-anticuerpo depende críticamente del número de sitios reactivos portados por cada molécula, (38).

Estas propiedades de los antígenos con distintas valencias han sido atribuidas a un incremento en la afinidad del antígeno por el receptor celular al aumentar la valencia, (34).

Otros autores (33) explican el efecto de distintas valencias en función de la molecularidad de los complejos antígeno-receptor que se pueden formar: a más

receptores unidos por molécula de antígeno, mayor habilidad para inducir tolerancia.

Considerando las observaciones anteriores decidimos explorar si la valencia del antígeno también era una variable que tuviera efecto sobre la hipersensibilidad cutánea activa. El modelo de hipersensibilidad cutánea activa resulta atractivo porque involucra a todos los mecanismos inmunológicos del animal de experimentación (Bazo, Timo, células T, células B, etc.), permitiendo estudiar el papel de la valencia del inmunógeno en la inducción del estado de hipersensibilidad así como en su evocación (12).

Se sensibilizaron en forma activa dos grupos de cinco cobayos con $100\mu\text{g}$ / ml de $\text{DNP}_{19}\text{BSA}$ y $\text{DNP}_{39}\text{BSA}$ en FCA vía cojinete plantar y se dejó un control sin sensibilizar en cada grupo. A los quince días se dió un refuerzo con la misma dosis inicial de antígeno pero sin FCA a cada uno de los grupos. A los siete días del refuerzo se inyectaron todos los cobayos sensibilizados y un cobayo control, con $12.5\ \mu\text{g}$ en 0.1 ml de $\text{DNP}_{15}\text{HSA}$ en la cara interna del muslo, vía intradérmica, para probar si ya estaban sensibilizados. Posteriormente se procedió a depilar el dorso de los animales, para inyectar intradérmicamente cuatro concentraciones diferentes (2, 4, 8 y $12\ \mu\text{g}/\text{ml}$) de los siguientes antígenos: HSA, DNP_5HSA , $\text{DNP}_{15}\text{HSA}$ y $\text{DNP}_{28}\text{HSA}$. La respuesta fue medida 4 horas después evaluando el diámetro del eritema en la cara interna de la piel.

c) EFECTO DE LA VALENCIA DEL ANTIGENO EN LA CONTRACCION
DEL MUSCULO LISO TRAQUEAL DE COBAYO

Otro enfoque consistió en probar en un sistema biológico relacionado con la respuesta inmune los efectos de la molecularidad de la reacción Ag-Ab, determinada por distintas valencias de los antígenos. La prueba consistió en inducir la contracción del músculo liso traqueal de cobayo, sensibilizado por anticuerpos heterocitotrópicos (39), usando antígenos con diferentes valencias (40 y 41).

Los anticuerpos al asociarse a la membrana de ciertas células funcionan como receptores para el antígeno. Al formarse los agregados antígeno-anticuerpo se dispara un mecanismo de membrana, y éste a su vez, dispara a un mecanismo fisiológico intracelular de contracción o secreción, (42). Ya que el grado de acoplamiento de la interacción molecular varía con los determinantes antigénicos que se pueden introducir a un acarreador, proponemos que el efecto de excitación ha de variar de manera concomitante.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Como sistema biológico se utilizó el músculo liso de los anillos traqueales obtenidos de cobayos. Los anillos se sensibilizaron pasivamente *in vitro* con suero de conejo anti-DNP₂₉ BSA. Se prepararon 27 grupos formados por cinco anillos traqueales cada uno. Cada grupo fue sometido a la acción combinada de tres va-

riables: concentración de antisuero usada para la sensibilización pasiva de los músculos, dosis de antígeno aplicada para inducir la respuesta y la naturaleza del antígeno caracterizada por su relación hapteno-acarreador (valencia). Tres niveles de cada variable fueron estudiados: 0.1, 10 y 1000 μg de antisuero / ml; 1.8, 18 y 180 μg de antígeno / ml y las valencias 7, 13 y 26.

SENSIBILIZACION Y REGISTROS

El procedimiento de sensibilización consistió en incubar las preparaciones traqueales en las soluciones de anticuerpos mencionadas en la sección de diseño experimental, toda la noche a 4°C .

Para llevar a cabo los registros, cuatro preparaciones se colocaron simultáneamente en un baño de temperatura constante, (37°C), fijándolas por un extremo a un soporte rígido y por el otro a un transductor. Una tensión inicial de 0.5g fue aplicada a todas las preparaciones, mientras se les permitía llegar a una longitud constante y sensibilidad uniforme a una dosis de histamina estándar ($10\mu\text{g}/\text{ml}$). Durante este período de normalización se aplicaron dos ó tres dosis de histamina y después se efectuaron exhaustivos lavados con Ringer Krebs (R-K) (43). Posteriormente se administró la dosis de antígeno y la tensión desarrollada por el músculo se registró durante dos minutos. Después de este tiempo, las preparaciones se lavaron con R-K y una dosis final de histamina era aplicada. La magnitud de la contracción de Schultz-Dale se calculó en forma porcentual respecto a la dosis de histamina previa al desaffo con el antígeno.

ANTIGENOS

Los antígenos usados fueron los mismos que se emplearon en la inhibición de la hemaglutinación.

ANTISUERO

El antisuero usado en la sensibilización pasiva de los anillos traqueales también fue el mismo que se usó en la inhibición de la hemaglutinación.

III

RESULTADOS

ASPECTO FISICO-QUIMICO DE LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO

a) FIJACION DE HAPTENO EN AUSENCIA DE ANTIGENO COMPETIDOR

En total se hicieron seis experimentos de fijación de hapteno ($^3\text{H-DNP-lis}$) en ausencia de antígeno competidor: tres (1, 2 y 3) con anticuerpos provenientes del quinto sangrado, y tres (4, 5 y 6) con anticuerpos del sexto sangrado.

En las tablas II, III y IV y en las figuras 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos de los experimentos realizados con el quinto sangrado. Las Tablas V, VI y VII y las figuras 10, 11, 12, 13, 14 y 15 corresponden a los datos obtenidos con el sexto sangrado.

Las constantes de afinidad, concentración total de sitios activos e índice de heterogeneidad de los experimentos anteriores se encuentran en la tabla VIII.

Es evidente que cada experimento estima diferentes valores para los parámetros y que la principal fuente de variación radica en el origen de los anticuerpos, mientras que la variación entre experimentos es considerablemente menor.

El promedio de las k obtenidas con el sexto sangrado es 8.06×10^5 , que se aproximó a 1×10^6 para facilitar futuros cálculos. (Debe aclararse que estos estimados no se obtienen gráficamente, sino por el ajuste de líneas rectas a los datos por el método de mínimos cuadrados).

TABLA II.
EXPERIMENTO 1
FIJACION DE HAPTENO RADIOACTIVO EN AUSENCIA DE COMPETIDOR

CONCENTRACION MOLAR DE ³ H-DNP-LISINA	CPM ^a L	CPM ^a P+L	CPM ^a P+L-L	H x 10 ¹⁰	HS x 10 ¹⁰	P / L	r _H = HS / S ₀	log(r / (1-r))	log H x 10 ¹⁰
2 x 10 ⁻⁴ M	4166662	4,791900	625238	788400	117600	0.15	2.940		-4.103
2 x 10 ⁻⁴ M	4166662	4,347821	181159	788998	34303	0.04	0.857		-4.102
1 x 10 ⁻⁴ M	2,083035	2,325258	243223	393600	45600	0.11	1.365		-4.404
1 x 10 ⁻⁴ M	2,222091	2,499997	277906	420000	51600	0.12	1.290		-4.376
0.5 x 10 ⁻⁴ M	1,098759	1,408347	309558	207600	57600	0.28	1.440		-4.682
0.5 x 10 ⁻⁴ M	958028	1,176258	218230	181200	40800	0.22	1.020		-4.741
0.25 x 10 ⁻⁴ M	473715	653115	179400	88800	33600	0.37	0.840	0.720	-5.051
0.25 x 10 ⁻⁴ M	500838	685150	184312	94800	34800	0.36	0.870	0.825	-5.023
1.25 x 10 ⁻⁵ M	252088	366584	114496	46800	21000	0.45	0.525	0.043	-5.329
1.25 x 10 ⁻⁵ M	253949	384997	131048	48000	24000	0.51	0.600	0.176	-5.318
6.25 x 10 ⁻⁶ M	122149	204068	81919	22800	14400	0.67	0.360	-0.249	-5.642
6.25 x 10 ⁻⁶ M	105950	182957	77007	19200	14000	0.72	0.350	-0.268	-5.716
3.12 x 10 ⁻⁶ M	50289	104789	54500	8400	9600	1.08	0.240	-0.500	-6.075
3.12 x 10 ⁻⁶ M	59729	115603	55874	10800	9600	0.93	0.240	-0.500	-5.966
1.56 x 10 ⁻⁶ M	19690	57358	37668	3728	7132	1.90	0.178	-0.663	-6.428
1.56 x 10 ⁻⁶ M	19819	61497	41678	3752	7891	2.10	0.197	-0.609	-6.425
7.5 x 10 ⁻⁷ M	8168	32266	24098	1545	4562	2.95	0.114	-0.890	-6.810
7.5 x 10 ⁻⁷ M	8537	38352	29815	1616	5644	3.49	0.141	-0.784	-6.791
3.7 x 10 ⁻⁷ M	4300	15752	11452	813	2168	2.66	0.054	-1.241	-7.089
3.7 x 10 ⁻⁷ M	4945	19518	14573	936	2758	2.94	0.068	-1.130	-7.028
1.8 x 10 ⁻⁷ M	2515	9739	7224	475	1366	2.87	0.034	-1.451	-7.323
1.8 x 10 ⁻⁷ M	2702	9268	6566	511	1243	2.43	0.031	-1.494	-7.291
9.6 x 10 ⁻⁸ M	1898	6525	4627	358	876	2.43	0.021	-1.649	-7.446
9.6 x 10 ⁻⁸ M	2919	8947	6026	552	1141	2.06	0.029	-1.532	-7.258

TABLA III
EXPERIMENTO 2
FIJACION DE HAPTENO RADIOACTIVO EN AUSENCIA DE COMPETIDOR

CONCENTRACION MOLAR DE ³ H-DNP-LISINA	CPM* L	CPM* P+L	CPM* P+L-L	H x 10 ¹⁰	H _s x 10 ¹⁰	P / L	r _H = H _s / s ₀	log(r/1-r)	log H x 10 ¹⁰
2 x 10 ⁻⁴ M	3999996	4347821	347825	757438	65863	0.086	2.195		-4.120
2 x 10 ⁻⁴ M	3845996	4347821	501825	728277	95024	0.130	3.167		-4.137
1 x 10 ⁻⁴ M	1785366	2127657	342291	338076	64815	0.191	2.160		-4.470
1 x 10 ⁻⁴ M	1817752	2173780	356028	344209	67417	0.195	2.247		-4.463
0.5 x 10 ⁻⁴ M	915104	1052354	137250	173283	25989	0.149	0.862		-4.761
0.5 x 10 ⁻⁴ M	917662	1086569	168907	173768	31983	0.184	1.066		-4.760
0.25 x 10 ⁻⁴ M	472553	578315	105762	89481	20026	0.223	0.667		-5.048
0.25 x 10 ⁻⁴ M	401097	610465	209368	75951	39645	0.521	1.321		-5.119
1.25 x 10 ⁻⁵ M	253832	343512	89680	48064	16981	0.353	0.566	0.115	-5.318
1.25 x 10 ⁻⁵ M	247381	285700	38319	46843	7255	0.154	0.241	-0.496	-5.329
6.25 x 10 ⁻⁶ M	103423	184564	81141	19584	15364	0.784	0.512	0.021	-5.708
6.25 x 10 ⁻⁶ M	111349	175884	64535	21084	12219	0.579	0.407	-0.162	-5.676
3.12 x 10 ⁻⁶ M	57779	107261	49482	10940	9369	0.856	0.312	-0.342	-5.591
3.12 x 10 ⁻⁶ M	52338	101884	49546	9909	9381	0.946	0.312	-0.342	-6.003
1.56 x 10 ⁻⁶ M	19442	55590	36148	3680	6844	1.859	0.228	-0.529	-6.434
1.56 x 10 ⁻⁶ M	18786	47138	28352	3556	5367	1.509	0.178	-0.661	-6.449
7.5 x 10 ⁻⁷ M	9636	31411	21775	1824	4123	2.259	0.137	-0.797	-6.738
7.5 x 10 ⁻⁷ M	8852	30605	21753	1675	4118	2.457	0.137	-0.797	-6.776
3.7 x 10 ⁻⁷ M	5224	20265	15041	988	2847	2.879	0.094	-0.979	-7.005
3.7 x 10 ⁻⁷ M	5278	26692	21414	998	4054	4.057	0.135	-0.806	-7.000
1.8 x 10 ⁻⁷ M	3154	13502	10348	596	1958	3.280	0.065	-1.156	-7.224
1.8 x 10 ⁻⁷ M	2977	14805	11828	562	2239	3.973	0.074	-1.093	-7.250
9.6 x 10 ⁻⁸ M	2743	13876	11133	578	2107	4.058	0.070	-1.121	-7.285
9.6 x 10 ⁻⁸ M	3195	21183	17988	604	3405	5.630	0.113	-0.892	-7.218

TABLA IV
EXPERIMENTO 3
FIJACION DE HAPTENO RADIACTIVO EN AUSENCIA DE COMPETIDOR

CONCENTRACION MOLAR DE 3H-DNP-LISINA	CPM ⁿ L	CPM ⁿ P+L	CPM ⁿ P+L-L	H x 10 ¹⁰	Hs x 10 ¹⁰	P / L	r _H = Hs / s ₀	log(r / 1-r)	log H x 10 ¹⁰
2 x 10 ⁻⁴ M	4166663	4761900	595237	788998	112713	0.142	3.220		-4.102
2 x 10 ⁻⁴ M	4166663	4545450	378787	788998	71726	0.090	2.049		-4.102
1 x 10 ⁻⁴ M	2083331	2380933	297662	394498	56365	0.142	1.610		-4.403
1 x 10 ⁻⁴ M	2083331	2564100	480769	394498	91038	0.230	2.601		-4.403
0.5 x 10 ⁻⁴ M	1111094	1408449	297355	210396	56306	0.267	1.608		-4.676
0.5 x 10 ⁻⁴ M	1010053	1369862	359809	191263	68132	0.356	1.946		-4.718
0.25 x 10 ⁻⁴ M	528947	628824	153877	100160	29137	0.290	0.832	0.696	-4.999
0.25 x 10 ⁻⁴ M	495651	639571	143920	93855	27252	0.290	0.778	0.546	-5.027
1.25 x 10 ⁻⁵ M	260841	373458	112617	49392	21324	0.431	0.609	0.192	-5.306
1.25 x 10 ⁻⁵ M	246607	382387	135780	46696	25711	0.550	0.734	0.442	-5.330
6.25 x 10 ⁻⁶ M	119278	202723	83445	22856	15800	0.699	0.451	-0.084	-5.646
6.25 x 10 ⁻⁶ M	116385	191330	79945	22038	14191	0.643	0.405	-0.166	-5.656
3.12 x 10 ⁻⁶ M	52238	117362	65124	9891	12331	1.246	0.352	-0.264	-6.004
3.12 x 10 ⁻⁶ M	53695	123153	69458	10167	13152	1.293	0.375	-0.220	-5.992
1.56 x 10 ⁻⁶ M	22263	42507	20244	4215	3832	0.909	0.109	-0.910	-6.375
1.56 x 10 ⁻⁶ M	21314	68052	46738	4035	8850	2.192	0.252	-0.470	-6.394
7.5 x 10 ⁻⁷ M	11446	37961	26515	2167	5020	2.316	0.143	-0.776	-6.664
7.5 x 10 ⁻⁷ M	11023	41668	30645	2086	5802	2.780	0.165	-0.298	-6.680
3.7 x 10 ⁻⁷ M	6379	31534	25155	1207	4762	3.943	0.136	-0.802	-6.918
3.7 x 10 ⁻⁷ M	5254	17493	12239	994	2317	2.329	0.066	-1.149	-7.002
1.8 x 10 ⁻⁷ M	3346	16758	13412	632	2539	4.008	0.072	-1.106	-7.199
1.8 x 10 ⁻⁷ M	2958	12270	9312	559	1762	3.148	0.050	-1.275	-7.252
9.6 x 10 ⁻⁸ M	2240	12352	10112	423	1914	4.514	0.054	-1.237	-7.373
9.6 x 10 ⁻⁸ M	2655	8068	5413	501	1024	2.038	0.029	-1.521	-7.300

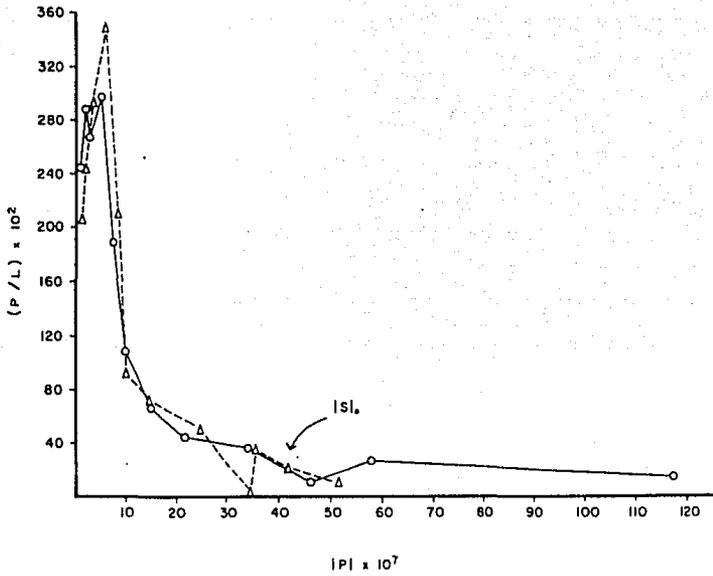


Figura 4. Curva de fijación de hapteno en ausencia de competidor, del experimento 1. La concentración total de sitios activos ($|S|_0$) es 40×10^7 M.

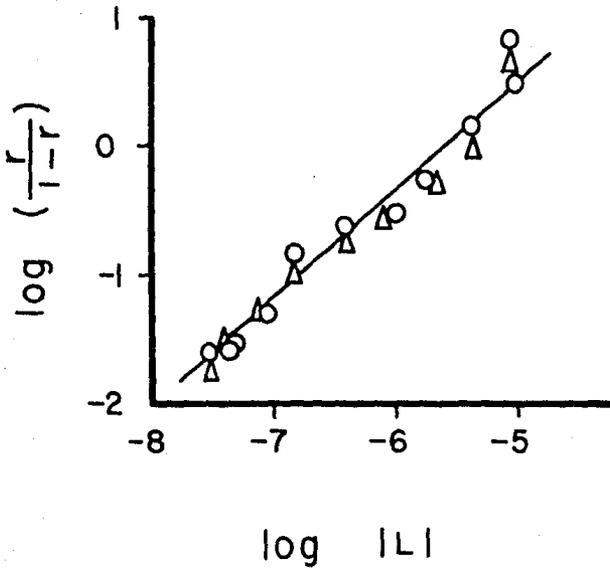


Figura 5. Regresión lineal de Sips del experimento 1:

$$\log \frac{r}{1-r} = 4.8397 + .8623 \log |L|$$

$$k = (10)^{4.8397/.8623} = 4 \times 10^5$$

$$a = .8623$$

$$r^* = .97, p < 0.01$$

* r es el coeficiente de correlación.

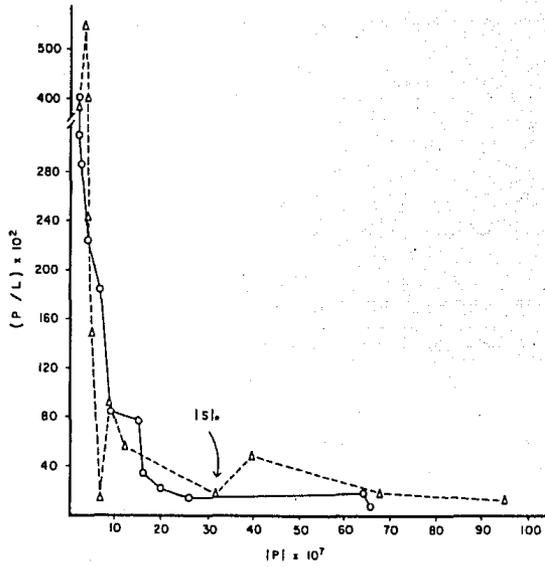


Figura 6. Curva de fijación de hapteno en ausencia de competidor, del experimento 2. La concentración molar total de sitios activos es $30 \times 10^{-7} M$.

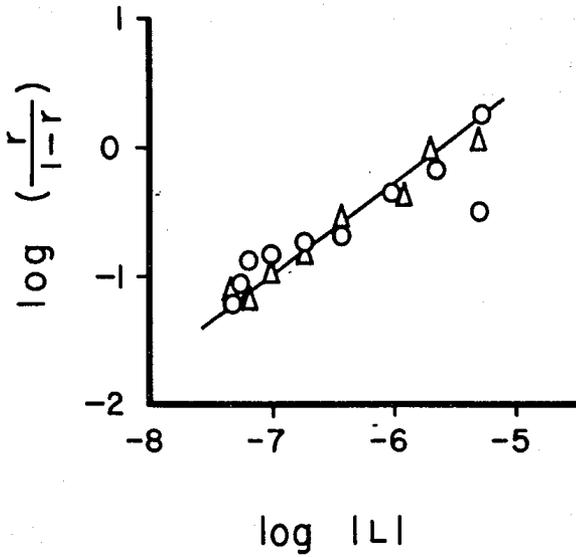


Figura 7. Regresión lineal de Sips del experimento 2:

$$\log \frac{r}{1-r} = 4.4886 + 0.7886 \log |L|$$

$$k = (10)^{4.4886/0.7886} = 4.0 \times 10^5$$

$$a = 0.7886$$

$$r = 0.95, p < 0.01$$

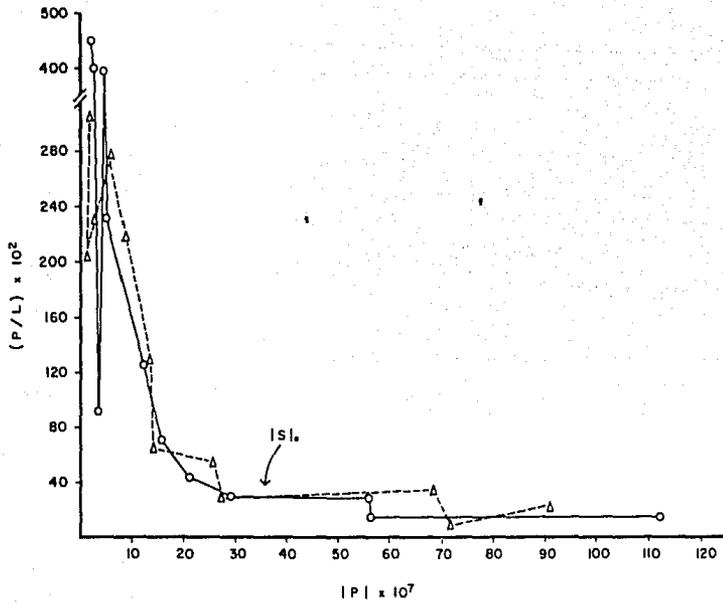


Figura 8. Curva de fijación de hapteno en ausencia de competidor, del experimento 3. La concentración molar total de sitios activos ($|S|_0$) es $35 \times 10^{-7} M$.

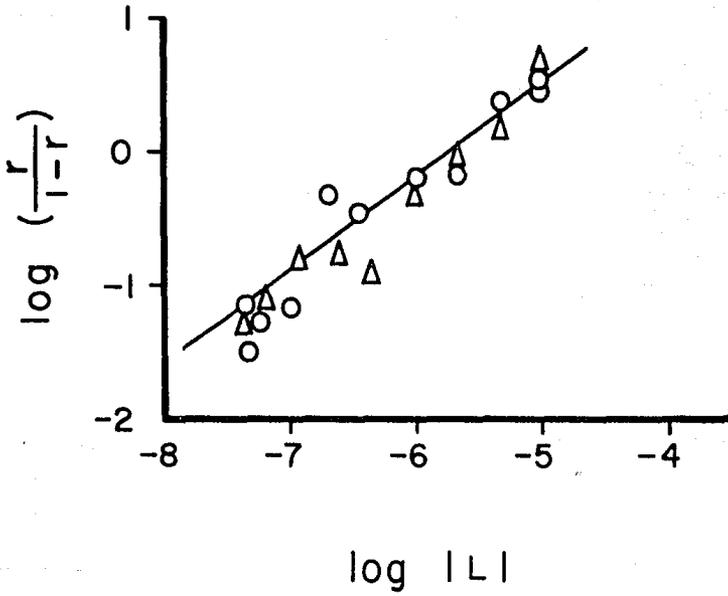


Figura 9. Regresión lineal de Sips del experimento 3:

$$\log \frac{r}{1-r} = 2.7482 + 0.5224 \log |F|$$

$$k = (10)^{2.7482/0.5224} = 1.8 \times 10^5$$

$$a = 0.5224$$

$$r = 0.92, P < 0.01$$

TABLA V
EXPERIMENTO 4
FIJACION DE HAPTENO RADIOACTIVO EN AUSENCIA DE COMPETIDOR

CONCENTRACION MOLAR DE ³ H-DNP-LISINA	CPM* L	CPM* P+L	CPM* P+L-L	H x 10 ¹⁰	HS x 10 ¹⁰	P / L	r _H = HS / S ₀	log(r / r-r)	log H x 10 ¹⁰
1.25 x 10 ⁻⁵ M	228389	472053	234664	43246	46140	1.066	0.769	0.522	-5.364
6.25 x 10 ⁻⁶ M	90526	279688	189432	17090	35870	2.098	0.597	0.171	-5.767
3.12 x 10 ⁻⁶ M	39722	152637	112915	7521	21380	2.842	0.356	-0.257	-6.123
1.56 x 10 ⁻⁶ M	17387	86700	69313	3291	13124	3.986	0.218	-0.554	-6.482
7.5 x 10 ⁻⁷ M	8564	48119	39555	1621	7489	4.618	0.124	-0.847	-6.790
3.7 x 10 ⁻⁷ M	4059	26473	22414	768	4243	5.522	0.070	-1.119	-7.114
1.8 x 10 ⁻⁷ M	2270	14138	11868	429	2246	5.228	0.037	-1.420	-7.367
9.6 x 10 ⁻⁸ M	1426	12276	10850	270	2054	7.608	0.034	-1.455	-7.568

TABLA VI
EXPERIMENTO 5
FIJACION DE HAPTENO RADIOACTIVO EN AUSENCIA DE COMPETIDOR

CONCENTRACION MOLAR DE $^3\text{H-DNP-LISINA}$	CPM ^a L	CPM ^a P+L	CPM ^a P+L-L	$ H \times 10^{10}$	$ HS \times 10^{10}$	$ P / L $	$r_H = HS / S _0$	$\log(r/1-r)$	$\log H \times 10^{10}$
1.25×10^{-5} M	204051	397163	193012	38658	36548	0.945	0.730	0.433	-5.412
6.25×10^{-6} M	87183	257507	170324	16508	32252	1.953	0.645	0.258	-5.782
3.12×10^{-6} M	36951	128758	91807	6996	17384	2.484	0.347	-0.274	-6.155
1.56×10^{-6} M	15355	67294	51939	2907	9834	3.382	0.196	-0.612	-6.536
7.5×10^{-7} M	8498	48200	39702	1608	7516	4.671	0.150	-0.754	-6.793
3.7×10^{-7} M	3918	20402	16484	741	3121	4.207	0.062	-1.180	-7.130
1.8×10^{-7} M	2618	16268	13650	495	2583	5.213	0.051	-1.126	-7.305
9.6×10^{-8} M	1594	8430	6836	301	1293	4.288	0.025	-1.585	-7.521

TABLA VII
EXPERIMENTO 6
FIJACION DE HAPTENO RADIOACTIVO EN AUSENCIA DE COMPETIDOR

CONCENTRACION MOLAR DE ³ H-DNP-LISINA	CPM ^a L	CPM ^a P+L	CPM ^a P+L-L	H x 10 ¹⁰	HS x 10 ¹⁰	P / L	r _H = HS / S ₀	log(r / 1-r)	log H x 10 ¹⁰
1.25 x 10 ⁻⁵ M	273910	525793	287883	45048	54504	1.210	0.851	0.758	-5.346
6.25 x 10 ⁻⁶ M	109673	293920	184247	20760	34884	1.679	0.545	0.078	-5.682
3.12 x 10 ⁻⁶ M									
1.56 x 10 ⁻⁶ M	17493	89131	71638	3312	13560	4.095	0.211	0.570	-6.479
7.5 x 10 ⁻⁷ M	7780	46566	38786	1464	7344	4.985	0.114	0.888	-6.834
3.7 x 10 ⁻⁷ M	4281	24879	20598	804	3900	4.811	0.060	2.189	-7.094
1.8 x 10 ⁻⁷ M									
9.6 x 10 ⁻⁸ M	1308	8589	7281	240	1368	5.566	0.021	2.664	-7.619

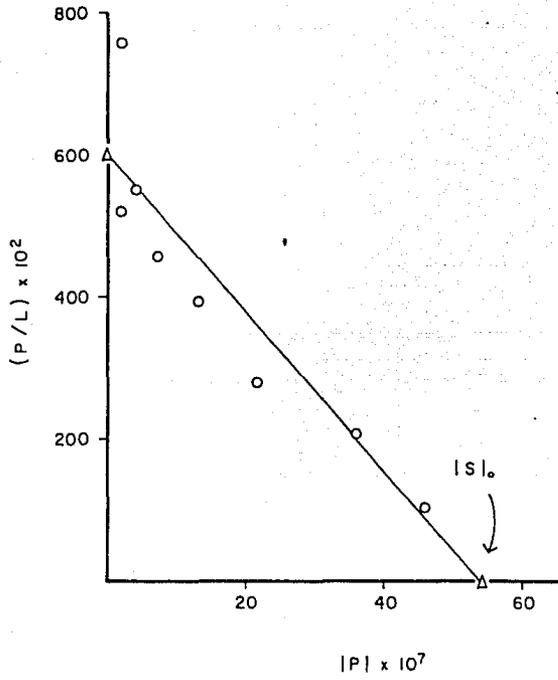


Figura 10. Curva de fijación de hapteno en ausencia de competidor, del experimento 4. La concentración molar total de sitios activos es $60 \times 10^{-7} M$.

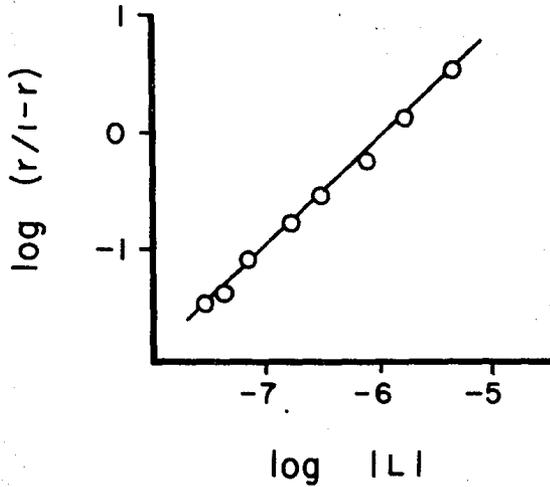


Figura 11. Regresión lineal de Sips, del experimento 4:

$$\log \frac{r}{1-r} = 5.4784 + 0.9297 \log |F|$$

$$k = (10)^{5.4784/0.9297} = 8.0 \times 10^5$$

$$a = 0.9297$$

$$r = 0.99, P < 0.01$$

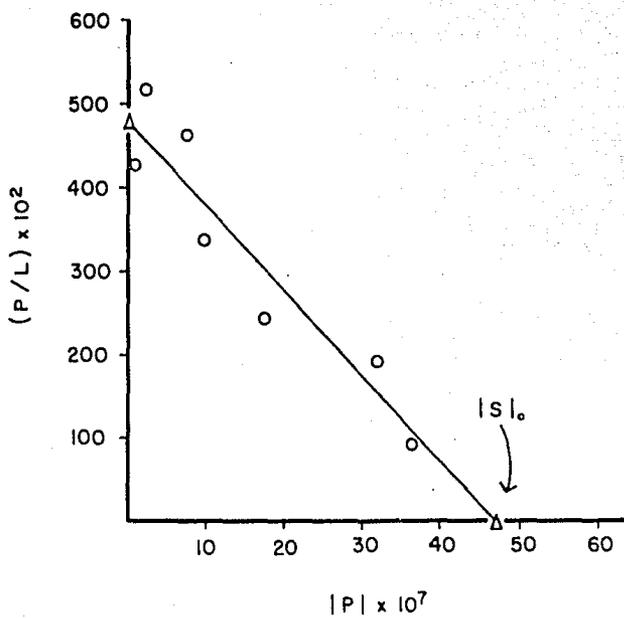


Figura 12. Curva de fijación de hapteno en ausencia de competidor, del experimento 5. La concentración molar total de sitios activos es $50 \times 10^{-7}M$.

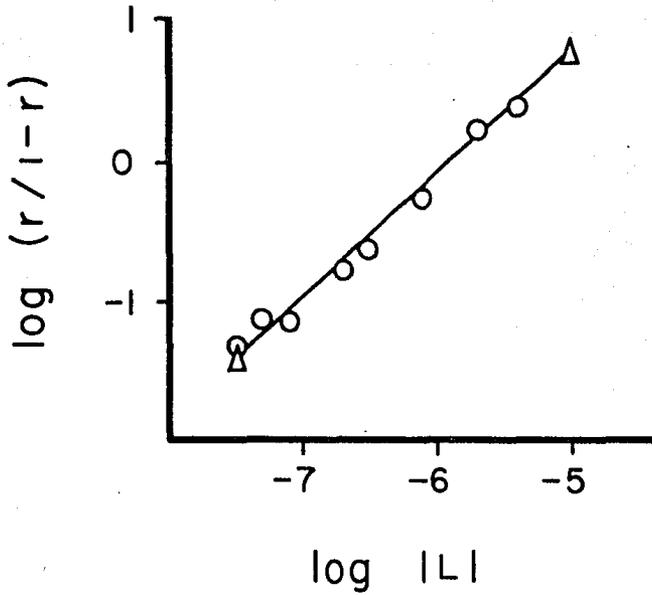


Figura 13. Regresión lineal de Sips, del experimento 5:

$$\log \frac{r}{1-r} = 5.5554 + 0.9363 \log |L|$$

$$k = (10)^{5.5554/0.9363} = 8.5 \times 10^5$$

$$a = 0.9363$$

$$r = 0.99, P < 0.01$$

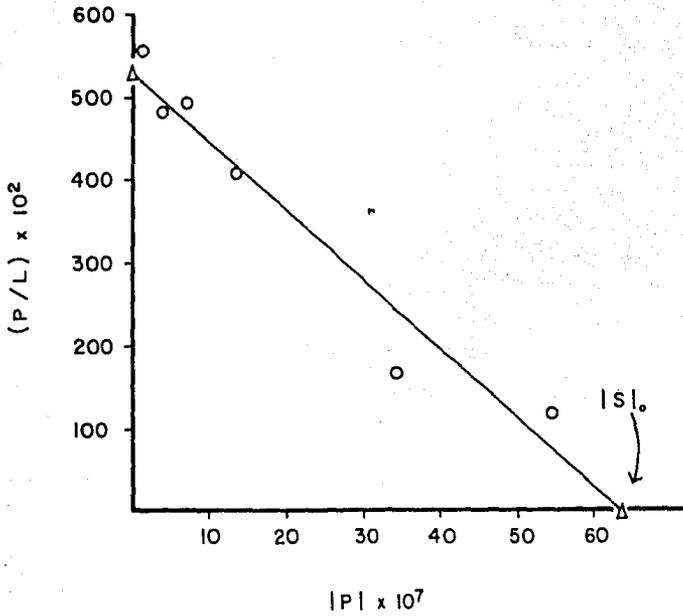


Figura 14. Curva de fijación de hapteno en ausencia de competidor, del experimento 6. La concentración molar total de sitios activos es 64×10^7 M.

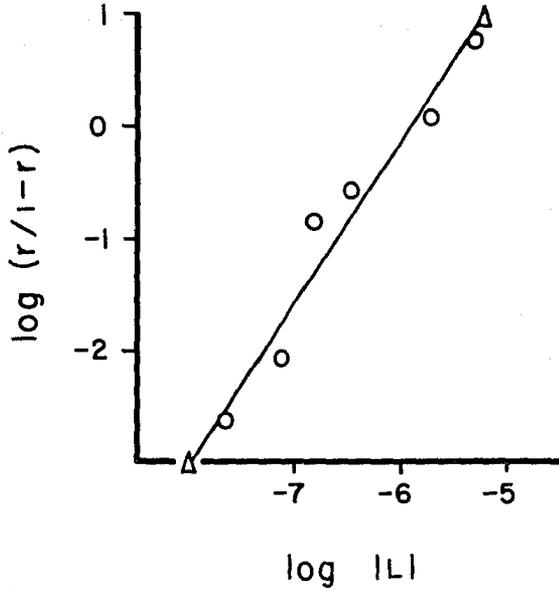


Figura 15. Regresión lineal de Sips, del experimento 6:

$$\log \frac{r}{1-r} = 8.6385 + 1.4672 \log |L|$$

$$k = (10)^{8.6385/1.4672} = 7.7 \times 10^5$$

$$a = 1.46$$

$$r = 0.96, P < 0.01$$

TABLA VIII

CONSTANTES DE AFINIDAD INTRINSECA (k), CONCENTRACION MOLAR
 TOTAL DE SITIOS ACTIVOS ($|S|_0$) E INDICE DE HETEROGENEIDAD
 (a) EN SEIS DISTINTOS EXPERIMENTOS CON DOS POBLACIONES DE
 ANTICUERPOS (QUINTO Y SEXTO SANGRADOS)

		k	$ S _0 \times 10^{-7}$	a
QUINTO SANGRADO	Exp. # 1	4.0×10^5	40	0.86
	Exp. # 2	4.9×10^5	30	0.78
	Exp. # 3	1.8×10^5	35	0.52
	\bar{X}	3.5×10^5	35	0.72
	σ	1.30	4	0.126
SEXTO SANGRADO	Exp. # 4	9.0×10^5	60	0.92
	Exp. # 5	8.5×10^5	50	0.93
	Exp. # 6	7.7×10^5	64	1.46
	\bar{X}	8.06×10^5	58	1.10
	σ	0.330	5.88	0.252

b) FIJACION DE HAPTENO EN PRESENCIA DE ANTIGENO COMPETIDOR

En las tablas IX, X, XI y XII se muestran los datos más relevantes de los experimentos de competencia, usando como antígenos competidores DNP_6BSA , $\text{DNP}_{10}\text{BSA}$, $\text{DNP}_{19}\text{BSA}$, respectivamente.

En las Figuras 16, 17, 18 y 19 se muestra el efecto competitivo entre el antígeno y el hapteno radiactivo, hay que observar que el incremento en la concentración del competidor se acompaña de una disminución de r_H^1 y un incremento en r_A^1 , este efecto se ve más marcado cuando se utilizan como antígenos competidores $\text{DNP}_{10}\text{BSA}$ y $\text{DNP}_{19}\text{BSA}$, no siendo así cuando se usa DNP_6BSA .

En las figuras 20, 21, 22 y 23 se ilustran las distribuciones de los complejos Ag-Ab correspondientes a cada uno de los antígenos utilizados. Obsérvese que el aumento en la concentración de antígeno desplaza al complejo predominante hacia los valores bajos de i .

A dilución infinita, la regresión en las figuras 24, 25, 26 y 27 deberían interceptar el eje de las i , en el valor correspondiente a la valencia de cada antígeno: 6, 10 y 19. Sin embargo, el intercepto es aproximadamente: 4 para DNP_6BSA , 6.5 para $\text{DNP}_{10}\text{BSA}$ y 12 para $\text{DNP}_{19}\text{BSA}$.

TABLA IX
 FIJACION DEL HAPTENO RADIOACTIVO EN PRESENCIA DEL COMPETIDOR DNP₆ BSA

CONCENTRACION MOLAR DE DNP ₆ BSA	CPM* L'	CPM* P'+L'	CPM* P'+L'-L'	H x 10 ¹⁰	HS ' x 10 ¹⁰	r' _H = HS ' / S ₀	$\frac{ SA \times 10^{10}}{ HS - HS '}$	r' _A = SA / S ₀
0	91375	149197	57822	17301	10948	0.182	24922	0.415
1 ng/ml	93913	151118	57205	17782	10831	0.180	25039	0.417
10 ng/ml	93634	205343	111709	17730	21152	0.352	14718	0.245
100 ng/ml	87681	233081	145400	16603	27532	0.458	8338	0.135
1 ug/ml	77107	196853	119746	14600	22674	0.377	13196	0.219
10 ug/ml	103161	210796	107630	19533	20380	0.339	15490	0.258
100 ug/ml	105012	208151	103139	19884	19530	0.325	16340	0.272
1000 ug/ml	97020	191332	94312	18370	17658	0.297	18012	0.300

TABLA X
FIJACION DEL HAPTENO RADIOACTIVO EN PRESENCIA DEL COMPETIDOR DNP₁₀BSA

CONCENTRACION MOLAR DE DNP ₁₀ BSA	CPM* L'	CPM* P'+L'	CPM* P'+L'-L'	H x 10 ¹⁰	HS x 10 ¹⁰	r _H ¹ = HS / S ₀	SA x 10 ¹⁰ = HS - HS '	r _S ¹ = SA / S ₀
0	105766	237872	132106	20016	25008	0.394	9876	0.154
1 ug/ml	115497	236853	121356	21864	22968	0.358	11916	0.186
10 ug/ml	117658	221441	103783	22272	19644	0.306	15240	0.238
100 ug/ml	112987	208925	95943	21384	18156	0.283	16728	0.261
1 ug/1	113180	224253	111073	21420	21024	0.328	13860	0.216
10 ug/1	119667	201348	81681	22656	15456	0.241	19428	0.303
100 ug/ml	12625	206712	80454	23904	15228	0.257	19656	0.307
1 ug/1	1211221	211221	85939	23712	16272	0.254	18612	0.250

TABLA XI
 FIJACION DEL HAPTENO RADIOACTIVO EN PRESENCIA DEL COMPETIDOR DNP₁₉BSA

CONCENTRACION MOLAR DE DNP ₁₉ BSA	CPM* L'	CPM* P' + L'	CPM* P' + L' - L'	H' x 10 ¹⁰	HS' x 10 ¹⁰	r' _H = HS' / S ₀	$\frac{ SA \times 10^{10} =}{ HS - HS' }$	r' _A = SA / S ₀
0	94925	231841	136916	17974	25926	0.518	6326	0.126
1 ng/ml	101330	230632	129302	19186	24483	0.489	7769	0.155
10 ng/ml	96310	243855	147545	18236	27938	0.558	4314	0.086
100 ng/ml	79801	199167	119366	15110	22602	0.452	9650	0.193
1 ug/ml	100254	196578	96324	18984	18238	0.364	14014	0.280
10 ug/ml	105278	214186	108908	19934	20622	0.412	11630	0.232
100 ug/ml	102688	179277	76589	19444	14502	0.290	17750	0.355
1 mg/ml	116162	156562	40400	21996	7650	0.153	24602	0.492

TABLA XII

FIJACION DEL HAPTENO RADIOACTIVO EN PRESENCIA DEL COMPETIDOR DNP₁₉BSA

CONCENTRACION MOLAR DE DNP ₁₉ BSA	CPM* L'	CPM* P'+L'	CPM* P'+L'-L'	$ H ' \times 10^{10}$	$ HS ' \times 10^{10}$	$r'_H = HS ' / S_0 $	$\frac{ SA \times 10^{10} =}{ HS - HS '}$	$r'_A = SA / S_0 $
0	101054	231431	134377	19135	25444	0.424	10426	0.173
1 ng/ml	91494	219155	127661	17324	24172	0.402	11698	0.194
10 ng/ml	81823	214714	132891	15493	25164	0.419	10706	0.178
100 ng/ml	78853	216612	137759	14931	26085	0.434	9785	0.163
1 ug/ml	112365	219119	106754	21277	20214	0.336	15656	0.260
10 ug/ml	103844	192675	188831	19663	16820	0.280	19050	0.317
100 ug/ml	112825	213415	100590	21363	19047	0.317	16823	0.280
1 ug/ml	90088	170602	80514	17058	15246	0.254	20630	0.343

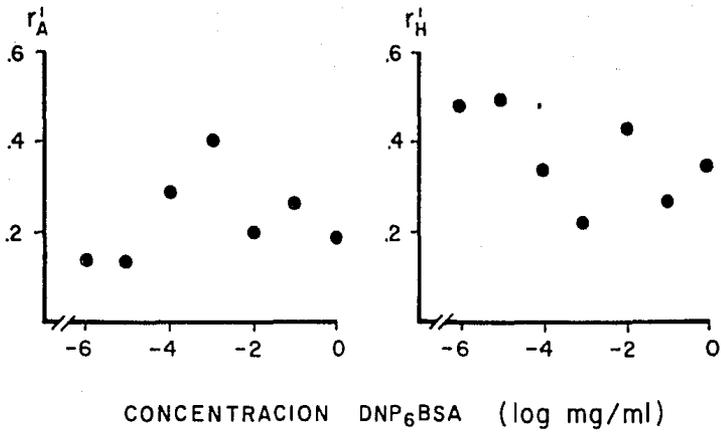


Figura 16. Regresión de r_A^I y r_H^I en la concentración inicial de DNP₆BSA.

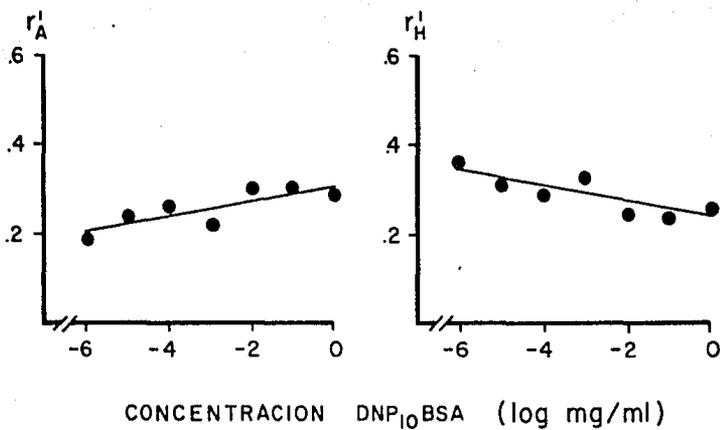


Figura 17. Regresión de r_A^I y r_H^I en la concentración inicial de DNP₁₀BSA.

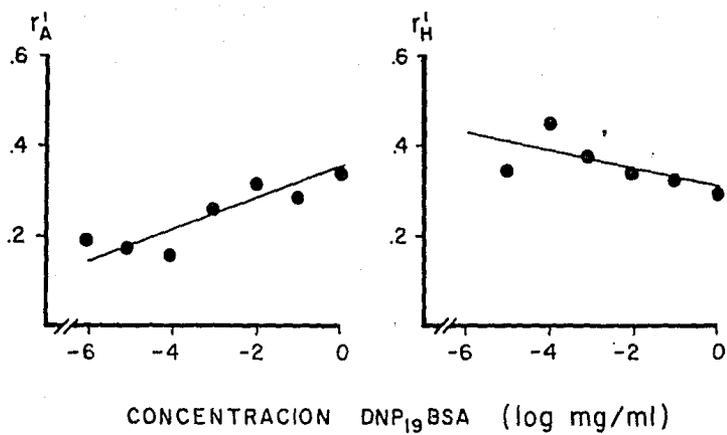


Figura 18. Regresión de r_A^I y r_H^I en la concentración inicial de DNP₁₉BSA.

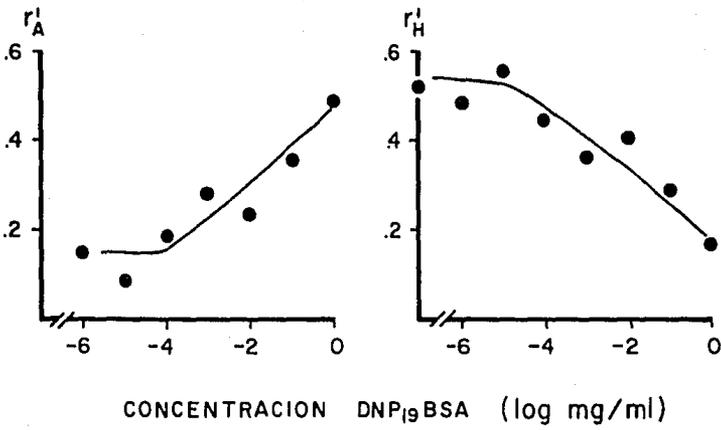


Figura 19. Regresión de r'_A y r'_H en la concentración inicial de DNP₁₉BSA.

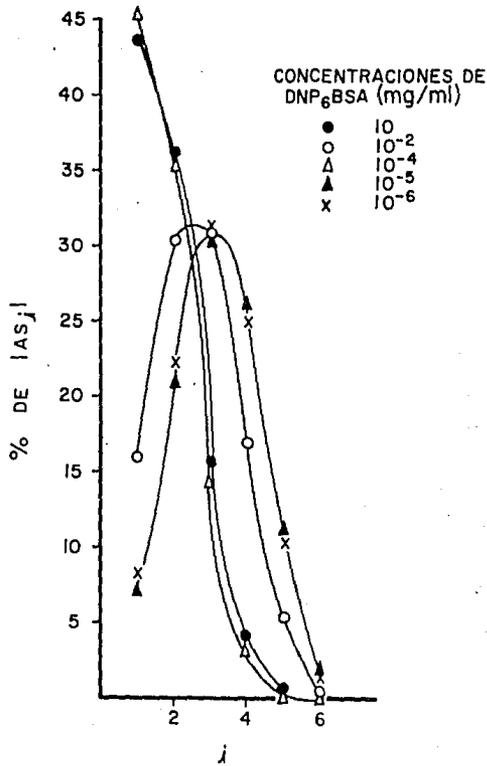


Figura 20. Distribución de los complejos antígeno-anticuerpo con DNP₆BSA.

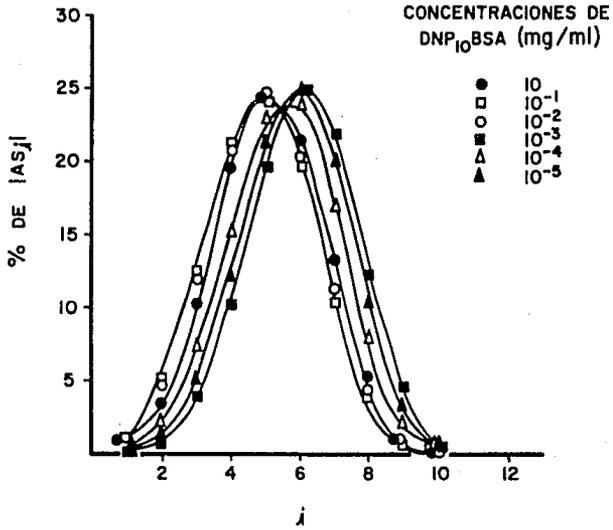


Figura 21. Distribución de los complejos antígeno-anticuerpo con $DNP_{10}BSA$.

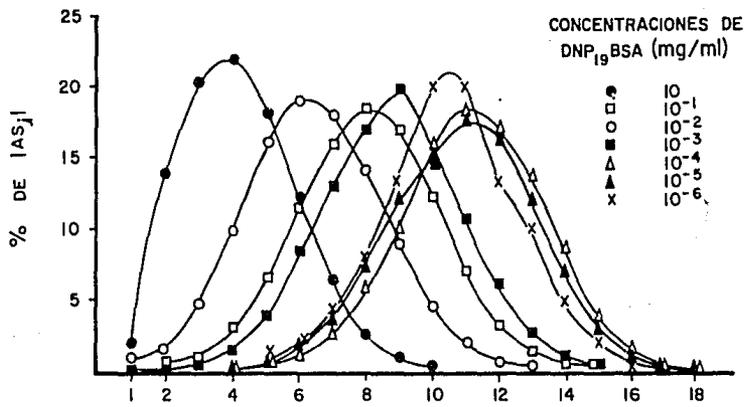


Figura 22. Distribución de los complejos antígeno-anticuerpo con DNP₁₉BSA.

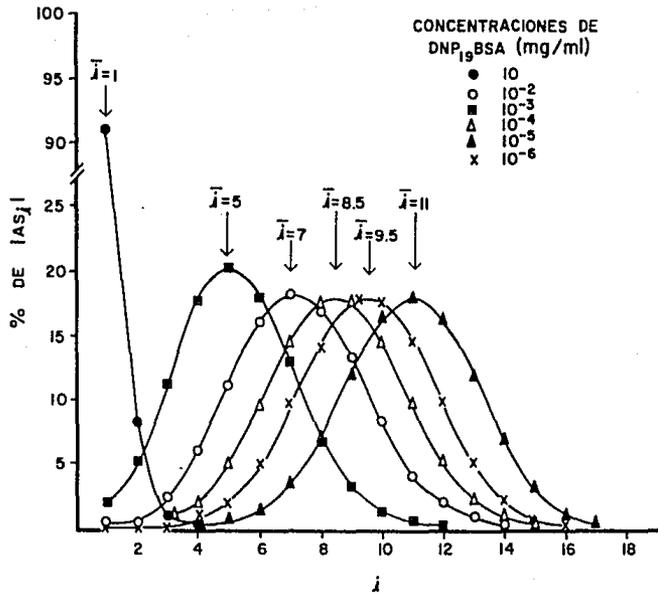


Figura 23. Distribución de los complejos antígeno-anticuerpo con DNP₁₉BSA.

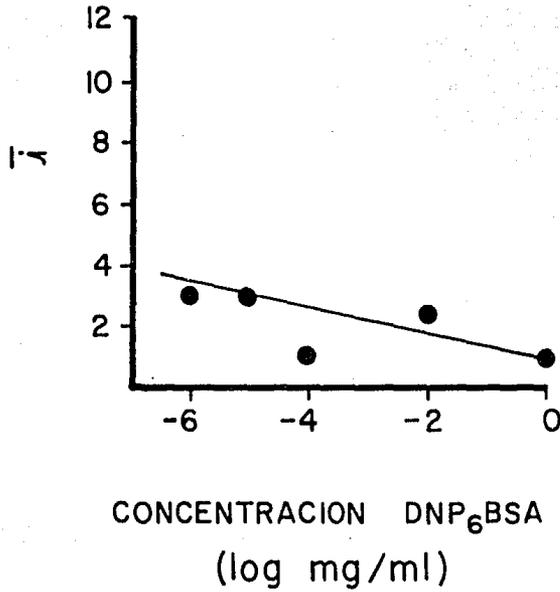


Figura 24. Regresión de \bar{i}^* en $\log |A|_0$ con DNP₆BSA. La \bar{i} máxima estimada por este método es 4.

* Valencia promedio.

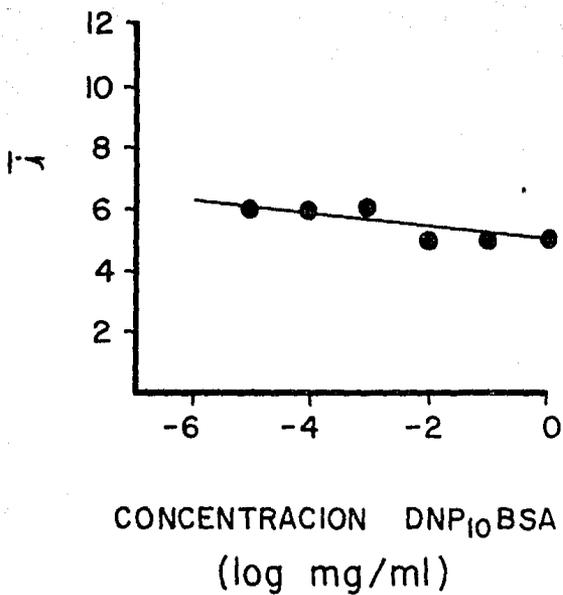


Figura 25. Regresión de \bar{i} en $\log |A|_0$ con DNP₁₀BSA. La \bar{T} máxima estimada por este método es 6.5.

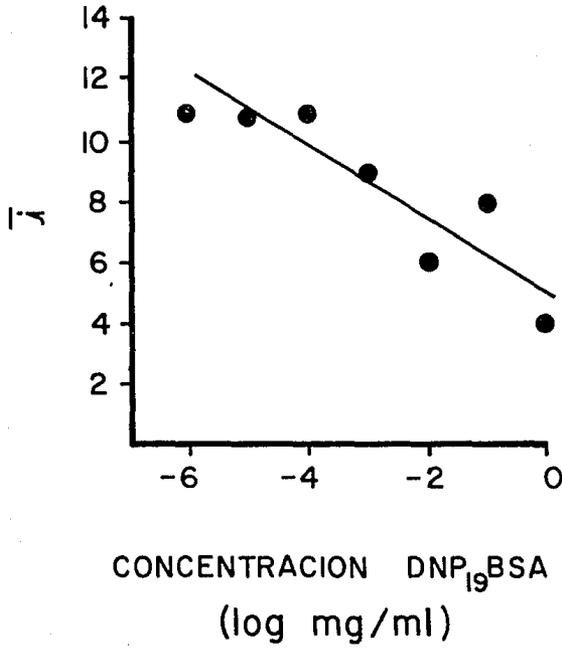


Figura 26. Regresión de \bar{T} en $\log |A|_0$ con DNP₁₉BSA. La \bar{T} máxima estimada por este método es 13.7.

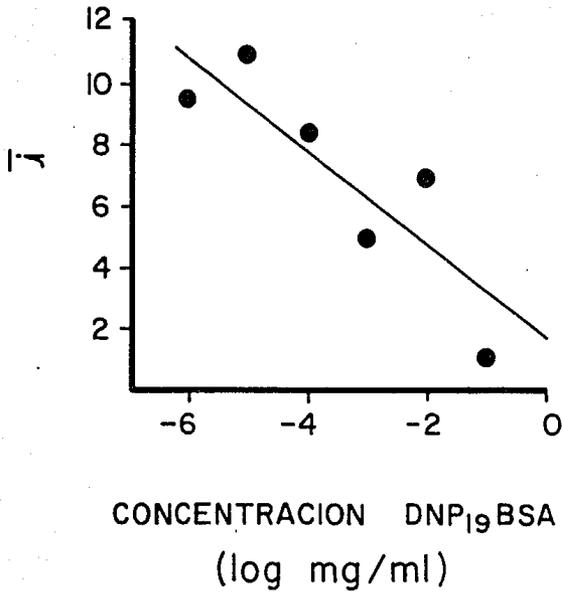


Figura 27. Regresión de \bar{i} en $\log |A|_0$ con DNP₁₉BSA. La \bar{i} máxima estimada por este método es 12.

**INFLUENCIA DE LOS COMPLEJOS ANTIGENO-ANTICUERPO,
EN SISTEMAS BIOLÓGICOS**

a) INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN PASIVA

Los experimentos de inhibición de la hemaglutinación se hicieron por triplicado para cada inhibidor: DNP₇HSA, DNP₁₃HSA y DNP₂₆HSA.

En la tabla XIII se encuentran resumidos los resultados obtenidos en los nueve experimentos de inhibición. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición respecto al control positivo (sin inhibidor).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Tit. HA sin Inh.} - \text{Tit. HA con Inh.}}{\text{Tit. HA sin Inh.}}$$

En la figura 28 se muestran las curvas de inhibición de los tres ligandos. Resultó claro en estos experimentos, que los tres antígenos son capaces de inhibir una reacción de hemaglutinación estandarizada, y que el grado de inhibición estaba en relación con el número de determinantes antigénicos (DNP), portados por el acarreador (HSA). El mejor inhibidor de la reacción fue el DNP₂₆HSA, siguiéndole el DNP₁₃HSA y finalmente el DNP₇HSA.

TABLA XIII

RESULTADOS DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION
DE 3 EXPERIMENTOS

°/o INH. DE LA HEMAGL.

# EXP.	DNP ₇ HSA			DNP ₁₃ HSA			DNP ₂₆ HSA		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
SIN INH.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2.608×10^{-9}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2.608×10^{-8}	0.0	8.33	9.09	0.0	0.0	0.0	0.0	8.33	9.09
2.608×10^{-7}	0.0	8.33	9.09	0.0	9.09	20.0	16.67	8.33	18.18
2.608×10^{-6}	8.33	16.67	18.18	16.67	27.27	20.0	25.00	39.33	27.27
2.608×10^{-5}	16.67	25.00	27.27	25.00	27.27	30.0	33.33	41.67	45.45
2.608×10^{-4}	33.33	33.33	36.36	41.67	36.36	30.0	50.00	41.67	45.45

PROMEDIO DEL °/o INH. DE LA HEMAGL.

	DNP ₇ HSA	DNP ₁₃ HSA	DNP ₂₆ HSA
SIN INH.	0.0	0.0	0.0
$2.608 \times 10^{-9}M$	0.0	0.0	0.0
$2.608 \times 10^{-8}M$	5.81	0.0	5.81
$2.608 \times 10^{-7}M$	5.81	9.70	14.39
$2.608 \times 10^{-6}M$	14.39	21.31	28.53
$2.608 \times 10^{-5}M$	22.98	27.42	40.15
$2.608 \times 10^{-4}M$	34.85	36.01	45.71

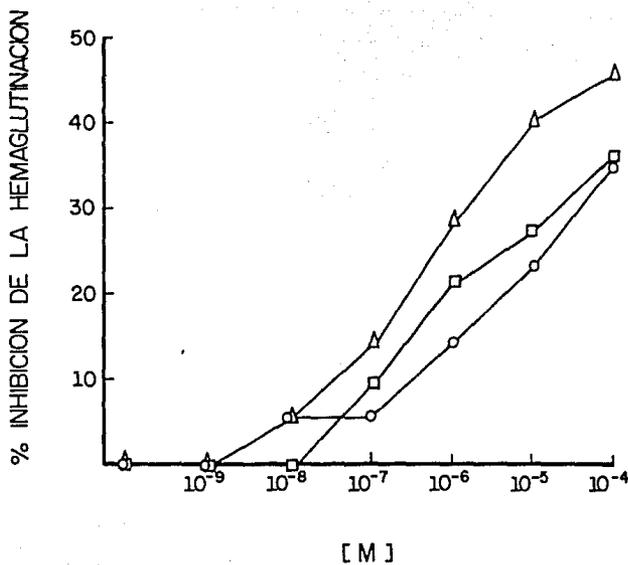


Figura 28. Inhibición de la hemaglutinación pasiva con tres antígenos distintamente dinitrofenilados: ○—○ DNP₇HSA, □—□ DNP₁₃HSA y Δ—Δ DNP₂₆HSA.

b) HIPERSENSIBILIDAD CUTANEA ACTIVA

En la Tabla XIV se encuentra el promedio de los resultados obtenidos del diámetro de las lesiones del grupo de cobayos que fue inmunizado con $DNP_{19}BSA$. En la figura 29 se muestran las gráficas correspondientes al efecto de la valencia del antígeno y el efecto de la dosis del mismo, pertenecientes al grupo mencionado anteriormente. En la tabla XV se observa el promedio de los resultados obtenidos del diámetro de las lesiones del grupo de cobayos que fue inmunizado con $DNP_{39}BSA$ y en la figura 30 se describen gráficamente el efecto de la valencia del antígeno y la dosis del mismo. Todos los resultados se expresaron en milímetros del diámetro de las lesiones.

En estos experimentos se observó que los antígenos $DNP_{19}BSA$ y - - - $DNP_{39}BSA$ tuvieron la misma capacidad para sensibilizar a los cobayos. En ambos grupos los antígenos HSA y DNP_5HSA no indujeron eritema a las dosis utilizadas, mientras $DNP_{15}HSA$ y $DNP_{28}HSA$ si lo hicieron. Los diámetros de eritema producidos por $DNP_{15}HSA$ y $DNP_{28}HSA$ aumentaron conforme se incrementó la concentración del antígeno hasta alcanzar un máximo, permaneciendo de esa magnitud aún a concentraciones mayores, pero fueron similares para las valencias de 15 y 28.

TABLA XIV

GRUPO A (INMUNIZADO CON DNP₁₉BSA)

PROMEDIO DE DIAMETROS (mm) OBTENIDOS DE LAS LESIONES
DE LAS PIELES DEL GRUPO A

	DOSIS (μ g / 0.1 ml)			
	2	4	8	12
0	0	0	0	0
5	0	0	0	0
15	0	4.5	6.0	7.7
28	0	4.9	5.6	6.8

VALENCIA (DNP_α HSA)

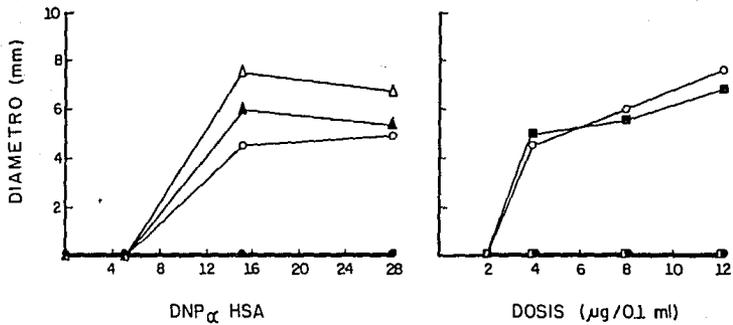


Figura 29. Grupo de cobayos inmunizado con DNP₁₉ BSA.

A. Efecto de la valencia del antígeno ○—○ 2 µg/ml; ○—○ 4 µg/ml; Δ—Δ 8 µg/ml; Δ—Δ 12 µg/ml.

B. Efecto de la dosis del mismo en desencadenar el fenómeno de hipersensibilidad cutánea. □—□ HSA; ●—● DNP₅ HSA; ○—○ DNP₁₅ HSA; ■—■ DNP₂₈ HSA.

TABLA XV

GRUPO B (INMUNIZADO CON DNP₃₉BSA)

PROMEDIO DE DIAMETROS (mm) OBTENIDOS DE LAS LESIONES
DE LAS PIELES DEL GRUPO B

	DOSIS (μ g /0.1 ml)			
	2	4	8	12
0	0	0	0	0
5	0	0	0	0
15	0	4.3	7.1	6.8
28	0	4.6	6.3	7.3

VALENCIA (DNP_αHSA)

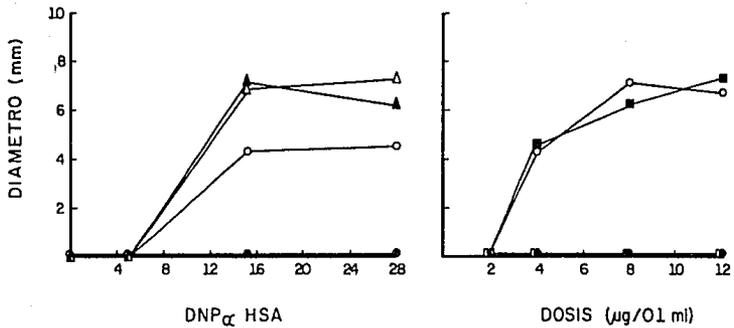


Figura 30. Grupo de cobayos inmunizado con DNP₃₉ BSA.

A. Efecto de la valencia del antígeno ○—○ 2 µg/ml; □—□ 4 µg/ml; △—△ 8 µg/ml; ▽—▽ 12 µg/ml.

B. Efecto de la dosis del mismo en desencadenar el fenómeno de hipersensibilidad cutánea. □—□ HSA; ●—● DNP₅ HSA; ○—○ DNP₁₅ HSA; ■—■ DNP₂₈ HSA.

c) CONTRACCION DEL MUSCULO TRAQUEAL DE COBAYO

(PRUEBA DE SCHULTZ-DALE)

Los promedios de las respuestas traqueales obtenidas en cada grupo de preparaciones son mostrados en la Tabla XVI. El efecto de cada una de las variables se analizó separadamente en las secciones A, B, y C de la misma Tabla. En cada columna son comparados los promedios de los tres niveles ensayados. Para probar la hipótesis de que por lo menos una de las desigualdades mostradas en los promedios de cada columna eran debido al efecto del factor involucrado, se aplicó la prueba de Jonckheere-Terpstra (44). También se muestran las probabilidades de error para cada columna y la probabilidad de error agregada (45) para todos los datos.

En la Tabla XVII se muestra un análisis de variancia (46) de todos los resultados obtenidos en forma individual. En la figura 31 se puede observar el efecto de la concentración del antisuero y antígeno frente a cada valencia. En la figura 32 tenemos el efecto de la concentración de antígeno y valencia frente a cada concentración de antisuero.

Cuando se analizaron los resultados con la Prueba de Jonckheere-Terpstra, solo resultó estadísticamente significativa la concentración de antisuero con la cual se incubaron las preparaciones traqueales, mientras que la concentración de Ag y la valencia no lo fueron. Pero al usar la prueba de X^2 de Fisher que agrega las probabilidades, los tres parámetros resultaron significativos.

El someter los mismos resultados a un análisis de variancia, la concentra-

TABLA XVI

RESPUESTAS ISOMETRICAS PROMEDIO DE LOS EXPERIMENTOS DE SCHULTZ-DALE^a

SECCION A. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ANTISUERO SENSIBILIZANTE

Valencia	7			13			26			Probabilidad Agregada ^c
Dosis de antígeno (µg/ml)	1.8	18	180	1.8	18	180	1.8	18	180	
Antisuero (µg/ml)										
0.1	0.82	5.5	0.68	0.0	3.06	25.74	4.04	4.10	5.80	
10.0	1.14	11.4	21.74	29.0	15.36	8.62	31.34	31.34	5.34	
1000.0	42.78	62.62	59.40	54.28	68.92	55.06	69.90	70.64	44.24	
Probabilidad ^b	0.21	.004	.004	.021	.004	.028	.004	.004	.028	P < .01

(a) Los mismos datos han sido arreglados en forma diferente en las secciones A, B y C para calcular las probabilidades. Los resultados mostrados son el promedio de cinco replicados de las respuestas de Schultz-Dale, expresados como porciento de una respuesta a la histamina (10 µg/ml).

(b) Prueba no paramétrica de Jonckheere-Terpstra.

(c) Prueba de X² de Fisher.

SECCION B. EFECTO DE LA DOSIS DE ANTIGENO

Valencia	7			13			26			Probabilidad Agregada ^c
	0.1	10	1000	0.1	10	1000	0.1	10	1000	
Antisuero ($\mu\text{g/ml}$)	0.1	10	1000	0.1	10	1000	0.1	10	1000	
Dosis de ($\mu\text{g/ml}$)										
1.8	0.82	1.14	42.78	0.0	29.0	54.28	4.04	41.34	69.90	
18.0	5.0	11.40	62.68	3.06	15.36	68.92	4.10	43.40	70.74	
180.0	0.68	21.74	59.40	25.74	8.62	55.06	5.80	5.34	44.24	
Probabilidad ^b	.459	.012	.175	.021	4.59	.459	.459	.087	.021	P < .01

SECCION C EFECTO DE LA VALENCIA

Antisuero ($\mu\text{g/ml}$)	0.1			10			1000			Probabilidad Agregada ^c
	1.8	18	180	1.8	18	180	1.8	18	180	
Dosis de antígeno ($\mu\text{g/ml}$)	1.8	18	180	1.8	18	180	1.8	18	180	
Valencia										
7	0.82	5.0	0.68	1.14	11.14	21.74	42.78	62.68	59.40	
13	0.00	3.06	25.74	29.0	15.36	8.62	54.28	68.92	55.06	
26	4.04	4.10	5.80	31.4	43.40	5.34	69.9	70.64	44.74	
Probabilidad ^b	.175	.5	.004	.087	.087	.087	.459	.203	.459	02 < P < .01

IV

DISCUSSION

TABLA XVII

ANALISIS DE VARIANCIA DE LAS RESPUESTAS ISOMETRICAS
DE LOS EXPERIMENTOS DE SCHULTZ-DALE

Fuente de variación	Grados de libertad		Nivel de confianza
A) Antisuero sensibilizante	2	70.39	1.000
B) Dosis de antígeno	2	0.98	0.620
C) Valencia	2	1.36	0.739
Interacción AB	4	1.18	0.675
Interacción AC	4	0.52	0.279
Interacción BC	4	1.97	0.897
Interacción ABC	8	1.10	0.632

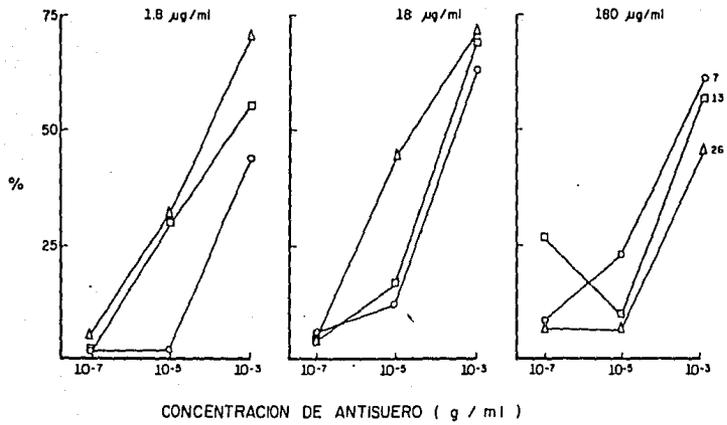


Figura 31. Efecto de la concentración del anticuerpo y del antígeno, sobre la respuesta de tensión de las preparaciones traqueales, cuando el antígeno porta distintas valencias: ○—○ 7, □—□ 13 y △—△ 26.

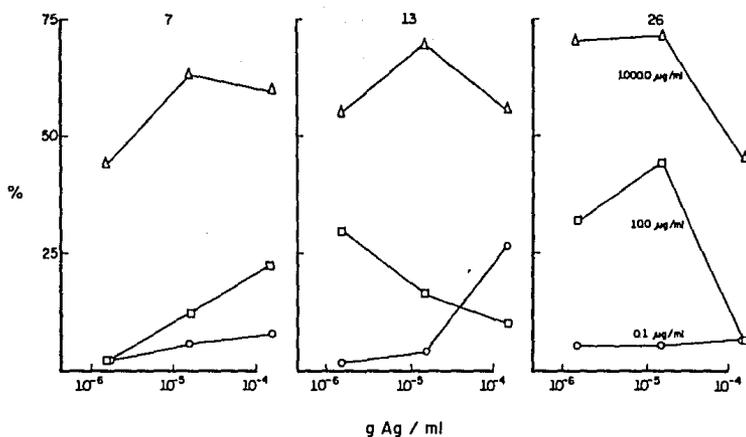


Figura 32. Efecto de la concentración del antígeno y la valencia en la respuesta de tensión de las preparaciones traqueales cuando se incuban con distintas concentraciones de anticuerpo: ○—○ 0.1, □—□ 10 y Δ—Δ 1000 µg de Ab/ml. Los antígenos usados fueron DNP₇HSA, DNP₁₃HSA y DNP₂₆HSA.

ción de antisuero también resultó claramente significativa, no siendo así para la concentración de Ag y la valencia. Sin embargo, la interacción de la concentración de Ag con la valencia se aproxima mucho a la significancia estadística.

a) DIALISIS EN EQUILIBRIO

Hemos presentado e ilustrado un método que permite la estimación de las concentraciones de los productos en el equilibrio de la reacción entre un antígeno conjugado polivalente y el anticuerpo antihapteno. El método descansa en la capacidad del antígeno de desplazar al hapteno radiactivo del sitio activo del anticuerpo y requiere de la estimación previa de la constante de afinidad de la reacción entre el sitio activo y el hapteno (k). También, el método aplica la teoría de Klotz (16) para asociaciones múltiples, la cual supone identidad de los sitios activos y ausencia de interacciones.

Nuestros experimentos estimaron distintos valores de k dependiendo, principalmente, del origen de los anticuerpos, siendo más alta la k del sexto sangrado y cercana a $1 \times 10^6 M^{-1}$. También, los anticuerpos del sexto sangrado mostraron una menor heterogeneidad que los del quinto sangrado. Nuestro estimado de k es parecido al que se encuentra en la literatura (47 y 48) y su incremento en el tiempo explicable en función de la maduración de la respuesta inmune. Igualmente, la tendencia a una respuesta más homogénea, que se evidencia en el incremento en a hacia valores cercanos a la unidad con el paso del tiempo, podría explicarse como resultado de la presión selectiva del antígeno sobre la población de células inmunocompetentes (49). La gran homogeneidad de los anticuerpos del sexto sangrado justificaron su uso para los experimentos de competencia pues una de las restricciones del modelo de Klotz es que los sitios activos sean idénticos.

Los antígenos $DNP_{19}BSA$ y $DNP_{10}BSA$ fueron los que mejor compitieron

ron con el hapteno $^3\text{H-DNP-lis}$, mientras que DNP_6BSA lo hizo menos notoriamente (figuras 16, 17, 18 y 19). Las distribuciones de los distintos complejos $|\text{AS}_i|$ se modificaron perceptiblemente con la concentración del antígeno competidor, favoreciéndose la formación de complejos saturados de anticuerpos al disminuir la concentración de antígeno. Este efecto es, desde luego, de esperarse siguiendo la teoría "de redes" de Pauling (9) para la formación de complejos Ag-Ab. Sin embargo, nuestros experimentos nunca alcanzaron la saturación completa: $i = 19$ para $\text{DNP}_{19}\text{BSA}$, $i = 10$ para $\text{DNP}_{10}\text{BSA}$ y $i = 6$ para DNP_6BSA , sino $i = 12, 6$ y 4 respectivamente. Esta discrepancia puede fácilmente explicarse ya que el método densitométrico estima todos los grupos DNP-lisina presentes en una molécula independientemente de su posición espacial, mientras que los anticuerpos solo reaccionan con aquellos grupos que sean periféricos y cuya posición no les impida o dificulte la ocupación de otro (impedimento estérico). Nuestro estimado de la valencia lo creemos más pertinente a la fenomenología inmunológica que aquél que cuenta todos los grupos presentes.

El principal atractivo de este método radica en la posibilidad de montar una reacción Ag-Ab en condiciones tales que se produzca un determinado tipo de complejo Ag-Ab. Conocer el tipo de complejo más probable en un sistema antígeno-anticuerpo puede ser de gran interés para investigar el mecanismo de inducción de la respuesta inmune a nivel de la membrana de la célula inmunocompetente, donde el número de receptores fijados por cada antígeno o la constante de afinidad promedio de la reacción han sido propuestos como los eventos determinantes de que la célula inicie la síntesis de anticuerpos o se vuelva tolerante (12 y 37). Tam-

bién, las propiedades biológicas de los complejos se modifican según su composición, así tenemos que la enfermedad del suero, y otras enfermedades de las que aquélla es modelo, probablemente dependen precisamente de la cantidad de complejos solubles formados en la reacción antígeno-anticuerpo (2, 3). La fagocitosis del complejo Ag-Ab que es la principal vía de eliminación del material extraño representado por el antígeno, también depende críticamente de la composición del complejo, facilitándose considerablemente cuando el complejo es precipitable, (13) lo que solo ocurre en cierto rango de las concentraciones relativas de los reactantes (9). Finalmente, la inactivación de moléculas biológicamente activas, como la toxina tetánica, también posiblemente dependa de la molecularidad del complejo toxina-antitoxina (50). Así que, cuando menos en las áreas mencionadas, el conocimiento del complejo Ag-Ab más probable en un sistema puede ser revelador de los mecanismos químicos y biológicos involucrados en el evento.

b) INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION PASIVA

En este sistema de reacción se mostró que la capacidad inhibitoria de los antígenos que tienen una diferente substitución hápténica es distinta. Los resultados mostraron que para alcanzar el 25% de inhibición de la hemaglutinación, se requería de una concentración 10 veces menor de los antígenos más substituidos (13 y 26) que la del antígeno más pobremente conjugado. Lo anterior lo explicamos por incrementos en la valencia del antígeno acompañados de un aumento en la afinidad por el receptor, y por ende en su capacidad para formar complejos inmunes.

Se eligió el 25% de inhibición para hacer la comparación entre los tres antígenos, porque es aproximadamente la mitad del máximo de inhibición obtenido, ya que en este trabajo nunca logramos una inhibición mayor del 50% como explicación proponemos que los antígenos adsorbidos a una fase sólida o semi-sólida muestra una mayor afinidad por los receptores que los antígenos solubles, por el simple hecho de estar distribuidos en una superficie tridimensional facilitando así su reacción.

c) HIPERSENSIBILIDAD CUTANEA ACTIVA

En estos experimentos los antígenos HSA y DNP₅HSA no indujeron eritema a las concentraciones utilizadas, mientras que DNP₁₅HSA y DNP₂₈HSA sí lo hicieron, siendo las respuestas similares en magnitud. Incrementos en la concentración de antígeno y de la valencia se tradujeron en un aumento del diámetro del eritema, aunque tiende a hacerse constante a concentraciones mayores en ambos casos. Lo anterior sugiere que después de rebasado cierto umbral, tanto en la concentración de antígeno como en la valencia, se obtiene una población de complejos inmunes óptimos para disparar el fenómeno de hipersensibilidad cutánea activa.

La incapacidad de HSA para despertar hipersensibilidad se debió a que el acarreador usado para sensibilizar a los cobayos fue BSA. El que DNP₅HSA no haya evocado una reacción inflamatoria puede explicarse por su bajo grado de substitución e incapacidad para formar el complejo óptimo para disparar el fenómeno.

Respecto al papel de la valencia del antígeno en la inducción de hipersensibilidad, no se obtuvieron diferencias entre DNP₁₉BSA y DNP₃₉BSA, tal vez por no haber explorado un rango más amplio de substitución (DNP₃BSA no fue probado como inductor de hipersensibilidad).

d) PRUEBA DE SCHULTZ-DALE

En la inducción de la contracción del músculo liso traqueal de cobayo, se exploraron tres variables: 1) concentración del antisuero; 2) concentración del antígeno; 3) valencia del antígeno.

En el análisis de variancia de los resultados obtenidos se encontró, que la concentración del antisuero con la cual se sensibiliza al músculo es la variable principal. Analizando en forma separada la concentración de antígeno y la valencia, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, aunque inspeccionando la Tabla de Análisis de Variancia se observó, que la interacción de la concentración del antígeno con la valencia sugiere fuertemente la existencia de un complejo óptimo para lograr una respuesta máxima.

Cuando se analizaron los datos con la Prueba no Paramétrica de Jonckheere-Terpstra, también se obtuvieron diferencias significativas cuando se trata de la concentración del antisuero con la cual se sensibiliza al músculo traqueal. La significancia de la concentración del antígeno y la valencia del mismo por este método no es clara. Sin embargo, aplicando una Prueba de X^2 para probabilidades agregadas, resultaron claramente significativas las tres variables estudiadas, lo cual apunta hacia la formación de un complejo Ag-Ab óptimo.

En general, consideramos que los parámetros: concentración de los reactivos y valencia del antígeno actuaron de manera importante en la formación de distintos complejos inmunes con capacidad diferente para disparar los fenómenos biológicos. Además la influencia de cada uno de ellos en los fenómenos explora-

dos fue distinta. El papel de la valencia, del antígeno se demostró notoriamente en los experimentos de diálisis en equilibrio, cuando usamos como competidores antígenos con un número de grupos hapténicos creciente y en la inhibición de la hemaglutinación. En el fenómeno de hipersensibilidad cutánea activa, la combinación de concentración del antígeno con la valencia se manifestó como uno de los aspectos más relevantes en el disparo de la reacción. Sin embargo, en la Prueba de Schultz-Dale, la concentración del antisuero sensibilizante fue la variable fundamental. Mientras que la combinación de la concentración del antígeno con la valencia, alcanzando límites de significancia estadística, solo permite sospechar su importancia en la formación de complejos inmunes biológicamente activos.

V

BIBLIOGRAFIA

1. Leslie, R.G.Q. (1980). Macrophage Handling of Soluble Immune Complexes. *Immunology Today* 1(4):78-84.
2. Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J. (1980). Immune Complexes in Human Diseases. *Am. J. Path.* 100(2):530-591.
3. Cochrane, C.G. and Koffler, D. (1973). Immune Complex Disease in Experimental Animals and Man. *Adv. Immunol.* 16:185-264.
4. Morrison, J.P. and Taylor, R.B. (1981). Immunoregulatory Effects of Covalent Antigen-Antibody Complexes. III. Enhancement or Suppression Depending on the Time of Administration of Complex Relative to a T-Independent Antigen. *Immunology* 42:355-362.
5. Larralde, C. (1980). The Role of Circumstance in Immunity. *Molecules, Cells and Parasites in Immunology.* Acad. Press., p. 191-214.
6. Florencia, I. (1979). Hipótesis de Multiespecificidad de los Anticuerpos. Efecto del pH, Fuerza Iónica y Composición Iónica en la Precipitación cualitativa del Complejo Antígeno-Anticuerpo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.
7. Steengaard, J. and Funding, L. (1974). On the Formulation of a Scheme for the Interaction between an Antigen and its Antibody. *Immunology* 26:299-302.
8. Steengaard, J., Liu, B.M., Cline, G.B. and Moller, N.P.H. (1977). The Properties of Immune Complex-Forming Systems. A New Theoretical Approach. *Immunology* 32:445-456.
9. Pauling, L., Pressman, D. and Campbell, D.H. (1944). The Serological Properties of Simple Substances. VI. The Precipitation of a Mixture of two Specific Antisera by a Dihaptenic Substance Containing the Two Corresponding Haptenic Groups; Evidence for the Framework Theory of Serological Precipitation. *J. Am. Chem. Soc.* 66:330-336.
10. Celis, E., Ridaura, R. and Larralde, C. (1977). Effects of the Extent of DNP Substitution on the Apparent Affinity Constant and Cooperation between Sites in the Reactions of Dinitrophenylated Human Serum Albumin with Anti-DNP and Anti-HSA Antibodies Coupled to Agarose. *Immunochem.* 14:553-559.

11. Larralde, C. and Janof, P. (1972). The Effects of the DNP:HSA Molar Ratio on the Quantity and the Affinity of Rat Anti-DNP Antibodies in the Primary Response. *Immunochem.* 9:1209-1219.
12. Kristofferson, A., Ahlstedt, S. and Svärd, P.O. (1977). Antigens in Penicillin Allergy. II. The Influence of the Number of Penicilloyl Residues on the Antigenicity of Macromolecules as Determined by Radioimmunoassay (RIA), Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) and Antibody Induction. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 55:23-28.
13. Rowley, D. and Turner, K. (1966). Number of Molecules of Antibody Required to Promote Phagocytosis of one Bacterium. *Nature* 210:496-498.
14. Celis, E. and Larralde, C. (1978). Regulation of the Binding of Antigen to Receptors by Soluble Antibodies: *In Vitro* Competition and Synergism for Dinitrophenylated Human Serum Albumin and ξ -DNP-Lysine. *Immunochem.* 15:595-601.
15. Mannik, M. and Striker, G.E. (1980). Removal of Glomerular Deposits of Immune Complexes in Mice by Administration of Excess Antigen. *Lab. Inv.* 42(5): 483-489.
16. Klotz, I.M. (1953). Protein Interactions. The Protein I: Pt.B., Neurath and Bailey (Eds), Acad. Press, N.Y. p. 727-806.
17. Karush, F. and Karush, S.S. (1971). Equilibrium Dialysis. *Meths. Immunol. and Immunochem.*, III. Williams, C.A. and Chase, M.W., (Eds). Acad. Press, N.Y. p. 383-394.
18. Eisen, H.N. (1964). VI. Equilibrium Dialysis for Measurement of Antibody-Hapten Affinities. *Meth. Med. Res.* 10:106-114.
19. Barisas, B.G., Sturtevant, J.M. and Singer, S.J. (1971). Thermodynamics of the Binding of Haptens to Rabbit Anti-2,4-Dinitrophenyl Antibodies. *Biochemistry* 10(15):2816-2821.
20. Sips, R.J. (1948). On the Structure of a Catalyst Surface. *J. Chem. Phys.* 16: 490-495.
21. Karush, F. (1962). Immunologic Specificity and Molecular Structure. *Adv. Immunol.* 2:1-40.

22. Pauling, L., Pressman, D. and Grossberg, A.L. (1944). The Serological Properties of Simple Substances. VII. A Quantitative Theory of the Inhibition by Haptens of the Precipitation of Heterogeneous Antisera with Antigens, and Comparison with Experimental Results for Polyhaptenic Simple Substances and for Azoproteins. *J. Am. Chem. Soc.* 66:784-792.
23. Nisonoff, A. and Pressman, D. (1958). Heterogeneity and Average Combining Constants of Antibodies from Individual Rabbits. *J. Immunol.* 81:417-428.
24. Eisen, H.N. (1965). The Harvey Lecture Series 1964-1965, Acad. Press, N.Y. p.1.
25. Eisen, H.N., Belman, S. and Carsten, M.E. (1953). The Reaction of 2,4-Dinitrobenzenesulfonic Acid with Free Amino Groups of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 75:4583-4585.
26. Eisen, H.N. (1964). IV. Preparation of Purified Anti-2,4-Dinitrophenyl Antibodies. *Meths. Med. Res.* 10:94-105.
27. Campbell, D.H., Garvey, S.J., Cremer, E.N. and Sussdorf, H.D. (1970). *Methods in Immunology*, Second Edition, W.A., Benjamin Inc., N.Y.
28. Ouchterlony, O. (1958). Diffusion in Gel Methods for Immunological Analysis I, II. *Progress in Allergy* 5:1-
29. Chase, M.W. (1965). Collection and Handling of Serum. *Meths. Immunol. and Immunochem.*, I. Williams, C.A. and Chase, M.W. (Eds). Acad. Press, N.Y. p. 237.
30. Avrameas, S., Tandou, B. and Chuilon, S. (1968). Glutaraldehyde, Cyanuric Chloride and Tetraazotized O-Dianisidine as Coupling Reagents in the Passive Hemagglutination Test. *Immunochem.* 6:67-76.
31. Springer, G.F. (1977). Inhibition of Hemagglutination. *Meths. Immunol. and Immunochem.*, IV. Williams, C.A. and Chase, M.W. (Eds). Acad. Press, N.Y. p. 67-75.
32. Stavitsky, A.B. and Arguilla, E.R. (1965). Micromethods for the Study of Protein and Antibodies, III. Procedure and Applications of Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Reactions with Bis-Diazotized Benzidine and Protein-Conjugated Red Blood Cells. *J. Immunol.* 74:306.
33. Feldmann, M. (1972). Induction of Immunity and Tolerance *in Vitro* by Hapten Protein Conjugates. *J. Exp. Med.* 135:735-753.

34. Larralde, C. (1972). Tesis Doctoral, Universidad de Washington, Seattle, Wash., U.S.A.
35. Kantor, F.S., Ojeda, A. and Benacerraf, B. (1963)., I. Antigenicity on DNP-Polylysine and DNP Copolymer of Lysine and Glutamic Acid in Guinea Pigs. *J. Exp. Med.* 117:55-69.
36. Kontiainen, S. (1971). Effect of Number of Haptens per Carrier Molecule on an Adoptive Secondary Anti-Hapten Response. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 41:729-738.
37. Larralde, C. and Lagunoff, D. (1974). Immunity and Tolerance *in Vivo* to Different Doses of Poly and Oligosubstituted DNP-Human Serum Albumin in the Rat. *Bol. Est. Med. Biol.* 28(5):143-156.
38. Goldberg, R.J. (1952). Theory of Antibody-Antigen Reaction, I. Theory for Reactions of Multivalent Antigen with Bivalent and Univalent Antibody. *J. Am. Chem. Soc.* 74:5715-5725.
39. Austen, K.F. and Becker, E.L.(1968). Immunoglobulin Heterogeneity and Anaphylactic Sensitization. *Biochemistry of the Acute Allergy Reactions.* Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, p. 1-10.
40. Dale, H.H. (1912). The Anaphylactic Reaction of Plain Muscle in the Guinea Pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 4: 167-223.
41. Landsteiner, K. and van der Scheer, J. (1938). Anaphylactic Shock by Azodyes, II. *J. Exp. Med.* 67:79-87.
42. Alonso de Florida, F. (1976). Estudios acerca de Alergia Experimental. *Gac. Med. Méx.* 112:277-291.
43. Alonso de Florida, F. and del Castillo, A. (1977). The *in Vitro* Effects of Calcium and Potassium in Resensitization of Tracheal Smooth Muscles of the Allergized Guinea Pig. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 55:201-214.
44. Hollander, M. and Wolfe, D.A. (1973). *Nonparametric Statistical Methods* (John Wiley and Sons, New York).
45. Fisher, R.A. (1946). *Statistical Methods for Research Workers*, 10th ed. (oliver and Boyd, Edinburgh).
46. Crow, E.L., Davis, F.A. and Maxfield, M.W. (1960). *Statistics Manual* (Dover Publications, New York).

47. Stupp, Y., Yoshida, T. and Paul, W.E. (1969). Determination of Antibody-Hapten Equilibrium Constants by an Ammonium Sulfate Precipitation Technique. *J. Immunol.* 103:625-627.
48. Eisen, H.N. and Karush, F. (1949). The Interaction of Purified Antibody with Homologous Hapten. Antibody Valence and Binding Constant. *J. Am. Chem. Soc.* 71:363-364.
49. Siskind, G.W. and Benacerraf, B. (1969). Cell Selection by Antigen in the Immune Response. *Adv. Immunol.* 10:1-49.
50. Larralde, C. and Barbosa, H. (Por Publicar).