



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

COOPERATIVIDAD EN LA REACCION
ANTIGENO ANTICUERPO

T E S I S

RUY ENRIQUE PEREZ MONTFORT

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS. Tesis 1977
ADQ. [REDACTED]
FECHA 3/5 BIS
PROC. _____



QUIMICA

Jurado asignado originalmente según el tema:

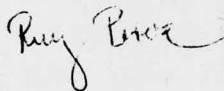
PRESIDENTE	Magdalena Acosta Segura
VOCAL	Guadalupe Alonso Víveros
SECRETARIO	Carlos Larralde Rangel
1er. SUPLENTE	Beatriz Medina Jiménez
2o. SUPLENTE	Isabel Torreblanca y Sentiés

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

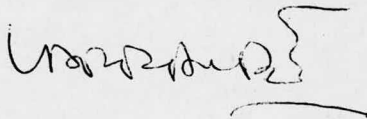
Sustentante:

Ruy Enrique Pérez Montfort



Asesor del tema:

Carlos Larralde Rangel



INDICE

	Pág.
Capítulo I Introducción	1
Capítulo II Modelo Teórico	4
Capítulo III Materiales y Métodos	16
Capítulo IV Resultados y Discusión	28 45
Capítulo V Conclusiones	52
Apéndice I	53
Apéndice II	54
Apéndice III	57
Apéndice IV	62
Glosario y Notación	66
Referencias	68

INDICE DE FIGURAS Y DE TABLAS

	Pág.
Figura	
1	14
2	15
3	19
4	21
5	22
6	27
7	32
8	34
9	36
10	38
11	40
12	42
S1	56
1D	65
Tabla	
1	31
2	33
3	35
4	37
5	39
6	41
7	43
8	44

A mi esposa

A mis padres

Y

A Carlos Larralde

Deseo agradecer al Sr. José Avilés, al Sr. Salvador
Barbosa y a la Srita. Esperanza Ruiz la ayuda que -
me prestaron en la elaboración de esta tesis.

CAPITULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El estudio del reconocimiento y unión entre proteínas y -- otras moléculas es una manera de conocer su función a nivel molecular. De algunos de estos estudios sabemos como interaccionan el grupo heme con la globina, el oxígeno con la hemoglobina, algunos metales con --- ciertas enzimas, la opsina con la retinina, aniones con albúmina sérica o con insulina, ciertos pigmentos con la lana, enzimas con sustratos - de peso molecular bajo, anticuerpos con antígenos y haptenos, la acti- na con la miosina, la insulina con otras moléculas de insulina, algu- nas proteínas con ácidos nucleicos, proteasas con proteínas y algo de la interacción de las proteínas plasmáticas entre si. El estudio de - estas interacciones tiene interés porque generalmente determinan un -- efecto biológico importante, para la respiración, la visión, la activi- dad enzimática, etc.

En la mayor parte de estos ejemplos se han reportado efec- tos alostéricos y de cooperación (homotropismo) al interaccionar las - proteínas con sus ligandos. Entendiéndose por alosterismo la altera- ción de la actividad química o biológica de una proteína por la fija- ción de un ligando en un sitio diferente al sitio activo, y por coope- ratividad la facilitación de la función de un sitio por la unión del - ligando a otro sitio idéntico localizado en la misma macromolécula.

El ejemplo clásico de cooperatividad es el de la interac- ción de la hemoglobina con el oxígeno (1,2,3,4). Una molécula de hemo

globina es capaz de fijar 4 moléculas de oxígeno. Si se hace una curva de tensión de oxígeno contra saturación fraccional de la hemoglobina se observa que esta curva es sigmoidea. Por la forma de la curva y otras evidencias se piensa que al unirse la primera molécula de oxígeno a uno de los grupos heme, la segunda molécula de oxígeno se une con la misma afinidad al segundo grupo heme, pero la tercera y cuarta moléculas de oxígeno lo hacen con una mayor afinidad, o con mayor facilidad, a sus grupos heme respectivos (5). Esto no debería ser sorprendente sabiendo que las proteínas son macromoléculas muy complejas que tienen un comportamiento complejo que les permite regular el efecto de su interacción con el ligando. Además, los grupos o residuos de los que está formada una proteína tienen los mismos tipos de interacciones entre sí que la macromolécula completa con el ligando con que interacciona y, consecuentemente, la distribución de la energía en la molécula debe sufrir cambios resultantes de su interacción con otra molécula.

Esto hace pensar que realmente ninguna interacción de una proteína con más de un ligando puede ser independiente en sentido riguroso ya que la unión con el primer ligando implica alguna modificación de la estructura y de los valores energéticos de la proteína que puede o no resultar en una modificación ostensible de su función.

En la mayor parte de las interacciones entre proteínas y ligandos mencionadas se han hecho estudios muy detallados sobre efectos alostéricos y cooperativos, siendo quizá el de la enzimología el -

campo en el que más se ha avanzado en este respecto. En cambio en la reacción antígeno - anticuerpo solo se han informado efectos alostéricos. Ejemplos de alosterismo en el sistema antígeno-anticuerpo son la habilidad de disparar al sistema del complemento (6), la aparición de nuevos determinantes antigénicos (7), los cambios en las propiedades de reactividad del fragmento Fc con receptores celulares (8), etc. Por otro lado los efectos cooperativos en el sistema antígeno-anticuerpo se han estudiado poco y hasta ahora con resultados aparentemente negativos.

En esta tesis quiero presentar unos hallazgos en la reacción hapteno anticuerpo compatibles con un efecto cooperativo entre los dos sitios activos de la molécula de anticuerpos, y discutir la importancia biológica de la cooperatividad en la función inmunológica.

El diseño experimental aquí utilizado para estudiar la presencia de cooperatividad en la reacción antígeno anticuerpo descansa en el análisis de las curvas de fijación presentadas a la manera de Scatchard (9), con las modificaciones propias de este sistema que se detallan a continuación.

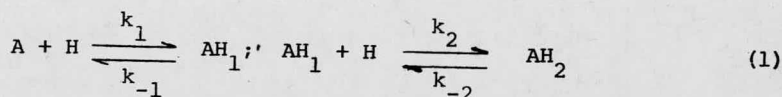
CAPITULO II

MODELO TEORICO

MODELO TEORICO

La mayor parte de los anticuerpos formados en respuesta se cundaria son moléculas bivalentes (10,11,12,13,14,15) y las ecuaciones que describan su reacción con un ligando deben considerar esta característica:

La molécula de anticuerpo (A) es capaz de unirse a una o dos moléculas del hapteno monovalente (H), dando los complejos AH₁ y AH₂:



Por la Ley de Acción de Masas las constantes de equilibrio medidas experimentalmente K₁ y K₂ están definidas por las ecuaciones:

$$K_1 = \frac{|AH_1|}{|A| |H|} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (2)$$

y

$$K_2 = \frac{|AH_2|}{|AH_1| |H|} = \frac{k_2}{k_{-2}} \quad (3)$$

Si se supone que no hay interacción entre los dos sitios y ellos son idénticos en su afinidad intrínseca por H (ver apéndice I), Klotz demuestra que K₁ y K₂ deben estar relacionadas así:

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{2k}{k/2} = 4 \quad \delta \quad \frac{K_2}{K_1} = \frac{k/2}{2k} = 0.25 \quad (4)$$

y propone la fórmula general para determinar el valor de K_i :

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} k \quad (5)$$

donde "k" es la constante de afinidad intrínseca del sitio por su ligando, "i" es el número de sitios ocupados en la "i-ésima" reacción y "n" es la valencia del anticuerpo (ver apéndice III).

La ecuación propuesta por Scatchard (6) para estudiar la fijación de un ligando a un sitio activo es:

$$\frac{|P|}{|L|} = \frac{|HS|}{|H|} = K_o |S_o| - K_o |P| \quad (6)$$

donde $|P|$ es la concentración de ligando pegado, $|L|$ es la concentración de ligando libre y $|S_o|$ es la concentración inicial de sitios activos (ver apéndice II).

En el modelo bivalente la ecuación (6) queda como:

$$\frac{|P|}{|L|} = \frac{|AH_1| + 2|AH_2|}{|H|} = (2K_2 - K_1) |AH_1| - K_1 |AH_2| + K_1 |A_o| \quad (7)$$

donde $|A_o|$ es la concentración molar de moléculas bivalentes (anticuerpos). Una gráfica de $|P|/|L|$ contra $|P|$ en estas condiciones intercepta a $|P|/|L|$ en $K_1 |A_o|$, según se aprecia en la ecuación (7) al hacer --

tender AH_1 y AH_2 a cero.

Para valorar el intercepto en el eje P es necesario hacer antes las siguientes consideraciones:

Las ecuaciones (2) y (3) se pueden escribir como

$$|AH_1| = K_1 |A| |H| \quad (8)$$

$$|AH_2| = K_1 K_2 |A| |H|^2 \quad (9);$$

la ecuación (8) se puede transformar de la siguiente manera:

$$|AH_1| = K_1 |H| (|A_0| - |AH_1| - |AH_2|)$$

$$|AH_1| (1 + K_1 |H|) = K_1 |H| (|A_0| - |AH_2|)$$

$$|AH_1| = \frac{K_1 |H| (|A_0| - |AH_2|)}{1 + K_1 |H|}$$

y sustituyendo con la ecuación (9)

$$|AH_1| = \frac{K_1 |H| |A_0|}{1 + K_1 |H| + K_2 K_1 |H|^2} \quad (10).$$

De manera análoga se puede modificar la ecuación (9)

$$|AH_2| = \frac{K_2 K_1 |H|^2 |A_0|}{1 + K_1 |H| + K_2 K_1 |H|^2} \quad (11)$$

Es aparente en las ecuaciones (10) y (11) que conforme $|H|$ tiende a --

infinito $|AH_1|$ tiende a cero y $|AH_2|$ tiende a $|A_0|$ y como

$$|P| = |AH_1| + 2|AH_2| \quad (12)$$

se puede ver que cuando $|H|$ tiende a infinito $|P|$ tiende a $2|A_0|$ y, - por lo tanto, el intercepto de la gráfica en el eje $|P|$ es igual a $-2|A_0|$ (ver Figura 1).

El estudio de la pendiente de la ecuación (7) provee información sobre la existencia de interacciones entre los sitios activos - según se demuestra a continuación.

La ecuación de Scatchard (Ec. 7) para anticuerpos bivalentes también se puede escribir como:

$$\frac{|P|}{|L|} = \frac{|A_0| K_1 (1+2|H|K_2)}{1 + K_1|H| + K_2 K_1 |H|^2} \quad (13)$$

cuya pendiente es:

$$\frac{d \frac{P}{L}}{d|P|} = \frac{d \frac{P}{L}}{d|L|} \frac{d|L|}{d|P|}$$

y en forma desarrollada es:

$$\frac{d \frac{P}{L}}{d|P|} = \frac{2|A_0| K_2 K_1 (1+K_1|H| + K_2 K_1 |H|^2) \frac{d|L|}{d|P|} - |A_0| K_1 (1+2|H|K_2) (K_1 + 2K_2 K_1 |H|) \frac{d|L|}{d|P|}}{(1+K_1|H| + K_2 K_1 |H|^2)^2}$$

(14).

Como se aprecia en la Figura 2 esta pendiente es constante cuando no hay interacciones entre ambos sitios activos ($K_1 = 4K_2$) y la gráfica corresponde a una línea recta. Puede demostrarse que si $K_1 = 4K_2$, la ecuación (13) es efectivamente la ecuación de una recta:

$$\frac{|P|}{|L|} = \frac{4K_2 |A_o| (1+2K_2 |H|)}{1+4K_2 |H| + 4K_2^2 |H|^2} = \frac{4K_2 |A_o| (1+2K_2 |H|)}{(1+2K_2 |H|)^2}$$

$$\frac{|P|}{|L|} = \frac{4K_2 |A_o|}{1+2K_2 |H|} \quad (15),$$

y expresando $|H|$ en términos de $|P|$, K_2 y $|A_o|$

$$|H| = \frac{|P|}{2K_2 (2|A_o| - |P|)} \quad (16),$$

y combinando las ecuaciones (15) y (16)

$$\frac{|P|}{|L|} = \frac{4K_2 |A_o|}{1+2K_2 \left(\frac{|P|}{2K_2 (2|A_o| - |P|)} \right)}$$

$$\frac{|P|}{|L|} = \frac{2K_2 (2|A_o| - |P|) 4K_2 |A_o|}{2K_2 (2|A_o| - |P|) + 2K_2 |P|}$$

$$\frac{|P|}{|L|} = \frac{8K_2^2 |A_o| (2|A_o| - |P|)}{2K_2 \{ (2|A_o| - |P|) + |P| \}}$$

$$\frac{|P|}{|L|} = 2K_2 (2|A_o| - |P|)$$

$$\frac{|P|}{|L|} = 4K_2|A_0| - 2K_2|P| \quad (17),$$

o expresada en términos de K_1

$$\frac{|P|}{|L|} = K_1|A_0| - \frac{K_1}{2}|P| \quad (18)$$

Si se comparan las ecuaciones (17) y (18) con la ecuación (6) se puede observar que tienen la misma estructura general y que son la ecuación de una recta. Esto quiere decir que en ausencia de interacciones, la suposición de que el anticuerpo es una molécula bivalente no altera la linealidad de una gráfica de Scatchard. En esta gráfica se pueden estimar fácilmente K_1 y $|A_0|$ a partir de los interceptos y a K_2 por consecuencia del cumplimiento de la ecuación de Klotz.

En cambio, si existen interacciones positivas (cooperación) entre los dos sitios activos entonces

$$K_2 > \frac{K_1}{4} \quad (19)$$

y si existen interacciones negativas entre los sitios

$$K_2 < \frac{K_1}{4} \quad (20).$$

En cualquiera de los casos el trazo de Scatchard ya no es lineal (ver Figura 2). En la Figura 2 se puede apreciar como cuando hay interacción positiva (cooperación) fuerte ($\frac{K_2}{K_1} > 0.5$) se produce un trazo con-

vexo por la aparición de un brazo ascendente en los valores bajos de $|P|$ que alcanza un máximo ($|P|/|L|_{\max}$) y luego el trazo desciende hasta $|A_0|$. Cuando la cooperación es débil ($0.25 < K_2/K_1 < 0.5$) no hay máximo ni, desde luego, trazo ascendente. En el caso de interacción negativa ($K_2/K_1 < 0.25$) el trazo que se produce es cóncavo, sin ningún brazo ascendente.

El valor de P/L_{\max} tiene interés en un trazo de Scatchard por dos razones:

1) La presencia de un máximo en esta curva solo es compatible en este modelo con la existencia de interacciones positivas fuertes ($K_2/K_1 > 0.5$) entre los dos sitios activos, o sea que si no hay interacciones ó estas son negativas, ó positivas débiles, no se produce el máximo en la curva teórica. Esto se puede demostrar así:

En el P/L_{\max} la pendiente del trazo de Scatchard es igual a cero, por lo tanto, de la ecuación (14)

$$\frac{dP}{d|P|} = 0$$

$$\frac{2|A_0|K_2K_1(1+K_1|H|+K_2K_1|H|^2)\frac{d|L|}{d|P|} - |A_0|K_1(1+2|H|K_2)(K_1+2K_2K_1|H|)\frac{d|L|}{d|P|}}{(1+K_1|H|+K_2K_1|H|^2)^2} = 0$$

despejando $|H|$ y reorganizando

$$|H| = - \frac{2K_2K_1 + \sqrt{4K_2^2K_1^2 + 8K_2^2K_1(2K_2 - K_1)}}{4K_2^2K_1}$$

tomando el valor positivo de la raíz

$$H = \frac{-1 + \sqrt{4 \frac{K_2}{K_1} - 1}}{2K_2} \quad (21)$$

En la ecuación (21) es aparente que para que exista un máximo en valores positivos de hapteno libre (o sea en condiciones experimentales) se debe llenar la condición que.

$$K_2 > \frac{K_1}{2} \quad (22)$$

o sea que $\frac{K_2}{K_1}$ debe ser mayor que 0.5

2) El hecho de que una gráfica de Scatchard tenga un máximo nos permite calcular el valor de K_2 a partir del valor del máximo. Se puede demostrar a partir de las ecuaciones (13) y (21) que

$$\left(\frac{P}{L}\right)_{\max} = \frac{2|A_o| K_2 \sqrt{4K_1K_2 - K_1^2}}{4K_2 - K_1} \quad (23)$$

y a partir de esta ecuación que

$$K_2 = \frac{\left(\frac{P}{L}\right)_{\max}^2 + \sqrt{\left(\frac{P}{L}\right)_{\max}^2 \left\{ \left(\frac{P}{L}\right)_{\max} - |A_o|^2 K_1^2 \right\}}}{2|A_o|^2 K_1} \quad (24)$$

Otro valor que permite estimar K_2 es la concentración de ligando pegado en el máximo $\left(\frac{P}{L}\right)_{\max}$ que hemos denominado $|P|_{\max}$:

$$|P|_{\max} = |A_0| \left(1 - \sqrt{\frac{4K_1 K_2 - K_1^2}{4K_2 - K_1}} \right) \quad (25)$$

de donde se puede calcular K_2 :

$$|A_0| - |P|_{\max} = |A_0| \sqrt{\frac{4K_1 K_2 - K_1^2}{4K_2 - K_1}}$$

$$\left(|A_0| - |P|_{\max} \right)^2 = \frac{|A_0|^2 K_1 (4K_2 - K_1)}{(4K_2 - K_1)^2} = \frac{|A_0|^2 K_1}{4K_2 - K_1}$$

$$4K_2 - K_1 = \frac{|A_0|^2 K_1}{\left(|A_0| - |P|_{\max} \right)^2}$$

$$K_2 = \frac{K_1}{4} \left(\frac{|A_0|^2}{\left(|A_0| - |P|_{\max} \right)^2} + 1 \right) \quad (26)$$

En resumen:

a) K_2 debe ser mayor a $K_1/2$ para que en el modelo biva--- lente haya un máximo en una gráfica de Scatchard, lo que solo es compatible con la existencia de interacciones positivas o cooperación en la reacción.

b) K_1 se puede estimar del intercepto I en el eje $\frac{|P|}{|L|}$, pues $I = |A_0| K_1$, según se puede ver en la ecuación (7) cuando $|H|$ y $|P|$ tienden a cero.

c) $|A_0|$ se puede estimar del intercepto I' en el eje $|P|$, pues $I' = 2|A_0|$, según es aparente en las ecuaciones (10), (11) y (12) cuando $|H|$ tiende a infinito.

d) K_2 se puede estimar con las ecuaciones (24) y (26).

e) El cociente K_2/K_1 proporciona un estimado de la magnitud de la cooperación, según se aparte del valor 0.25 (Fig. 2).

Así que, de haber cooperación donde $K_2/K_1 > 0.5$ en la relación del hapteno con el anticuerpo, esperamos un trazo ascendente en la gráfica de Scatchard en los valores bajos de ligando pegado. La cooperación donde $0.25 < K_2/K_1 < 0.5$ no es fácilmente aparente en el trazo de Scatchard pues no tiene un máximo. Para este propósito escogimos un sistema con el hapteno monovalente: 2,4-Dinitrofenil-lisina (DNP-lis) y anticuerpos anti 2-4-Dinitrofenol (AcDNP). Este sistema tiene la ventaja de que se pueden medir concentraciones muy pequeñas del hapteno si éste está marcado con un isótopo radioactivo.

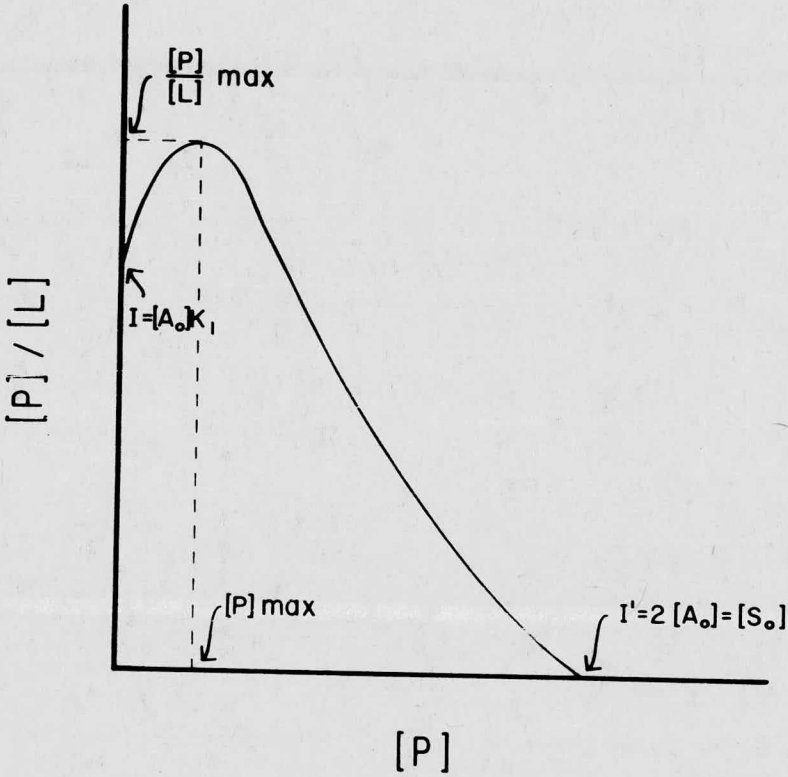


Figura 1. Diagrama de una gráfica de Scatchard en la que - existe cooperatividad mostrando los puntos e interceptos --- principales para calcular los parametros que dan información sobre la magnitud de la cooperatividad (ver texto).

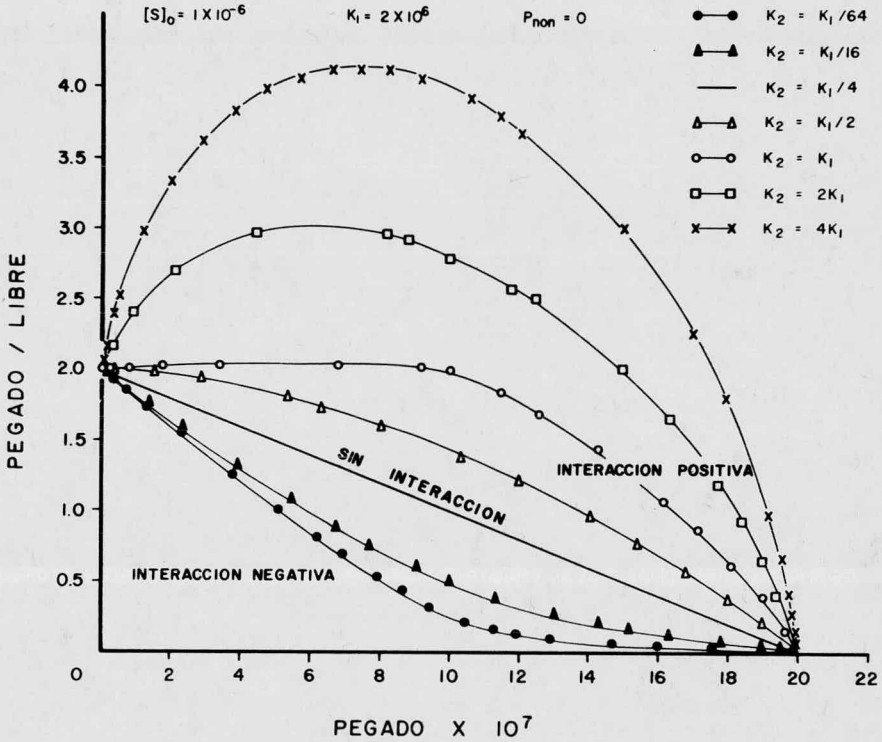


Figura 2. Gráfica de Scatchard teórica, suponiendo distintas relaciones entre K_1 y K_2 . Los valores para $[S]_0$ y K_1 se le dieron a una computadora para que trazara las gráficas -- variando K_2 y suponiendo que no hay pegado inespecífico. -- Nótese como la gráfica es una recta si no hay interacción, -- forma una curva concava cuando hay interacción negativa y -- una curva convexa cuando hay interacción positiva.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

Preparación del antígeno

Se dinitrofenilaron 2 gr. de albúmina sérica bovina (BSA PM 60000, Sigma Chemical Company) por el método de Eisen (16), con 1 cloro-2-4 dinitrobenceno. El reactivo no pegado se eliminó por diálisis. Para calcular la relación molar de grupos ξ -DNP-lisina por mol de proteína se determinó proteína por el método de Lowry et al (17) y se midió la absorbancia de la proteína sustituida a 360 nm. La dinitrofenilación ocurre casi exclusivamente en los grupos ξ -amino de los residuos lisil libres de las proteínas (16). El coeficiente de extinción molar de la ξ -DNP-lisina se tomó como 17,530 (18). El cálculo de la relación molar dió 23 grupos de hapteno por molécula de BSA ($\text{DNP}_{23}\text{BSA}$).

Se dinitrofeniló también Ovoalbúmina (OVA, PM 43500, Sigma Chemical Company) por otro método, también de Eisen (19), con 2-4 dinitrobencensulfonato de sodio (Eastman Chemical Company). El reactivo no pegado a la proteína se separó por cromatografía en una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals) de 2.5 x 30 cm. La relación molar de grupos DNP lisina por molécula de OVA fue de 16 ($\text{DNP}_{16}\text{OVA}$).

Inmunización

La inmunización se llevó a cabo en un borrego previamente inmunizado con un conjugado DNP_6BSA . Se inmunizó la primera vez con una emulsión de 1 ml de $\text{DNP}_{23}\text{BSA}$ (5 mg/ml) y 1 ml de Adyuvante de Freund

completo repartida en 2 sitios diferentes en inyección subcutánea. A los 8 días se sangró de la vena yugular 500 ml. Cada 15 días a partir de la primera inmunización se le dieron refuerzos de 1 ml (5 mg/ml) de DNP₂₃ BSA sin adyuvante en un solo sitio por inyección subcutánea. Cada 15 días después del 1er. sangrado se sangró el borrego de la vena yugular un volumen aproximado de 500 ml. El proceso se hizo 4 veces obteniéndose en total 2 lts. de sangre.

Obtención del suero y precipitación de las γ globulinas

El suero de cada sangrado (aproximadamente 250 ml) se obtuvo dejando coagular la sangre a temperatura ambiente varias horas (3-5 horas) y poniéndolo aproximadamente 15 horas a 4° C. El suero se decantó y se centrifugó a 2500 rpm a 4° C durante 30 min. para quitar células, y luego se volvió a decantar y se guardó congelado.

Las γ globulinas se precipitaron 3 veces por el método de sulfato de amonio (20) y se centrifugaron a 10,000 rpm 15 minutos a 4° C antes de guardarse congeladas. Solo se descongelaron para determinar si tenían anticuerpos activos o para procesarse.

Preparación de Sepharosa 4B-lisina-DNP

Se utilizó una ligera modificación del método de March -- Parikh y Cuatrecasas (21). Se acoplaron 6.5 mg de DNP-lis (Sigma Chemical Company) a 200 ml de Sepharosa 4B (Pharmacia Fine Chemicals) activada con una solución de bromuro de cianógeno (Merck) en acetonitrilo (Merck).

El exceso de DNP-lis fue eliminado por lavados con amortiguador de boratos y los grupos activos en la Sefarosa fueron bloqueados con glicina.

Purificación de los anticuerpos anti-DNP

Los anticuerpos se purificaron por cromatografía de afinidad en "lotes" (22). Se mezclaron γ -globulinas anti-DNP y Sepharosa -- DNP-lisina y se agitaron 12 horas a 25° C, se lavó la Sepharosa con PBS y se eluyeron los anticuerpos con una solución 10^{-3} M de 2-4 dinitrofenol (Merck). El eluido fue concentrado 10 veces con un aparato de ultrafiltración (Amicon) equipado con una membrana que retiene moléculas de -- PM > a 30,000 y se separaron los anticuerpos del DNP pasando la mezcla -- por una columna de Sephadex G25 grueso de 2.5 x 30 cm (ver Figura 3). Se colectaron fracciones de 10 ml y se determinó su absorbancia a 280 nm y a 360 nm. Las fracciones que absorbieron a 280 nm se juntaron y se voluvieron a concentrar aproximadamente 4 veces. Se trabajó con una mezcla de anticuerpos puros de 4 sangrados diferentes.

Determinación de la concentración de anticuerpos

La concentración de proteína en la solución de anticuerpos se determinó por el método de Lowry et al (17) y fue de 0.64 mg/ml. -- Para la diálisis en equilibrio se diluyó 1:4 quedando siempre una con-- centración de 0.16 mg/ml.

Determinación de actividad de anticuerpo en suero, fracción de γ -globulinas y anticuerpos puros

Se hizo por doble inmunodifusión radial en agar purificado

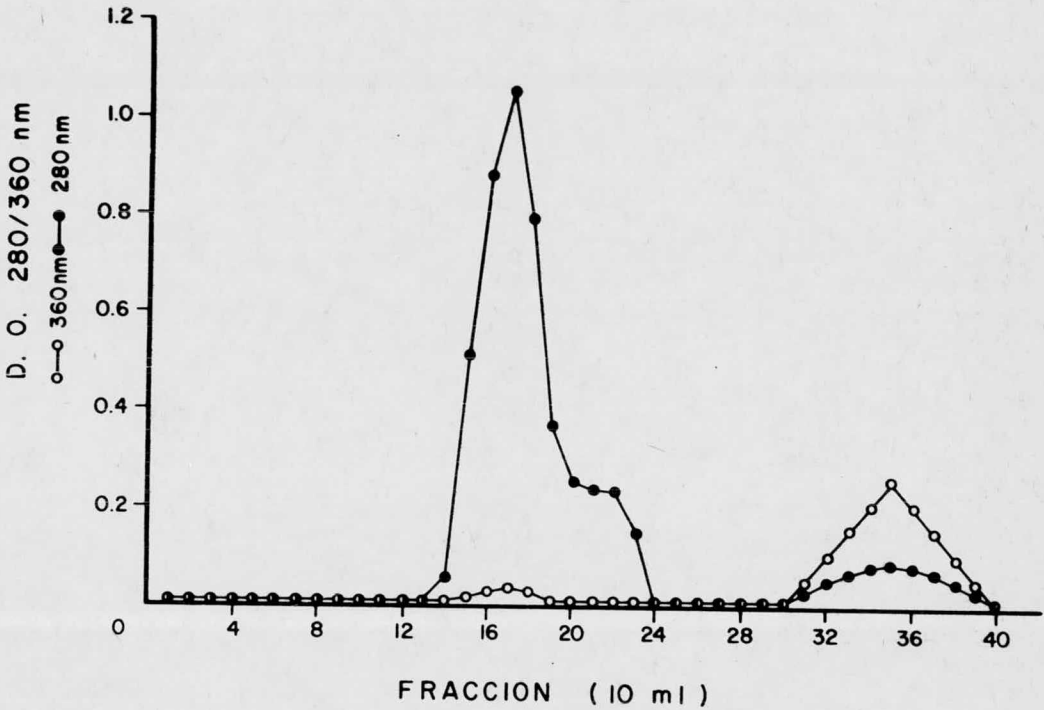


Figura 3. Separación de Anticuerpos anti-DNP de DNP en columna de Sephadex G 25 grueso. La figura 3 ilustra la elución de anticuerpos puros anti-DNP después de ser separados de la Sepharosa-2-4 DNP lisina con dinitrofenol. La absorbancia a 280 nm se debe casi exclusivamente a los anticuerpos. A 360 nm la absorbancia que presentan se debe a la proteína ya que se ha demostrado que esta tiene una ligera absorción a esta longitud de onda. Por lo tanto la columna separó al dinitrofenol de los anticuerpos y estos están prácticamente puros. El dinitrofenol tiene su máximo de absorbancia a 360 nm pero también absorbe a 280 nm. Es retenido por la columna y sale después de los anticuerpos.

al 1 % en PBS, poniendo el suero, γ -globulinas ó anticuerpos puros a --
reaccionar contra concentraciones entre 5 mg/ml hasta 0.16 mg/ml de --
DNP₁₆OVA. Se utilizó DNP₁₆OVA para que solo precipitaran los anticuer-
pos dirigidos contra el hapteno dinitrofenol ya que la BSA y la OVA no
dan reacción cruzada (Ver Fig. 4).

Determinación de la clase de globulinas en que está la población de -- anticuerpos

Esta determinación se hizo por inmunoelectroforesis en agar
al 1 % en amortiguador de barbital. Se colocaron aproximadamente 50 ul
de anticuerpos puros en un pozo y suero total en el otro. Se corrió du-
rante 1 hora a 350 voltios y a 3 miliamperios por portaobjetos (23), y se
colocó antisuero anticarnero de conejo en el canal de enmedio. Como se -
puede apreciar en la Fig. 5 los anticuerpos purificados son probablemen-
te una sola clase de inmunoglobulinas que migran de manera parecida a --
las inmunoglobulinas G.

Preparación de las soluciones de ξ -3-5-³H-2,4 dinitrofenil lisina

Se utilizó una solución de ξ -3-5-³H-2,4 dinitrofenil lisina
(³HDNP-lis New England Nuclear) con las siguientes características: --
1mCi en 0.28 mg de ³HDNP-lis disueltos en 1 ml de HCL 1.0 N.

La actividad específica es 4.1157×10^{13} dps/mol y su concen-
tración es 8.99454×10^{-4} molar.

Se preparó una solución madre que tiene una concentración -

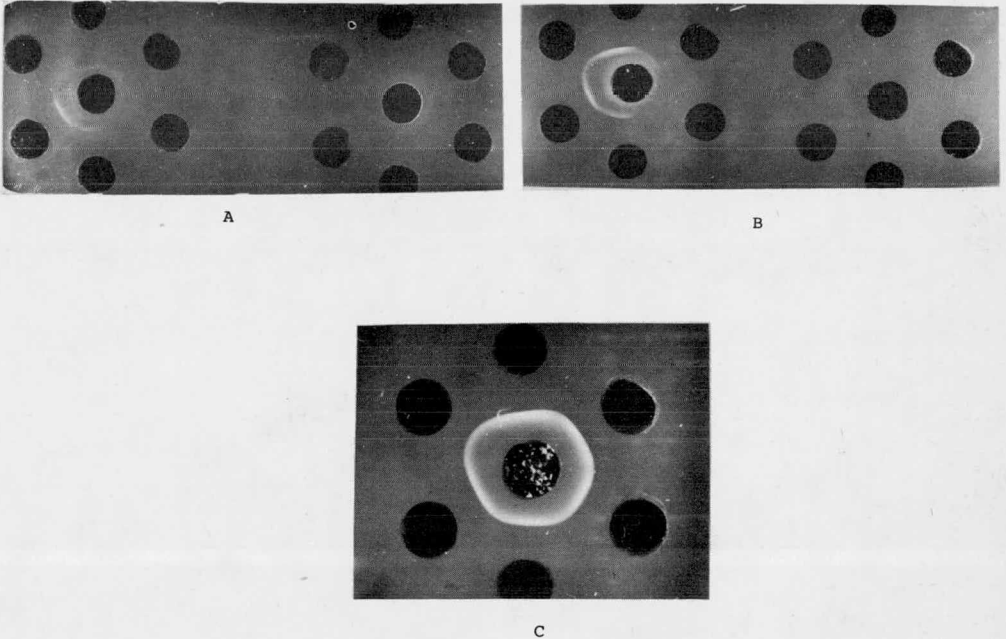
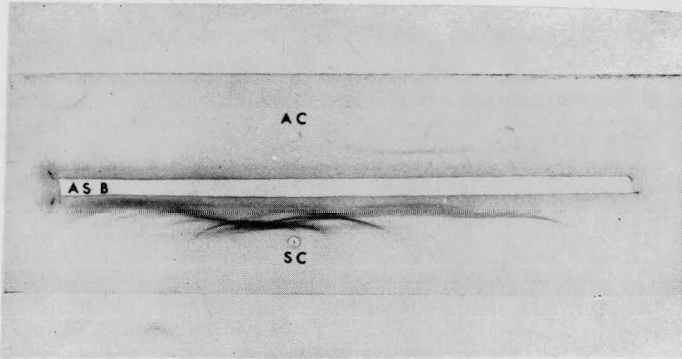
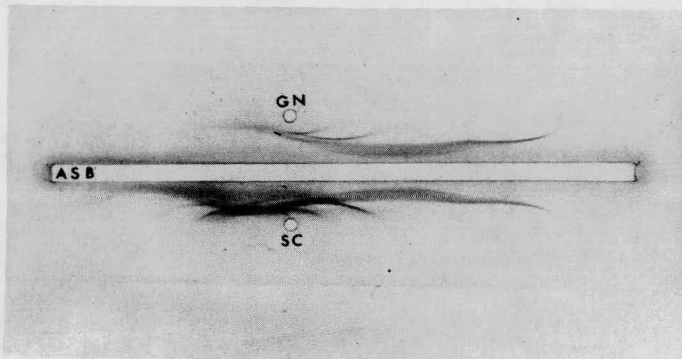


Figura 4. La figura 4 muestra doble inmunodifusión en gel de agar en PBS (Técnica de Ouchterlony). Todos los pozos exteriores contenían DNP₁₆OVA en diferentes concentraciones, - los que están situados en el extremo superior (12 hrs) con-- tenían 5 mg/ml de proteína, y el resto diluciones 1:2 progre-- siva, en el sentido de las manecillas del reloj. En las figu-- ras 4A y B se encuentra del lado derecho en el pozo central un suero normal de borrego y γ -globulinas normales respectivamente y a la izquierda suero anti DNP_{2,3}BSA y γ -globulinas - anti DNP_{2,3}BSA respectivamente. En la figura 4C el pozo central contiene anticuerpos anti DNP puros. Es interesante ob-- servar como con diferentes pasos de la purificación se pue-- den concentrar los anticuerpos y que estos conserven su capa-- cidad de precipitar a la proteína heteróloga acoplada al -- hapteno.



A



B

Figura 5. Determinación de la clase de γ -globulinas en que está la población de anticuerpos. La Figura 5A muestra que los anticuerpos purificados (AC) pertenecen probablemente solo a una clase de inmunoglobulinas. En el otro pozo hay un suero completo de borrego (SC) para comparar las bandas que aparecen en este, con la banda de los anticuerpos puros. La figura 5B muestra una fracción de gamaglobulinas normales -- precipitadas 3 veces con sulfato de amonio (GN) y el otro pozo también tiene un suero completo de borrego. Se puede apreciar que las gamaglobulinas normales pertenecen a varias clases de inmunoglobulinas. Con estas globulinas se hizo una -- diálisis en equilibrio para determinar el valor de $|P|/|L|$ -- inespecífico o " α " (Ver Fig. 6).

4.5×10^{-6} M y de ella diluciones que cubrieran el rango de 4.7×10^{-9} M a 3×10^{-6} M.

A continuación se presenta una descripción detallada de la técnica de diálisis en equilibrio ya que este es el método fundamental en la tesis y por el cual se obtuvieron los datos que la apoyan.

Diálisis en Equilibrio (Ver Apéndice IV)

a) Preparación de membranas de diálisis.

Se recortaron las membranas de papel de diálisis y se hirvieron en agua destilada 3 veces con cambio de agua cada vez que hierve el agua. (Esto se hace para quitar la glicerina que viene recubriendo a las membranas de diálisis como conservador y para sellar a las membranas).

b) Preparación de los módulos con las cámaras para la diálisis.

Se lavaron los módulos de lucita con agua corriente de la llave durante 2 días para eliminar trazos de material radioactivo pegado a las paredes y después con 3 cambios de 1 litro de agua destilada para eliminar las sales del agua de la llave. Se preparó una solución al 1 % de Siliclad (silicón soluble en agua de Clay Adams) y se lavó cada módulo por lo menos 1 minuto en esta solución.

Se lavaron después todos los módulos en 1 litro de agua --

desionizada bidestilada y se secaron con aire.

Los empaques de hule se recubrieron de una capa delgada de grasa de silicón y se colocaron en su posición frente a la cámara --- (Ver Fig. 1Db). Se tomó una membrana y se secó con una gasa y se colocó entre 2 módulos de manera que quedase perfectamente estirada en -- toda la superficie de los módulos.

Se preparaban los pares de módulos necesarios y se colocaban en el aparato con el motor (Ver Fig. 1Da).

c) Inyección de las soluciones en cada cámara del módulo.

Los módulos tienen 8 cámaras separadas de las cámaras de - su módulo opuesto por la membrana de diálisis y tienen un orificio por donde se puede inyectar la solución correspondiente (Ver Fig. 1Dc).

Las cámaras tienen una capacidad aproximada de unos 120 ul y se inyectaron 100 ul con una jeringa automática de volumen constante (Hamilton): primero una solución de 0.16 mg/ml de anticuerpos puros - en todas las cámaras que están a un lado de las membranas y después se lavó la jeringa y se inyectó el mismo volumen de las soluciones de -- ³H-DNP-lis a partir de la más diluida hasta la más concentrada en las cámaras de enfrente. Después de cada inyección se tapó el orificio -- con cinta adhesiva.

El aparato se colocó a 4° C y se prendió el motor que hace rotar a los módulos lentamente (agitando a las soluciones) durante 72 horas.

d) Toma de muestra de las cámaras

Con la jeringa se tomaron 50 ul de cada cámara comenzando por la solución de hapteno más diluida terminando con la solución de anticuerpo que estuvo en contacto con la solución de hapteno más concentrada, lavando la jeringa donde era necesario.

Cuenta de las muestras

Los 50 ul de cada cámara se pusieron en un frasco de polietileno, se les agregaron 0.4 ml de NCS (Amersham and Searle) y 10 ml de líquido de centelleo, se agitaron y se contaron en un contador de centelleo Nuclear Chicago Mark II (Eficiencia en ^3H , 45.04 %).

Tratamiento de los datos

Las cuentas por minuto que se obtenían del contador de centelleo se ordenaban en sentido de concentración creciente de hapteno.- Se restaba el |L| del |P| + |L| para obtener |P| (ver por ejemplo Tabla 5). Se calculaban |P| y |L| en concentración molar por la fórmula

$$|P| = \text{CPM} \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{\text{actividad específica (dps/mol)}} \times \frac{1}{\text{Eficiencia}} \times \frac{\text{vol. de 1 lt.}}{\text{vol. de muestra}}$$

y para calcular el pegado específico ($|P|_{\text{esp}}$) y el libre real ($|L|_{\text{real}}$) se utilizaban las siguientes fórmulas:

$$|P|_{\text{ESP}} = |P| - \alpha |L|$$

$$|L|_{\text{REAL}} = |L| + \alpha |L|$$

donde " α " se define como pegado inespecífico (ver figura 6).

Estos son los valores que aparecen en las tablas de los experimentos y se hacían gráficas de Scatchard con esos valores poniendo las abscisas el valor $|P|_{\text{ESP}} \times 10^{10}$ y en las ordenadas el valor $|P|_{\text{ESP}} / |L|_{\text{REAL}}$.

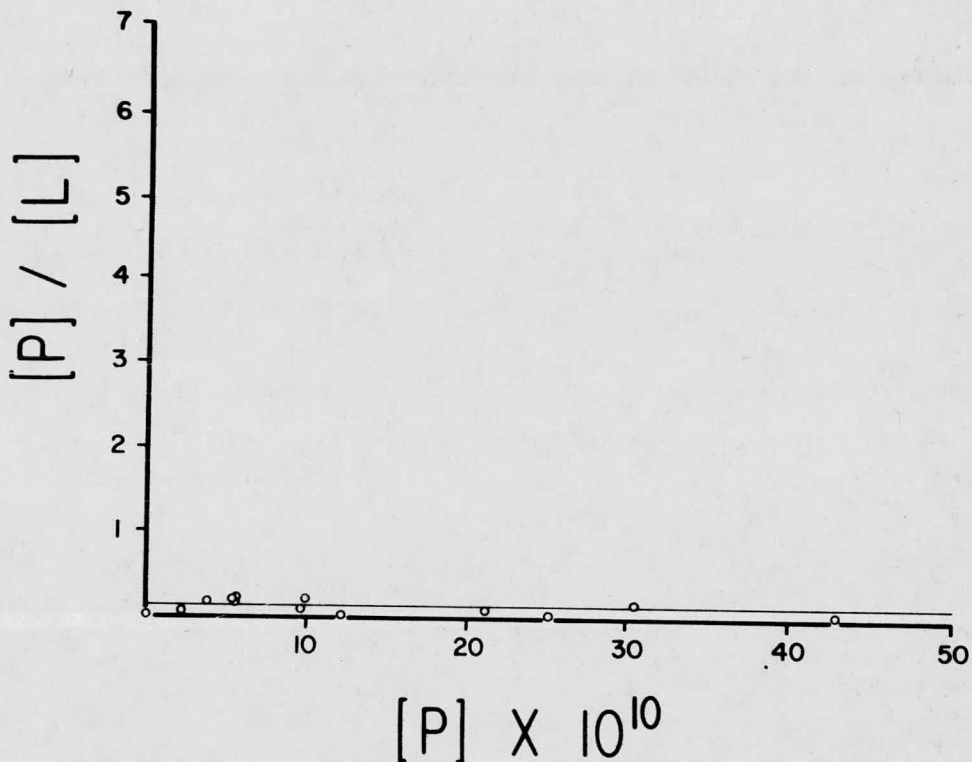


Figura 6. Diálisis en equilibrio para determinar "α". - "α" lo definimos como el valor promedio de $|P|/|L|$ inespe-
cífico. En esta figura se ven los resultados de una diá-
lisis en equilibrio con gamaglobulinas normales (no diri-
gidas contra DNP Fig. 5 B) y $^3\text{-HDNP-lis}$ en concentracio-
nes de 5×10^{-9} a 3×10^{-6} . El promedio del valor $|P|/|L|$
es: 0.0757 y este es considerado como "α".

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS

Todas las diálisis en equilibrio fueron hechas con la misma concentración de anticuerpo (0.16 mg/ml) y las mismas concentraciones de hapteno. Las diálisis en equilibrio se hicieron en 2 aparatos diferentes (uno de Hoefer Scientific Instruments y el otro una copia del primero hecha en el Centro de Instrumentos de la U.N.A.M.). Las diálisis en equilibrio 1,2,3 y 6 se hicieron en el primer aparato y las diálisis 4 y 5 en el segundo aparato.

La 6a. diálisis en equilibrio se hizo por duplicado y fue la que se hizo primero, en ella se echaron a perder varias muestras de notadas como (*) (Ver Tabla 6).

En las diálisis en equilibrio 1,2 y 3 la curva de $|P|$ --- $ESP/|L|$ REAL contra $|P|$ ESP $\times 10^{10}$ variaba según el módulo de que se tomaran las muestras. Se escogió entonces un módulo y se graficaron los datos, que, como se puede apreciar en las gráficas o tablas correspondientes, son muy parecidos entre si.

La diálisis en equilibrio 4 se hizo por triplicado y la diálisis en equilibrio 5 por duplicado (Ver Tablas 4 y 5).

Para analizar los resultados creo que es conveniente hacerlo de la siguiente manera:

1o. Se pueden dividir los experimentos en 2 conjuntos, un conjunto donde la variación es mínima (exp. 1,2 y 3) y otro con resultados más erráticos (exp. 4,5 y 6).

2o. En todos los experimentos hay un trazo ascendente en las concentraciones bajas de hapteno y un trazo descendente en las concentraciones más altas, en otras palabras, siempre hay un máximo.

Con los datos de las curvas se hicieron regresiones lineales por el método de mínimos cuadrados para ver si estadísticamente -- correspondían a una línea ascendente y a otra descendente, calculándose también el coeficiente de correlación linear de estas regresiones. Los resultados estan en la Tabla 7 y se puede ver en ella como en todos los casos, a excepción del experimento 4, la correlación es buena ($r^2 \sim 0.7$).

3o. Los experimentos 1,2 y 3 tienen curvas muy parecidas (Figs. 7, 8 y 9) y al calcular K_1 y K_2 dan resultados parecidos entre si por cualquiera de los dos métodos (Ver tabla 8). Su estimado de $|A_0|$ es en general más alto que para los otros experimentos, pero su valor P/L_{\max} es bastante parecido entre si.

4o. A los datos de las diálisis en equilibrio 4, 5 y 6 -- solo se le pueden ajustar curvas con formas muy variadas entre si (ver Fig. 10, 11 y 12) y se debe notar que su valor de $|P|/|L|_{\max}$ varía --- bastante; también los estimados para $|A_0|$. Sin embargo en la tabla 8 se puede ver que el valor de K_2/K_1 estimado por P_{\max} varía bastante -

poco y se parece mucho a los estimados para las diálisis en equilibrio 1,2 y 3, mientras que el valor de K_2/K_1 estimado por $|P|/|L|_{\max}$ se --- aparta muchísimo de los valores obtenidos para la diálisis en equilibrio 1,2 y 3, sobre todo las diálisis en equilibrio 5 y 6. Todavía no tenemos explicación para esta variación, ni sabemos cual de los estimados de K_2/K_1 sea el mejor o más cercano a la realidad, o si ambos lo sean pero para dos poblaciones diferentes de anticuerpos. Pero lo interesante en estas dos series de datos es que el valor de K_2/K_1 siempre es mayor a 0.5, esto quiere decir que siempre se reúnen las condiciones para que haya cooperatividad y se produzca un máximo en el trazo de Scatchard.

TABLA 1

Concentración molar ³ H-DNP-lis	CPM L	CPM P+L	CPM P+L-L	Libre REAL x 10 ¹⁰	Pegado ESP x 10 ¹⁰	P ESP / L REAL
4.73 x 10 ⁻⁹	92	395	303	17.984	53.842	2.9939
1.03 x 10 ⁻⁸	116	586	470	22.675	83.882	3.693
3.3 x 10 ⁻⁸	301	1612	1311	58.838	234.29	3.9818
7.96 x 10 ⁻⁸	576	2907	2331	112.59	416.01	3.6948
1.09 x 10 ⁻⁷	740	4830	4090	144.65	733.63	5.0717
5.01 x 10 ⁻⁷	5127	19809	14682	1002.2	2599.8	2.5941
9.7 x 10 ⁻⁷	12477	34087	21610	2439.0	3759.4	1.5414
3.07 x 10 ⁻⁶	65385	99434	34049	12781	5299.7	0.4147

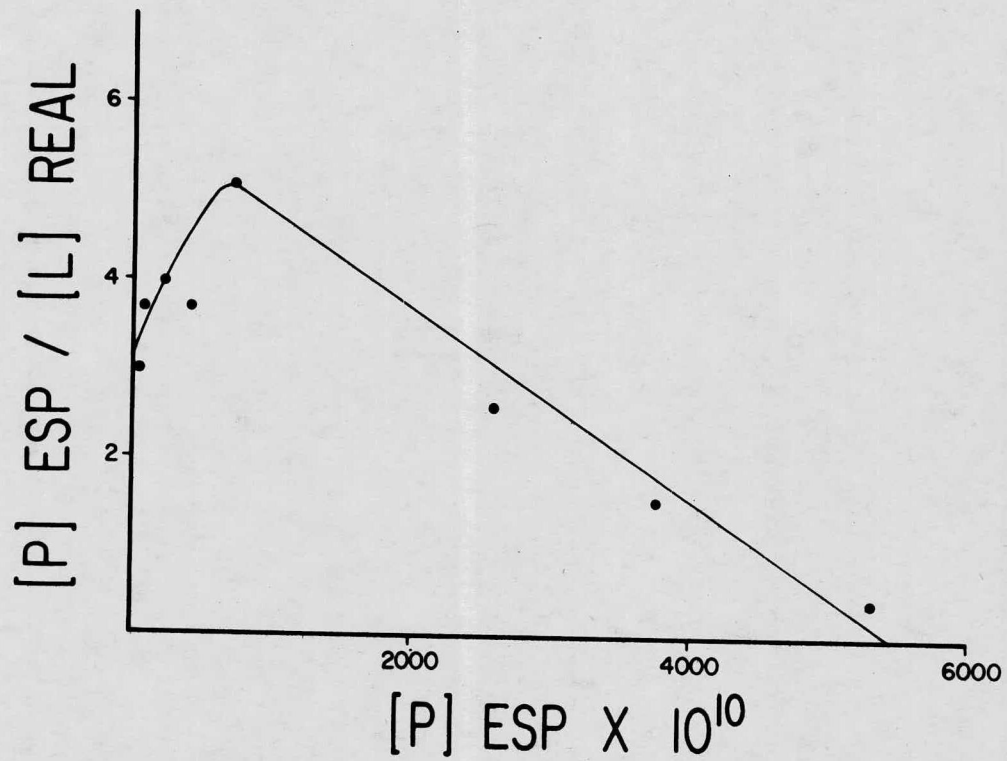


Figura 7

TABLA 2

Concentración molar $^3\text{H-DNP-lis}$	CPM L	CPM P+L	CPM P+L-L	Libre REAL x 10^{10}	Pegado ESP x 10^{10}	P ESP / L REAL
4.73×10^{-9}	95	391	296	18.57	52.529	2.8286
1.03×10^{-8}	137	617	480	26.78	85.414	3.1894
3.3×10^{-8}	282	1880	1598	55.124	286.73	5.2016
7.96×10^{-8}	656	4333	3677	128.23	659.67	5.1444
1.09×10^{-7}	981	5627	4646	191.76	831.44	4.3358
5.01×10^{-7}	6041	26166	20121	1181.7	3576.3	3.0265
9.7×10^{-7}	14318	48118	33800	2798.8	5950.9	2.1262
3.07×10^{-6}	67388	100036	32648	13173	5017.6	0.3809

33

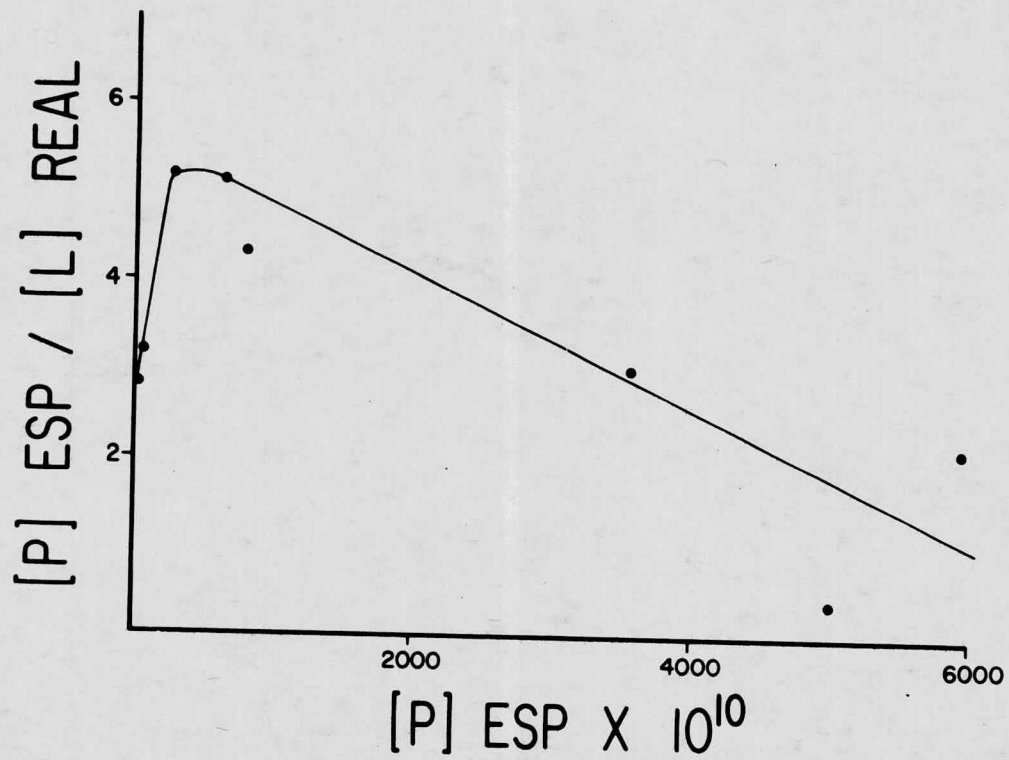


Figura 8

TABLA 3

Concentración molar $^3\text{H-DNP-lis}$	CPM L	CPM P+L	CPM P+L-L	Libre REAL x 10^{10}	Pegado ESP x 10^{10}	P ESP / L REAL
4.73×10^{-9}	115	247	132	22.480	22.43	0.998
1.03×10^{-8}	107	411	304	20.916	53.82	2.5731
3.3×10^{-8}	175	1069	894	34.208	160.18	4.6824
7.96×10^{-8}	357	2290	1933	69.785	346.63	4.967
1.09×10^{-7}	515	3535	3020	100.67	542.13	5.3852
5.01×10^{-7}	3229	14915	11686	631.19	2080.9	3.2968
9.7×10^{-7}	7309	28493	21184	1428.7	3752.4	2.6264
3.07×10^{-6}	43499	69116	25617	8503.0	4064.9	0.4781

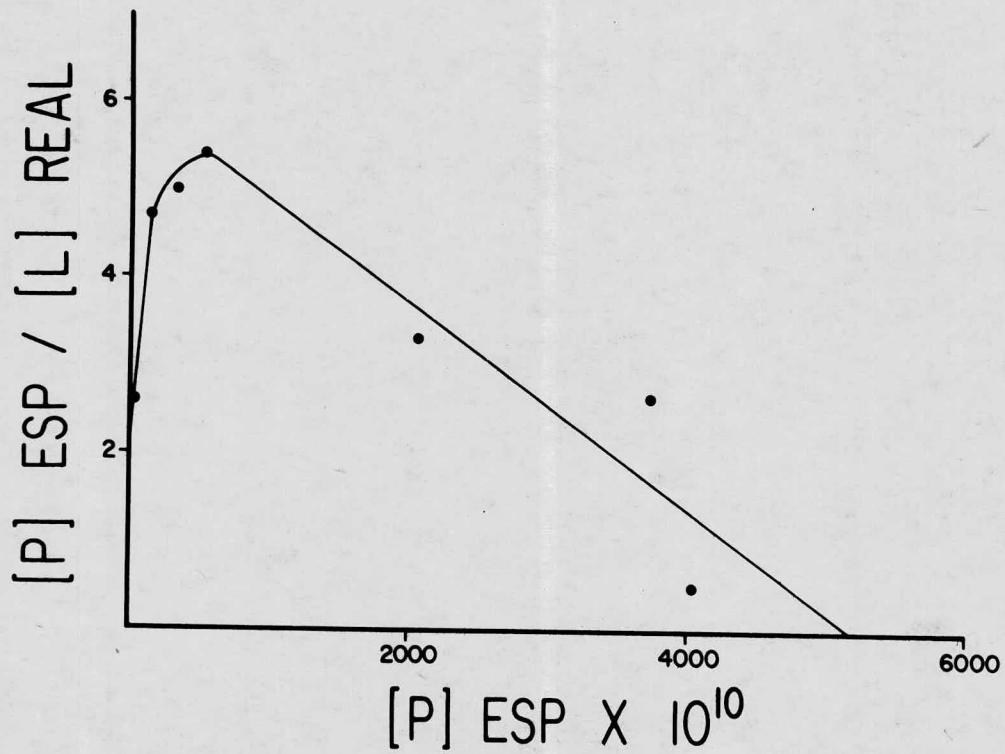


Figura 9

TABLA 4

Concentración molar ³ H-DNP-lis	CPM L	CPM P+L	CPM P+L-L	Libre REAL x 10 ¹⁰	Pegado ESP x 10 ¹⁰	P ESP / L REAL
4.73 x 10 ⁻⁹	165	550	385	32.254	67.758	2.1008
	*	*	*	*	*	*
1.03 x 10 ⁻⁸	137	417	280	26.78	49.046	1.8314
	162	614	452	31.667	79.982	2.5257
	101	415	314	19.743	55.72	2.8222
	*	*	*	*	*	*
3.3 x 10 ⁻⁸	270	1132	862	52.779	153.06	2.9001
	305	1268	963	59.62	170.95	2.8673
	271	1107	836	52.974	148.32	2.7999
7.96 x 10 ⁻⁸	623	2489	1866	121.78	330.81	2.7165
	466	2408	1942	91.092	346.78	3.8069
	*	*	*	*	*	*
1.09 x 10 ⁻⁷	854	3292	2438	166.94	431.68	2.5859
	1054	3155	2101	206.03	367.67	1.7845
	*	*	*	*	*	*
5.01 x 10 ⁻⁷	4362	13941	9579	852.67	1682.3	1.973
	4315	13035	8720	843.48	1526.8	1.8101
	*	*	*	*	*	*
9.7 x 10 ⁻⁷	*	*	*	*	*	*
	7924	23609	15685	1549.0	2744.1	1.7716
	*	*	*	*	*	*
3.07 x 10 ⁻⁶	42089	62899	20810	8227.4	3210.1	0.3902
	45147	65731	20584	8825.2	3127.3	0.3544
	42680	63203	20523	8342.9	3149.8	0.3775

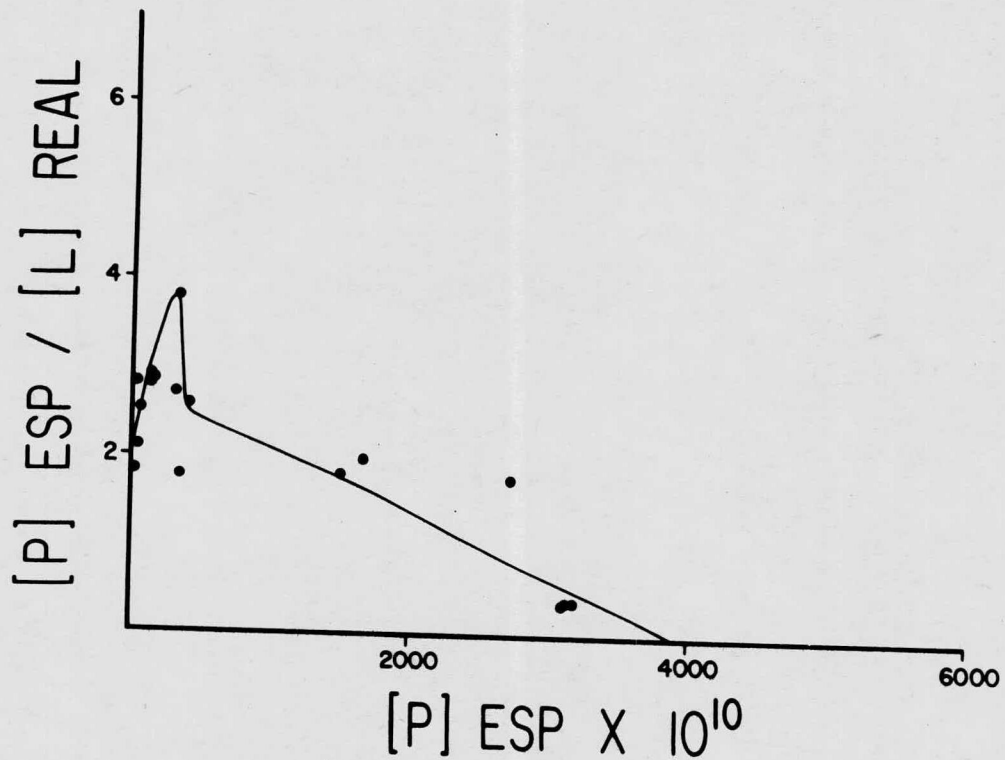


Figura 10

TABLA 5

Concentración molar $^3\text{H-DNP-lis}$	CPM L	CPM P+L	CPM P+L-L	Libre REAL x 10^{10}	Pegado ESP x 10^{10}	P ESP / L REAL
4.73×10^{-9}	297	476	179	58.057	28.499	0.4909
	182	470	288	35.577	49.887	1.4022
1.03×10^{-8}	385	725	340	75.258	56.575	0.7517
	194	637	443	37.922	77.909	2.0544
3.3×10^{-8}	540	1731	1191	105.56	209.21	1.9819
	409	1681	1272	79.95	225.72	2.8233
7.96×10^{-8}	951	3449	2498	185.9	441.26	2.3737
	1021	3500	2479	199.58	436.85	2.1888
1.09×10^{-7}	2340	4266	1926	477.41	318.31	0.6959
	2005	3936	1931	391.93	323.79	0.8261
5.01×10^{-7}	10360	15190	4830	2025.1	736.99	0.3639
	11203	14472	3269	2189.9	441.64	0.2017
9.7×10^{-7}	17184	31167	13983	3359.1	2308.3	0.6872
	17042	35331	18289	3331.3	3093.2	0.9285
3.07×10^{-6}	64907	99209	34302	12688	5352.2	0.4218
	67729	98103	30374	13239	4599.5	0.3474

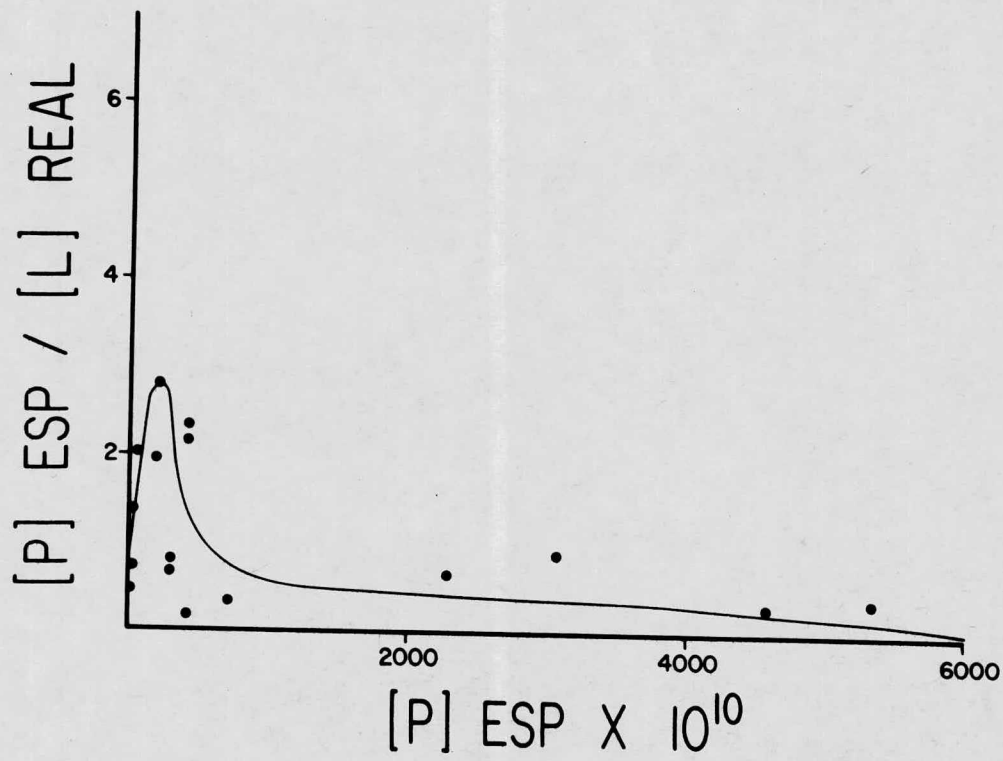


Figura 11

TABLA 6

Concentración 3 molar -H-DNP-lis	CPM L	CPM P+L	CPM P+L-L	Libre REAL x 10 ¹⁰	Pegado ESP x 10 ¹⁰	P ESP / L REAL
4.73 x 10 ⁻⁹	150 *	204 *	54 *	29.321 *	7.7736 *	0.2651 *
1.03 x 10 ⁻⁸	139 *	385 *	246 *	27.171 *	42.837 *	1.5765 *
3.3 x 10 ⁻⁸	112 160	495 699	383 539	21.893 31.276	68.117 95.829	3.1113 3.0640
7.96 x 10 ⁻⁸	216 258	1667 2410	1451 1783	42.223 50.433	260.9 320.7	6.1792 6.3589
1.09 x 10 ⁻⁷	1157 581	4143 2409	2986 1828	226.17 113.57	527.19 324.48	2.3310 2.857
5.01 x 10 ⁻⁷	7742 4501	23646 13430	15904 8929	1513.4 879.84	2786.4 1562.3	1.8412 1.7756
9.7 x 10 ⁻⁷	43143 *	113713 *	70570 *	8433.4 *	12244.0 *	1.4518 *
3.07 x 10 ⁻⁶	48721 *	75257 *	26536 *	9523.8 *	4160.8 *	0.4369 *

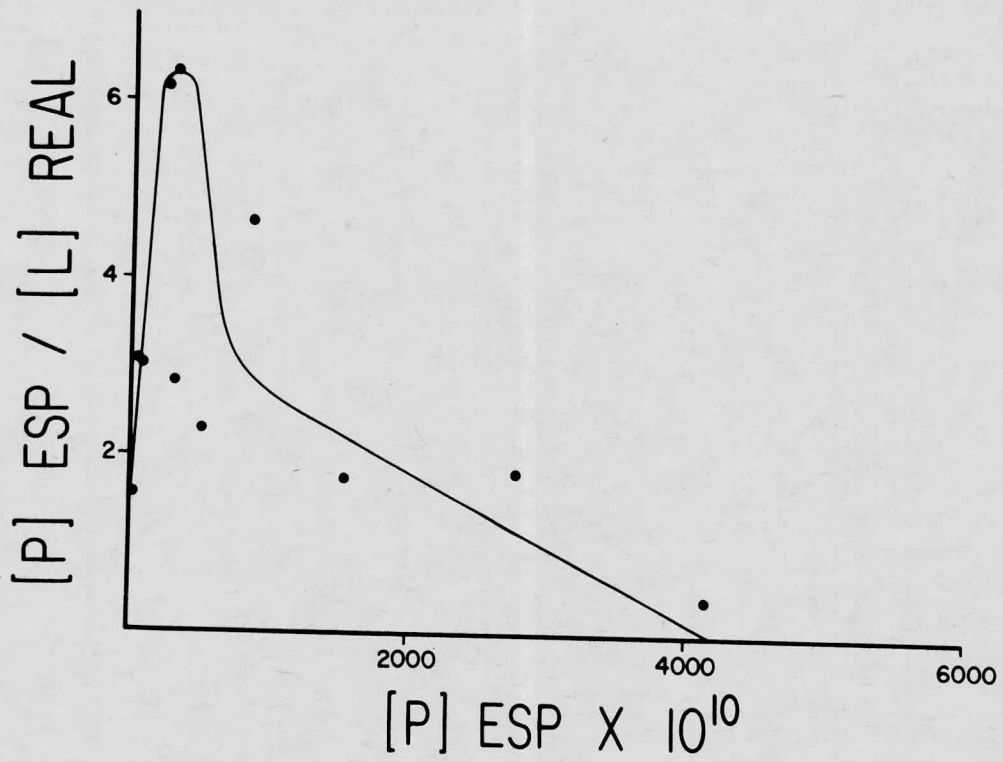


Figura 12

TABLA 7

Experimento	Regresión lineal trazo descendente	r^2	Regresión lineal trazo ascendente	r^2
1	$y=5.5674 - .0010x$.9774	$y=3.1634 + .0024x$.7781
2	$y=5.2725 - .0007x$.8192	$y=3.0809 + .0037x$.6826
3	$y=5.9517 - .0012x$.8622	$y=2.1035 + .0072x$.7020
4	$y=3.0568 - .0008x$.7445	$y=1.9531 + .0058x$.4951
5	$y=1.5261 - .0002x$.2360	$y=0.6814 + .0084x$.6806
6	$y=4.8451 - .0011x$.5509	$y=0.9698 + .0185x$.9304

TABLA 8

Experimento #	A_0	K_1	K_2' (Pmax)	K_2'/K_1	K_2'' (P/Lmax)	K_2''/K_1
1	$2,727,5 \times 10^{-10}$	1.16×10^7	8.33×10^6	.72	2.66×10^7	2.29
2	$3,768.0 \times 10^{-10}$	6.14×10^6	3.33×10^6	.54	2.94×10^7	4.80
3	$2,584.5 \times 10^{-10}$	8.14×10^6	5.29×10^6	.65	5.12×10^7	6.29
4	$1,989.5 \times 10^{-10}$	9.82×10^6	6.06×10^6	.62	3.47×10^7	3.53
5	$3,154.0 \times 10^{-10}$	2.16×10^6	1.17×10^6	.54	3.65×10^7	16.91
6	$2,131.0 \times 10^{-10}$	4.55×10^6	2.71×10^6	.60	1.94×10^8	42.64

El valor de K_2/K_1 cuando no hay interacciones es .25

DISCUSION

Los resultados de este trabajo muestran en resumen lo siguiente:

1. En el sistema DNP-lis-AcDNP en concentraciones de 10^{-9} M a 10^{-6} M de DNP-lis y AcDNP en concentración 1.07×10^{-6} M la curva de Scatchard presentó siempre un brazo ascendente en los valores más bajos de concentración de DNP-lis.
2. La presencia del brazo ascendente en el modelo bivalente solo es compatible con la existencia de cooperatividad en la reacción hapteno-anticuerpo y el máximo en la curva de Scatchard solo aparece en caso de que K_2/K_1 sea mayor a 0.5, lo que es el caso en todos los experimentos calculando K_2 por cualquiera de los dos métodos propuestos.
3. Hay una variación notable en los valores que se obtienen de experimento a experimento, para la cual no hay una explicación definitiva pero que puede deberse entre otras a las siguientes causas:
 - a) Ligeras variaciones en temperatura durante el curso del experimento.
 - b) Diferentes grados de absorción de ambas soluciones por la cinta adhesiva que se coloca para cerrar los agujeros donde se inyecta la solución.
 - c) Errores técnicos en la manipulación de los aparatos para diálisis en equilibrio.
 - d) Pequeñas diferencias en la dilución 1:4 de la solución de anticuerpo que se preparó de nuevo para cada diálisis en equilibrio.

Se demostró experimentalmente que no fueron factores que influyeran de manera muy importante: la variabilidad de la jeringa al medir 100 ul o 50 ul, diferencias entre soluciones de anticuerpos porque fueran de diferente animal o diferente sangrado ya que siempre fue la misma solución (mezcla de los 4 sangrados), las soluciones de $^3\text{H-DNP-lis}$ que siempre fueron las mismas, las membranas que con el tratamiento descrito anteriormente permitían la libre difusión de $^3\text{H-DNP-lis}$ y no permitían el paso de moléculas de albúmina sérica humana tritiada (PM 69000) o moléculas mayores.

A pesar de esta variación creo que es válido concluir del trabajo presentado que la proposición de cooperación en la reacción hapteno anticuerpo en el sistema DNP-anti-DNP es la que mejor explica la aparición constante del brazo ascendente y el máximo en las gráficas de Scatchard.

Hasta ahora los estudios que se han hecho para investigar si existe cooperación en la reacción hapteno-anticuerpo y que más se citan, reportan que no existe el efecto o que si existe debe ser pequeño.

Si la reacción con hapteno indujera un efecto cooperativo esto se podría manifestar de dos maneras, una de ellas es que hubiera una alteración de la capacidad de unir a un segundo ligando, una vez que el primero hubiera interaccionado (que fue la que detectamos experimentalmente), y la otra sería un cambio conformacional al interaccionar

el ligando con el anticuerpo, aunque un cambio conformacional no implique siempre que haya cooperación.

El trabajo de Nissonoff et al (24) reporta la medición de unión de hapteno con anticuerpo anti-p-benzoato específicamente purificado (IgG) y con los fragmentos Fab. La constante de afinidad promedio K_o coincidió dentro del error experimental para las dos preparaciones, esto quiere decir que las curvas de unión eran prácticamente superponibles. Según los autores esto indica que la combinación del hapteno con un sitio activo no tiene influencia sobre la afinidad del otro sitio. Velick et al (25) midieron la unión de hapteno con anticuerpo anti-DNP purificado específicamente y con sus fragmentos Fab. Reportan las constantes de afinidad K_o y sugieren que las propiedades de extinción de fluorescencia de sitios activos individuales del anticuerpo de moléculas de anticuerpo completas son aditivas, demostrando que las propiedades de unión de un sitio no eran afectadas por el otro. Ashman y Metzger (26) probaron la unión de grupos derivados nitrofenilo con la proteína de una macroglobulinemia de Waldenström humana (γ MWag). Obtuvieron unión homogénea para la proteína intacta (IgM), subunidades 7S, subunidades 5S (Fab')₂, o subunidades Fab. Los valores de las curvas de fijación eran muy similares y aparte de dar los mismos valores de K_o -- para el anticuerpo intacto y los fragmentos probados, se obtuvo prácticamente una recta por ser esta proteína de mieloma completamente homogénea. También estos autores creen poco probable que exista cooperación entre un sitio y otro. Warner y Schumaker (27) utilizando la técnica de sedimentación diferencial detectaron un cambio conformacional en los

sistemas de hapteno divalente $\alpha, \xi, 2-4$ DNP lisina y $\alpha, \xi, 2, 4$ DNP cistina contra Ac. anti DNP. Este efecto se expresa como un aumento en su coeficiente de sedimentación que corresponde a un cambio del 1 % en el coeficiente de fricción de la molécula, mientras que no detectaron ningún cambio en los sistemas de hapteno monovalente $2, 4$ DNP glicina y $\xi, 2, 4$ DNP lisina contra anticuerpos anti-DNP. La sensibilidad de su método es de una diferencia de 0.016S o más.

Los trabajos experimentales discutidos muestran la idea actual respecto a la cooperatividad entre los dos sitios activos de una molécula de anticuerpo y la idea es que, para fines prácticos, no existe. Se puede hacer quizá una excepción en el último trabajo de Warner y Schumaker en el que quizá la sensibilidad de su método no alcanzó a detectar un cambio conformacional en una molécula de anticuerpo que se une con haptenos monovalentes.

Creo que estos autores no pudieron detectar cooperación en la reacción hapteno-anticuerpo principalmente por dos razones:

- 1) Es costumbre en este tipo de artículos quitar los puntos de los extremos (exceso de anticuerpo y exceso de antígeno) y solo reportar los puntos intermedios que como se puede apreciar en la mayor parte de los experimentos presentados en la tesis tienen una tendencia clara a descender.
- 2) Las concentraciones mínimas de hapteno con las que trabajaron estos autores son del orden de 10^6 M y llegan a

un máximo de aproximadamente 10^{-3} M y una concentración de anticuerpo que varía entre 10^{-7} M y 10^{-5} M según el autor. Pienso que esas concentraciones de hapteno son muy altas para poder detectar el brazo ascendente en la curva de Scatchard, ya que a esas concentraciones (máximas en los experimentos de esta tesis) la curva desciende también en los experimentos que aquí se reportan.

Finalmente quiero discutir que importancia pueden tener estos resultados en el conocimiento de la reacción hapteno-anticuerpo o antígeno-anticuerpo y en la función del anticuerpo como molécula del aparato inmune de un organismo. Creo que pueden existir por lo menos tres tipos diferentes de cooperación, entre los cuales el sistema que he utilizado no puede distinguir, que son: cooperación intermolecular, cooperación intramolecular o ambas combinadas.

Por cooperación intermolecular entiendo el hecho de que al haber reaccionado una molécula de anticuerpo con un antígeno esto haga más probable que reaccione otra molécula de anticuerpo con el mismo o con otro antígeno. Y por cooperación intramolecular el hecho de que al unirse el hapteno o determinante antigénico al primer sitio activo de la molécula de anticuerpo, influya sobre la capacidad del segundo sitio activo para unir y fijar a otra molécula de hapteno u otro determinante antigénico. De ambas posibilidades me parece más factible la segunda porque se podría decir especulativamente que los puentes disulfuro que

unen a ambas cadenas pesadas en la molécula de anticuerpo podrían servir como transmisores de información de un brazo a otro y por lo tanto de un sitio activo a otro. La primera posibilidad que parece más difícil de explicar a nivel molecular pero, como mencioné antes, no se puede descartar.

Otro punto interesante es que la existencia de interacción negativa produce unos trazos teóricos de curvatura cóncava (ver Fig. 2). Este tipo de curvatura es bastante común en gráficas de Scatchard experimentales (ver Fig. 10 y 12) y hasta ahora se le había atribuido exclusivamente a la presencia inicial de varias poblaciones de anticuerpos con diferentes constantes de afinidad intrínsecas por el ligando, a lo que se le denominó "heterogeneidad" (28,29,30,31). El hecho de que teóricamente se produzcan estas curvas hace pensar en dos posibilidades más para explicar esta curvatura concava que son que a altas concentraciones de ligando hay interacciones negativas en la reacción hapteno-anticuerpo o que la heterogeneidad en vez de ser inicial puede irse generando durante la reacción hapteno-anticuerpo.

El hecho de que exista cooperatividad hace a la molécula de anticuerpo una molécula más funcional para el aparato inmune desde el punto de vista teleológico. Al aumentar la afinidad de la molécula se necesitan menos moléculas de anticuerpo para llevar a cabo la misma función que si esto no fuera el caso. O sea la cooperación amplifica una función, y la hace más eficiente. El aumento en afinidad hace --

más difícil la disociación del complejo antígeno-anticuerpo lo que puede ser una característica que mejore la función del anticuerpo como -- "opsonina" ya que una vez unido a un microorganismo invasor es mucho -- más probable que una célula fagocítica lo encuentre unido al antígeno -- y esta lleve a cabo mejor su función.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Esta tesis propone por primera vez un modelo teórico formal para estudiar un efecto cooperativo en la reacción de una molécula bivalente (anticuerpo) con una molécula monovalente (hapteno), por el análisis del trazo de Scatchard.

Este modelo puede ser utilizado en general para estudiar la existencia de este efecto en cualquier sistema que llene los siguientes requisitos:

- 1) que un reactivo sea bivalente
- 2) que el otro reactivo sea monovalente.

En el sistema analizado por este modelo, (DNP-lis-AcDNP) se encontró que los datos experimentales son compatibles con la existencia de cooperatividad con la reacción antígeno-anticuerpo. Siendo esta la primera vez que se reporta cooperatividad en la reacción antígeno-anticuerpo, este trabajo contribuye al mejor conocimiento de una de las reacciones fundamentales en la Inmunología.

APENDICE I

APENDICE I

Afinidad

Afinidad se refiere a la fuerza de interacción entre un hapteno y un sitio activo de un anticuerpo dirigido contra él. La afinidad es una medida termodinámica de la fuerza de interacción hapteno-anticuerpo y se puede expresar como la constante de equilibrio K_o (litros/mol) o como el cambio en la energía libre ΔF° (kcal/mol) porque K_o y ΔF° se relacionan por la fórmula (32):

$$\Delta F^\circ = -RT \ln K_o \quad (1)$$

La interacción hapteno-anticuerpo es de tipo no covalente, por lo tanto la afinidad también se puede interpretar como la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas de tipo no covalente que tienen las moléculas situadas a distancias muy pequeñas una de otra, como son: --- puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o apolares, interacciones iónicas o coulombicas, fuerzas de van der Waals y factores estéricos o fuerzas estéricas repulsivas. Esto implica que un anticuerpo de alta afinidad es el que forma un enlace fuerte con el hapteno formando un complejo hapteno-anticuerpo estable con una tendencia baja a disociarse. Un anticuerpo de baja afinidad forma un complejo con el hapteno menos estable que requiere menos energía para disociarse. Por lo tanto entre más alta sea la afinidad del anticuerpo mayor será la cantidad de hapteno unido al anticuerpo en el equilibrio.

APENDICE II

APENDICE II

Deducción de la Ecuación de Scatchard

La interacción entre un solo sitio activo del anticuerpo - (S) y un hapteno monovalente (H) con constantes de asociación y disociación k_1 y $k-1$ respectivamente se puede representar en el equilibrio como:



la Ley de Acción de Masas dice que la velocidad de formación del complejo es proporcional a la concentración de los reactivos. Por lo tanto la velocidad de asociación es igual a $k_1|H| |S|$ y la velocidad de disociación es igual a $k-1 |HS|$. En el equilibrio las velocidades de asociación y disociación son iguales por lo tanto:

$$k_1|H| |S| = k-1 |HS| \quad (S2)$$

y

$$K_o = \frac{|HS|}{|H| |S|} = \frac{k_1}{k-1} \quad (S3)$$

donde K_o es la constante de afinidad en el equilibrio. Si se denomina a la concentración total de sitios activos como $|S_o|$, $|S|$ se puede sustituir por $(|S_o| - |HS|)$ en la ecuación (S3)

$$K_o = \frac{|HS|}{|H| (|So| - |HS|)} \quad (S4)$$

rearrreglando

$$\frac{|HS|}{|H|} = K_o |So| - K_o |HS| \quad (S5)$$

La ecuación (S5) es una de las formas más comunes de tratar los datos obtenidos de interacciones antígeno-anticuerpo porque a partir de ella se pueden obtener los parámetros que describen a la reacción.

Esta ecuación se debe en su forma original a Scatchard (9) y tiene las siguientes propiedades:

- 1) Es la ecuación de una recta (lineariza los datos) y una gráfica de PEGADO/LIBRE ($|HS| / |H|$) contra PEGADO ($|HS|$) debe dar una línea recta de pendiente $- K_o$.
- 2) Cuando la concentración del ligando libre ($|H|$) es muy pequeña, $|HS| / |H|$ tiende a $K_o|So|$, o sea al producto de la concentración de todos los sitios activos por su constante de afinidad y cuando $|H|$ es muy grande $|HS| / |H|$ tiende a $|So|$ o sea a la concentración de todos los sitios activos. (Ver Fig. S1).

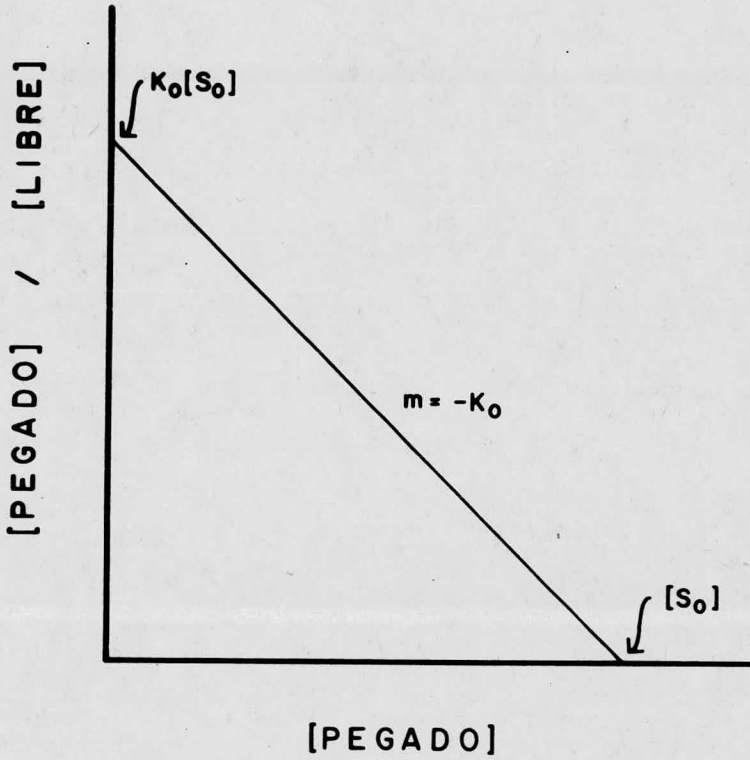


Figura S1. Gráfica teórica de Scatchard para una población homogénea de sitios activos que no interaccionan entre si.

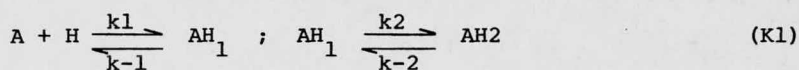
APENDICE III

APENDICE III

Interacción de una Molécula Bivalente con dos ligandos

Klotz (33) da el siguiente tratamiento al caso en que una molécula se una a dos ligandos:

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



Las constantes de equilibrio medidas experimentalmente K_1 y K_2 están definidas por las ecuaciones:

$$K_1 = \frac{|AH_1|}{|A| |H|} = \frac{k_1}{k-1} \quad (K2)$$

$$K_2 = \frac{|AH_2|}{|AH_1| |H|} = \frac{k_2}{k-2} \quad (K3)$$

se deduce de estas ecuaciones que

$$|AH_1| = K_1 |A| |H| \quad (K4)$$

$$|AH_2| = K_2 |AH_1| |H| = K_1 K_2 |A| |H|^2 \quad (K5)$$

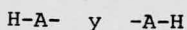
No Interacción entre Sitios

En ciertas situaciones K_1 y K_2 pueden estar relacionadas -

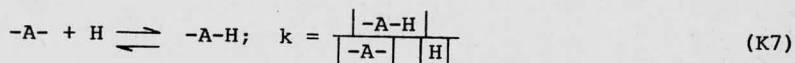
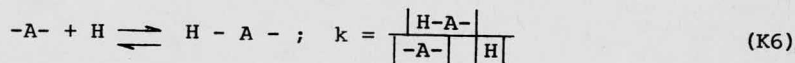
en forma sencilla. Si los dos sitios activos en A son idénticos en su afinidad intrínseca por H pero son distinguibles el uno del otro, se pueden designar para los propósitos de esta discusión colocando uno a la derecha y otro a la izquierda de A:

- A -

El primer complejo AH está compuesto por la suma de dos especies que son:



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



como los dos sitios son idénticos en su afinidad intrínseca por H las constantes de equilibrio intrínsecas, k, son la misma en las ecuaciones (K6) y (K7).

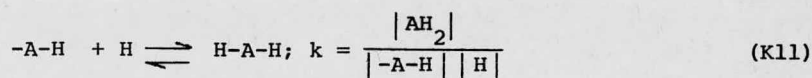
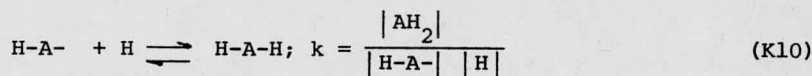
Esta constante intrínseca k se puede relacionar entonces con la constante experimental K_1 tomando en cuenta que:

$$|\text{H-A-}| + |\text{-A-H}| = |\text{AH}_1| \quad (\text{K8})$$

de la ecuación (K8) se deduce que

$$K_1 = \frac{|AH_1|}{|H||A|} = \frac{|H-A-| + |-A-H|}{|H||A|} = \frac{|H-A-|}{|H||A|} + \frac{|-A-H|}{|H||A|} = k + k = 2k \quad (K9)$$

Se puede utilizar un proceso parecido para relacionar K_2 con k . La formación de AH_2 puede ocurrir de las siguientes maneras:



Se puede concluir de manera similar que la k en la ecuación (K10) es idéntica a la de la ecuación (K11) ya que los dos sitios son idénticos en su afinidad por H.

Por razones similares se puede concluir que

$$|-A-H| = |H-A-| \quad (K12)$$

las concentraciones de estas especies diferentes son iguales. (Esto se deduce claramente si se observa que en las ecuaciones (K10) y (K11) $|AH_2|$, $|H|$ y k son idénticas).

Regresando a la ecuación (K3) tenemos que:

$$K_2 = \frac{|AH_2|}{|AH_1||H|} = \frac{|AH_2|}{(|H-A-| + |-A-H|)|H|} = \frac{|AH_2|}{2|H-A-||H|} = \frac{k}{2} \quad (K13)$$

De las ecuaciones (k9) y (K13) se deduce que si los dos -- sitios en A son idénticos en su afinidad intrínseca por H y no existe interacción entre ellos las constantes determinadas experimentalmente K_1 y K_2 se relacionan por la expresión:

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{2k}{k/2} = 4 \quad (\text{K14})$$

o su equivalente

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{k/2}{2k} = 0.25 \quad (\text{K15})$$

Interacción entre dos Sitios

De las ecuaciones anteriores se deduce que hay interacción entre los dos sitios activos de la molécula A cuando:

$$\frac{K_2}{K_1} > 0.25 \quad (\text{K16})$$

Las relaciones (K14) y (K15) también se pueden justificar por un razonamiento estadístico. La probabilidad de que una molécula H se combine con una A, es el doble de que se combine con una AH_1 ya que A posee dos sitios libres mientras que AH_1 posee únicamente uno libre. Este factor determina que K_1 sea dos veces mayor que K_2 . Además se puede ver que la probabilidad de disociación de AH_2 es el doble que la de

AH_1 . Este factor determina que K_2 tenga un valor de la mitad de K_1 . La combinación de ambos factores probabilísticos determinan que K_1 -- tenga un valor cuatro veces mayor al de K_2 .

N Sitios de Asociación

En el tratamiento para n sitios de asociación para la molécula A se puede llegar a la fórmula general para calcular la constante de equilibrio K_i que es

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} k \quad (K17)$$

donde "n" es el número de sitios de asociación de la molécula A, "i" es el número de sitios ocupados en la "i-esima" reacción y "k" es la constante de afinidad intrínseca.

APENDICE IV

APENDICE IV

Diálisis en Equilibrio

En el trabajo experimental que estudia la reacción antígeno-anticuerpo es preferible trabajar con reactivos puros (hapteno y anticuerpo) y necesario poder distinguir de alguna manera entre el hapteno libre y el pegado a la molécula del anticuerpo. Los dos métodos más utilizados han sido: Diálisis en equilibrio y extinción de fluorescencia, (24,25,35-42). En el trabajo de esta tesis se utilizó el método de diálisis porque es el estandar y detecta concentraciones mucho más pequeñas. La diálisis en equilibrio fue introducida como método en inmunoquímica en 1932 por Marrack y Smith (34) y mejorada en 1949 por Eisen y Karush (11) para obtener datos termodinámicos aceptables de la reacción antígeno-anticuerpo. El principio en el cual se basa esta técnica es: si se tiene una solución de un hapteno en un amortiguador en una cámara separada por una membrana semipermeable de diálisis de otra cámara con la solución amortiguadora exclusivamente, el hapteno difundirá a través de la membrana hasta que su concentración en ambas cámaras sea igual. Si en una de las cámaras hay anticuerpo parte del hapteno se unirá al anticuerpo y no podrá participar en el equilibrio de la difusión. Cuando se llega al equilibrio la concentración de hapteno libre en ambas cámaras será igual pero la concentración total en la cámara en la que hay anticuerpo será mayor y la diferencia de las concentraciones de hapteno entre las dos cámaras será la concentración de hapteno pegada al anticuerpo. El --

efecto de Donnan es despreciable en soluciones isotónicas que se utilizan normalmente en el manejo de anticuerpos. La concentración molar del hapteno libre está representada por $|L|$ en las ecuaciones (7) o (13) y $|P|$ la concentración de hapteno pegado. Si se determinan $|L|$ y $|P|$ variando la concentración de $|L|$ se pueden graficar los datos en ejes $|P|/|L|$ contra $|P|$ para obtener los parámetros K_1, K_2 y $|A_0|$.

En la práctica es necesario trabajar con concentraciones muy bajas de hapteno porque la concentración molar de anticuerpo es baja, por ejemplo una concentración de anticuerpo de 0.5 mg/ml corresponde aproximadamente a 3.3×10^{-6} M. Si la concentración de hapteno excede por mucho este valor, la concentración de hapteno pegado será necesariamente baja en relación a la concentración total de hapteno y la diferencia de concentraciones en un compartimiento y otro será muy difícil de medir con exactitud.

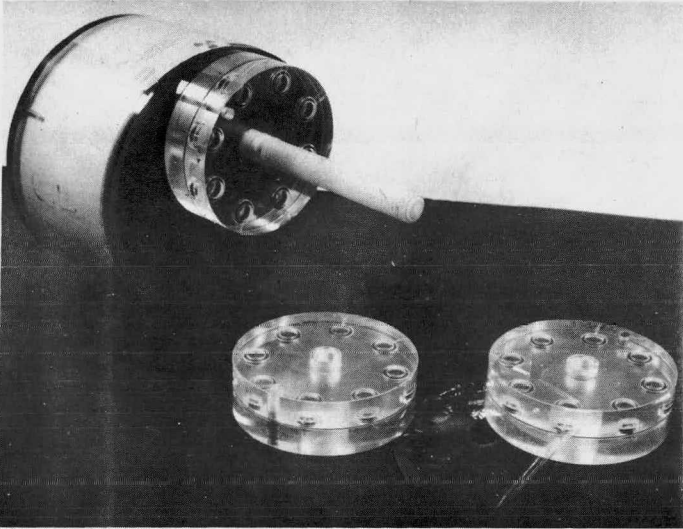
Por lo tanto la concentración de hapteno debe ser del mismo orden de magnitud o menor que la del anticuerpo. Por esta razón se utilizan haptenos radioactivos o haptenos que absorban o fluorescan fuertemente.

Otro factor que se debe tomar en cuenta es la afinidad del anticuerpo, cuando se tienen anticuerpos de alta afinidad se necesita una concentración baja de anticuerpo y viceversa, esto se ve claramente de la relación: (Ver apéndice II ecuación (S3)).

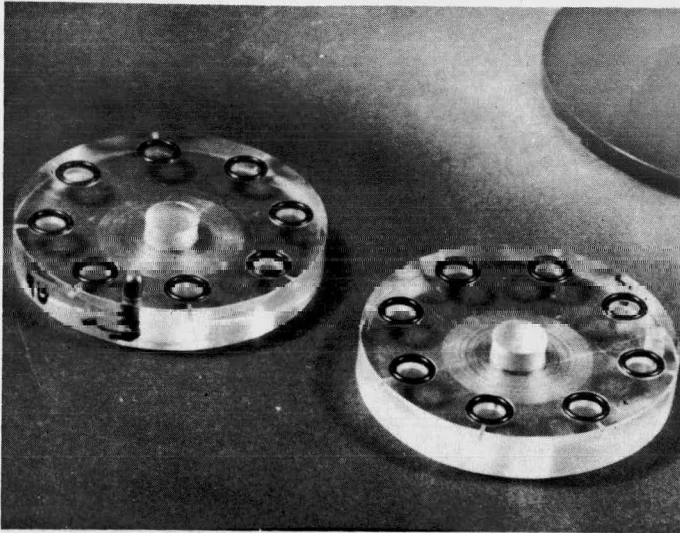
$$K_o = \frac{|HS|}{|S| |H|} \quad \text{ó} \quad K_o |S| = \frac{|HS|}{|H|}$$

Para mediciones adecuadas, se recomienda que la concentración de anticuerpo sea aproximadamente igual o sobrepase al recíproco de su constante de afinidad. Por ejemplo si $K_o = 10^7$ la concentración de anticuerpo debería ser cuando menos del orden de 10^{-7} y esto a su vez hace necesario que las concentraciones de hapteno sean bajas por las consideraciones hechas anteriormente.

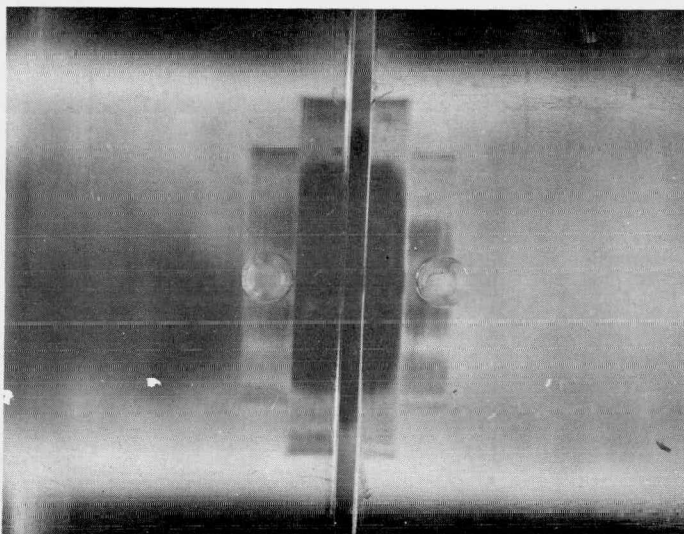
Figura 1D



a



b



c

Figura 1D. La figura 1D muestra un aparato multializador utilizado en los experimentos (1,2 y 3). En la figura 1Da se ve el motor que tiene acoplados una barra de plástico -- con una rosca en la parte más cercana a un círculo negro -- que giran con el motor, también muestra los módulos de lucita armados y uno de ellos montado en la barra. La membrana de papel de diálisis cortada a la medida va entre las dos mitades de los módulos, (Fig. 1Db) que son complementarias. Una de las mitades tiene un perno de acero inoxidable que ajusta en un agujero pequeño en el otro módulo y se evita la salida del líquido por los empaques negros -- que cierran herméticamente las cámaras con la membrana de diálisis entre dos de ellas. Se montan los módulos que se vayan a ocupar y se aprietan con la "tuerca" de plástico -- negra que aparece en la figura 1Da. En un acercamiento de una de las cámaras (Fig. 1Dc) se ven los agujeros por los cuales se inyectan las soluciones de hapteno y anticuerpo a sus cámaras respectivas estos agujeros se tapan con cinta adhesiva una vez que la solución está en la cámara. El aparato gira los módulos y cada solución se agita con una pequeña burbuja que queda en cada cámara.

GLOSARIO Y NOTACION

Glosario y Notación

Las palabras hapteno y ligando se utilizan como sinónimos en esta tesis.

$ A_0 $	= concentración inicial de anticuerpo
$ AH_1 $	= concentración de anticuerpo con un sitio activo ocupado
$ AH_2 $	= concentración de anticuerpo con los dos sitios activos ocupados
A	= molécula de anticuerpo
α	= valor de pegado inespecífico
ΔF^0	= aumento en energía libre estandar
$ H $	= concentración de hapteno libre, puede ser a veces = $ LIBRE $
H	= molécula de hapteno
$ HS $	= concentración de hapteno pegado a un sitio activo puede ser a veces = $ PEGADO $
k	= constante de afinidad intrínseca
k_1 y $k-1$	= constantes de velocidad de asociación y disociación respectivamente
K_0	= constante de afinidad experimental promedio
K_1	= constante de afinidad experimental del 1er. sitio activo
K_2	= constante de afinidad experimental del 2o. sitio activo
$ L $	= concentración de ligando libre
m	= pendiente de una recta
$ P $	= concentración de ligando pegado

- R = constante de los gases
- $|S_0|$ = concentración de sitios activos inicial
- $|S|$ = concentración de sitios activos
- T = temperatura en grados Kelvin ó absolutos

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Perutz, M.F. (1968). The Haemoglobin Molecule. Proc. R. Soc. B. 173; 113-140.
2. Perutz, M.F. (1970). Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin. Nature Lond. 228; 726-736.
3. Perutz, M.F. (1972). Nature of Haem-Haem Interaction. Nature Lond. 237; 495-499.
4. Pauling, L. (1935). The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and its Structural Interpretation. Proc. Nat. Acad. Sci., 21; 186-191.
5. Roughton, F.J.W. (1963). The Accurate Gasometric Determination of the Oxygen Hemoglobin Equilibrium in Dilute Solutions of Sheep Hemoglobin. Clin. Chem., 9; 682-709.
6. Augener, W., Gray, H.M., Cooper, N.R. and Müller-Eberhard, H.J. (1971). The Reaction of Monomeric and Aggregated Immunoglobulins with Cl. Immunochemistry, 8; 1011-1020.
7. Henney, C.S. and Ishizaka, K., (1968). Antigenic Determinants Specific for Aggregated γ G-globulins. J. Immunol. 100; 718-725.
8. Ovary, Z. and Taranta, A. (1963). Passive Cutaneous Anaphylaxis with Antibody Fragments. Science, 140; 193-195.
9. Scatchard, G. (1949). The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51; 660-672.
10. Bauer, D.C., Mathies, M.J. and Stavitsky, A.B. (1963). Sequences of Synthesis of r-1 Macroglobulin and r-2Globulin Antibodies During Primary and Secondary Responses to Proteins Salmonella Antigens, and Phage. J. Exp. Med. 117; 889.

11. 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.
12. Karush, F. (1957). The Interaction of Purified Anti- β -lactoside Antibody with Haptens. *J. Am. Chem. Soc.*, 79; 3380.
13. Eisen, H.N., and Siskind, G. (1964). Variations in Affinities of Antibodies during the Immune Response. *Biochemistry* 3; 996.
14. Pappenheimer, A.M., Reed, W.P. and Brown, R. (1968). Quantitative Studies of the Specificity of Anti-pneumococcal Polysaccharide Antibodies. Types III, VIII. III. Binding of a Labeled Oligosaccharide Derived from S8 by anti-S8 Antibodies. *J. Immunol.* 100; 1237.
15. Spiegelberg, H.L. (1974). Biological Activities of Immunoglobulins of Different Classes and Subclasses. *Adv. Immunol.* 19; 259-294.
16. Eisen, H.N. and Belman, S. (1953). Studies of Hypersensitivity to Low Molecular Weight Substances II. Reactions of Some Allergenic Substituted Dinitrobenzenes with Cysteine or Cystine of Skin Proteins. *J. Exp. Med.* 98: 533-549.
17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1950). Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193; 165.
18. Eisen, H.N. (1964). Equilibrium Dialysis for Measurement of Antibody Hapten Affinities. *Meth. Med. Res.*, 10; 106.
19. Eisen, H.N. (1964). Determination of Antibody Affinity for Haptens and Antigens by Means of Fluorescence Quenching. *Meth. Med. Res.*, 10; 115.

20. Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Susdorf, D.H. (1970). *Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction and Research* 2a. Ed. W.A. Benjamin New York pp 28 - 30 y 189 - 191.
21. March, S.C., Parikh, I. and Cuatrecasas, P. (1974). A Simplified Method for Cyanogen Bromide Activation of Agarose for Affinity Chromatography. *Analytical Biochemistry* 60; 149 - 152.
22. Porqth, J. and Kristiansen, T. (1975). Biospecific Affinity Chromatography and Related Methods; cap. 2 in *The Proteins* 3a. Ed. Vol. I Academic Press New York pp 95-178; Neurath H. y Hill, R.L. (Eds).
23. Clausen, J. (1971). Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules in: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*; North Holland Publ. Co. Amsterdam pp 447 y 519; Work T.S. y Work E. (Eds).
24. Nissonoff, A., Wissler, F.C. and Woernley, D.L. (1960). Properties of Univalent Fragments of Rabbit Antibody Isolated by Specific Adsorption. *Arch. Biochem. Biophys.* 88; 241-249.
25. Velick, S.F., Parker, C.W. and Eisen, H.N. (1960). Excitation Energy Transfer and the Quantitative Study of the Antibody Hapten Reaction. *Proc. Natl Acad. Sci.* 46; 1470-1482.
26. Ashman, R. and Metzger, H. (1969). A Waldenström Macroglobulin which Binds Nitrophenyl Ligands. *J. Biol. Chem.*, 244; 3405-3414.
27. Warner, C. and Schumaker, V. (1970). Detection of a Conformational Change in an Antihapten Antibody System upon Interaction with Divalent Hapten. *Biochemistry* 9; 451-458.

28. Nissonoff, A. and Pressmann, D. (1958). Heterogeneity and Average Combining Constants of Antibodies from Individual Rabbits. *J. Immunol.* 80; 417-428.
29. Pauling, L., Pressmann, D. and Grossberg (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. Amer. Chem. Soc.* 66; 784.
30. Karush, F. (1962). Immunologic Specificity and Molecular Structure. *Advan. Immunol.* 2; 1-40.
31. Karush, F. (1970). Affinity and the Immune Response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 169; 56-71.
32. vanHolde, K.E. (1971). Physical Biochemistry: Foundations of Modern Biochemistry Series 1a. Ed. Prentice Hall, N.J. pp 57.
33. Klotz, I.M. (1953). Protein Interaction, Cap. 8 en *The Proteins* Vol. I, Parte B Academic Press New York pp 727-806, Neurath. H. y Bailey, K. (Eds).
34. Marrack, J. and Smith, F.C. (1932). Quantitative Aspects of Immunity Reactions: The Combination of Antibodies with Simple Haptenes. *Brit. J. Exp. Pathol.* 13; 394-402.
35. Williams, C.A. and Chase, M.W. (eds) (1967-71). *Methods in Immunology and Immunochemistry* Vol. I - IV Academic Press, New York.
36. Weir, D.M. (ed) (1973). *Hand book of Experimental Immunology* 2a. Ed, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

37. Steward, M.W. (1974). *Immunochemistry; Outline Studies in Biology Series 1a.* ed. Chapman and Hall, London.
38. Eisen, H.N. (1974). *Immunology: An Introduction to Molecular and Cellular Principles of the Immune Response*, Harper and Row, Maryland.
39. Nisssonof, A., Hopper, J.E. and Spring, S.B. (1975). *The Antibody Molecule*, Academic Press, New York.
40. Day, E.D. (1972). *Advanced Immunochemistry*. Williams and Wilkins, Baltimore.
41. Hobart, M.J. and McConnell, T. (eds) (1975). *The Immune System: A Course on the Molecular and Cellular Basis of Immunity* Blackwell Scientific Publications. Oxford.
42. Abramoff, P. and LaVia, M. (eds) (1970). *Biology of the Immune Response*, McGraw Hill, New York.



IMPRESO en los TALLERES de EDITORIAL QUETZALCOATL, S.A.
Medicina # 37 local 1 y 2, entrada por Paseo de las Facultades, frente
a la Facultad de Medicina de Ciudad Universitaria, México 20, D. F.
Tels: 548-61-80 y 548-58-56