

1
201

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ANÁLISIS TEÓRICO Y EXPERIMENTAL DE
LA CONSTANTE DE AFINIDAD EVALUADA
POR EL MÉTODO DE ELISA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

ALFONSO ARROYO SANTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA, MAYO 1998.

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 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.

**Esta tesis de licenciatura fue desarrollada en el Departamento de
Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad
Nacional Autónoma de México.**

Director de Tesis:

Dr. Carlos Larralde Rangel.

Resumen

Se desarrolló un método de análisis de datos a partir de curvas de inhibición obtenidas por ELISA, que permite obtener información sobre el valor de la afinidad (k) y el grado de heterogeneidad de un suero determinado. Los datos son obtenidos directamente de la gráfica donde el punto de inflexión de la curva está relacionado con el valor de K y la pendiente con el grado de heterogeneidad. Para ello, se desarrolló un programa de computación en lenguaje C++ donde se simuló la interacción antígeno - anticuerpo. Posteriormente, los datos fueron analizados por curvas de inhibición con el fin de estudiar su comportamiento bajo la influencia de interacciones entre los sitios de unión (cooperatividad, interacción negativa o no interacción) y heterogeneidad. Los resultados teóricos contribuyen a formas lineamientos para la interpretación de los datos experimentales.

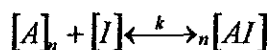
ÍNDICE

- Resumen
- Introducción
- Objetivos
- Modelo teórico
- Simulación Computacional
- Diseño Experimental
- Método Experimental
- Resultados
 - Resultados Teóricos
 - Población Homogénea
 - Heterogeneidad
 - Resultados Experimentales
 - Anticuerpos Monoclonales
 - Sueros
- Discusión
- Apéndice
- Bibliografía

Introducción:

A lo largo de millones de años de evolución, los seres vivos han desarrollado sistemas cada vez más complejos con los cuales defenderse de las agresiones de un medio ambiente hostil y altamente competitivo. Este desarrollo ha alcanzado su punto más alto entre los mamíferos creándose toda una red de células y proteínas cuya función es la de reconocer y eliminar a cualquier posible invasor sea un virus o un organismo más complejo. Entre los miembros de esta red, las proteínas llamadas inmunoglobulinas (Ig) juegan un papel esencial. Las Ig están compuestas por regiones constantes y variables siendo la gran diversidad de estas últimas, lo que le permite responder a cada desafío inmunológico. El reconocimiento es en esencia la unión no covalente entre una secuencia proteica particular del invasor (que llamaremos antígeno), con el sitio de unión de la inmunoglobulina resultando lo que llamaremos complejo antígeno-anticuerpo ([AI]). Existen cinco tipos de inmunoglobulinas (G, A, M, D y E), con un número de sitios de unión que va desde 2 para las Ig's G, D y E, hasta 10 en el caso de la IgM; la IgA puede presentar 2, 4 ó 6 sitios de unión dependiendo del lugar donde actúe. Esta unión no solo tiene una especificidad sino también una "fuerza" que apoyándonos en la Ley de Acción de Masas²⁵, definiremos de la siguiente manera:

Sea [A] la concentración de una macromolécula (Ig) con n sitios de unión, e [I] la concentración de su ligando, en el equilibrio forman:



donde $k = \frac{ka}{kd}$, es decir el cociente entre la constante de asociación (ka) y la constante de disociación (kd).

Esta reacción se caracteriza por la constante de afinidad (K):

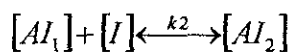
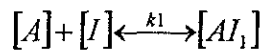
$$K = \frac{[AI]}{[A][I]}$$

que termodinámicamente se define como el cambio negativo de energía libre de la reacción según la siguiente ecuación:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k$$

donde R es la constante del estado gaseoso (8.314 J/mol k°) y T la temperatura absoluta en grados kelvin.

Para el caso de una IgG con dos sitios de unión se tiene:



$$K_1 = \frac{[AI_1]}{[A][I]} \quad (1)$$

$$K_2 = \frac{[AI_2]}{[AI_1][I]} \quad (2)$$

donde K_1 = constante de afinidad sitio 1, y K_2 = constante de afinidad sitio 2. La constante estequiométrica K_i , es una variable macroscópica que se refiere a los anticuerpos con i sitios ocupados sin referirse a un sitio particular; en contraste, la constante de afinidad intrínseca k involucra un parámetro microscópico que está en función del sitio de unión particular¹².

Las primeras investigaciones sobre la afinidad se hacían con técnicas experimentales que consumían mucho tiempo, requerían de anticuerpos purificados o se necesitaba marcar radioactivamente los reactivos. Con la aparición de los anticuerpos monoclonales se abrió la posibilidad de estudiar un mismo anticuerpo y se introdujo la técnica de ELISA(Enzyme Linked Immuno Assay) en su estudio. Las ventajas eran muchas y pronto se desarrollaron varios métodos^{1,2,5,9,10,14,16,24} entre los que destacaron los hechos por los grupos de Friguet⁵ y Nieto¹⁵: el primero calcula la concentración de anticuerpo libre en una fase líquida por medio del ELISA para obtener k de las ecuaciones de Klotz¹³ y Scatchard¹⁹. Por su parte, Nieto hace un ELISA en competencia, donde el anticuerpo compite por el péptido en solución y por el péptido preadsorbido a la placa. Asume que la constante de afinidad se obtiene en el 50% de la curva de inhibición del ELISA. Ambos métodos requieren de anticuerpos monoclonales

El ELISA no se usa extensamente para medir K principalmente por la suposición de monovalencia de los anticuerpos en la mayoría de los métodos^{16,23}, y por que se rompe el

equilibrio termodinámico al hacer el experimento ^{16,23}. Asimismo, la necesidad de utilizar anticuerpos monoclonales limita su uso clínico, ya que la respuesta inmune genera una gran amplia de anticuerpos de diferentes afinidades heterogéneas.

El objetivo principal del presente trabajo es desarrollar un método de análisis a partir del ELISA que permita de una manera accesible, sencilla y de bajo costo, obtener información sobre el valor de la afinidad y el grado de heterogeneidad de un suero determinado. Esto, con el fin de estudiar la afinidad dentro de un marco inmunológico natural que permita relacionar estos parámetros con procesos inmunes, información que posteriormente pueda servir como auxilio en el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad. Ayudados por curvas de inhibición generadas por un programa computacional y ensayos de ELISA experimentales, se desarrolló un método para el estudio de k que ofrece la información directamente de la curva de inhibición sin necesidad de análisis posterior. Los resultados se obtienen de la pendiente de inhibición, donde su punto de inflexión refleja el valor de la afinidad y su pendiente el grado de heterogeneidad. Como ventaja adicional, permite el uso del antisuero directamente haciendo posible el estudio de la distribución de K 's generadas por una respuesta inmune. Además, el modelaje de dos sitios activos permitió analizar la interacción entre los sitios de unión permitiendo el análisis de interacciones positivas ($k_2 > sk_1$) e interacciones negativas ($k_2 < sk_1$).

Objetivo

El objetivo principal del presente trabajo es desarrollar un método de análisis a partir del ELISA que permita de una manera accesible, sencilla y de bajo costo, obtener información sobre el valor de la afinidad y el grado de heterogeneidad de un suero determinado.

Modelo Teórico

En esta sección, se describirá el método utilizado para generar el programa computacional. El programa se desarrolló con el fin de simular la reacción antígeno anticuerpo y analizar su efecto sobre la curva de inhibición obtenida por el ELISA. Para ello, se simuló tanto el caso homogéneo (una población de anticuerpos) como el de heterogeneidad. En ambos casos, los sitios de unión presentaron interacciones positivas, negativas o no interacción. Las entradas del programa fueron las concentraciones totales de antígeno y anticuerpo, así como las constantes de afinidad (K_1 y K_2) de los anticuerpos.

Tradicionalmente, las ecuaciones utilizadas para medir la afinidad (Klotz¹³, Scatchard¹⁹, Sips²¹) dependen de las concentraciones de ligando libre. Esto complica el experimento ya que se tiene que calcular este parámetro, cosa que no resulta sencilla. Con el fin de facilitar el trabajo experimental, se buscaron sustituir los valores libres por los totales ya que esta es una variable conocida y manejable por parte del experimentador. En observaciones hechas en el laboratorio¹⁸ se determinó que a concentraciones de anticuerpo menores a $\frac{1}{K}$, los comportamientos de $[I]$ e $[I_t]$ se vuelven proporcionales por lo que pueden ser utilizados indistintamente en estas concentraciones de anticuerpo.

a) Primer caso: una población de anticuerpos

$$[A_t] = [A] + [AI_1] + [AI_2] \quad (3)$$

$$[I_t] = [I] + [AI_1] + 2[AI_2] \quad (4)$$

donde $[A_t]$ = concentración total de anticuerpo, e $[I_t]$ = concentración total de péptido.

Despejando de (1) $[AI_1]$, y de (2) $[AI_2]$, sustituyendo en (3) y en (4) respectivamente se obtiene:

$$[A] + K_1[A][I] + K_1K_2[A][I]^2 - [A_t] = 0 \quad (5)$$

$$[I] + K_1[A][I] + 2(K_1K_2[A][I]^2) - [I_t] = 0 \quad (6)$$

b) Segundo caso: dos poblaciones de anticuerpos (A y B):

partiendo de las ecuaciones (3) y (4)

$$[B_t] = [B] + [BI_1] + [BI_2] \quad (7)$$

$$[I_t] = [I] + [AI_1] + 2[AI_2] + [BI_1] + 2[BI_2] \quad (8)$$

donde $[B_t]$ = concentración total del anticuerpo B, $[B]$ = concentración de anticuerpo B libre,

$[BI_1]$ = concentración de anticuerpo B con un sitio ocupado, $[BI_2]$ = concentración de anticuerpo B con dos sitios ocupados.

Por la Ley de Acción de Masas se obtiene:

$$[A] + K1_a[A][I] + K1_a K2_a[A][I]^2 - [A_t] = 0 \quad (9)$$

$$[B] + K1_b[B][I] + K1_b K2_b[B][I]^2 - [B_t] = 0 \quad (10)$$

$$[I] + K1_a[A][I] + 2(K1_a K2_a[A][I]^2) + K1_b[B][I] + 2(K1_b K2_b[B][I]^2) - [I_t] = 0 \quad (11)$$

En el caso de un mayor número de poblaciones (A, B, C, ..., N, ...) las ecuaciones tomarían la forma:

$$[A] + K1_a[A][I] + K1_a K2_a[A][I]^2 - [A_t] = 0 \quad (11a)$$

$$[B] + K1_b[B][I] + K1_b K2_b[B][I]^2 - [B_t] = 0 \quad (11b)$$

$$[N] + K1_n [N][I] + K1_n K2_n [N][I]^2 - [N_i] = 0 \quad (11n)$$

$$[I] + K1_a [A][I] + 2(K1_a K2_a [A][I]^2) + K1_b [B][I] + 2(K1_b K2_b [B][I]^2) + \dots + K1_n [N][I] + 2(K1_n K2_n [N][I]^2) - [I_i] = 0$$

(12)

Simulación computacional:

Las ecuaciones teóricas están basadas en la Ley de Acción de Masas y siguen los supuestos siguientes:

- Sólo se miden los sitios activos libres del anticuerpo.
- No se rompe el equilibrio termodinámico en los pasos del experimento.
- La densidad óptica es proporcional a la concentración de anticuerpos con sitios activos libres (1 ó 2 sitios).

Como se desprende de la figura 1, y al igual que en el modelo de Friguet et.al⁵, se miden los sitios que quedan libres tras el primer paso de incubación del método experimental. Asimismo, asumimos que la velocidad de disociación del complejo antígeno-anticuerpo es lo suficientemente lenta para no permitir el rompimiento del equilibrio termodinámico ($k_a > k_d$) (ver discusión). Finalmente, se trabaja en la región lineal de la ecuación de Lambert-Beer*. Para ilustrarlo, se hizo un experimento de ELISA directo sin competencia, para observar la relación entre la concentración de proteína y la densidad óptica. Como se observa en la figura 2, en ciertas concentraciones se obtiene una relación lineal entre la concentración y la densidad óptica. Esta observación ya había sido hecha por Friguet y sus colaboradores quienes relacionaron la absorbancia (A) con la concentración del anticuerpo libre (i) de acuerdo a la ecuación $i/i_0 = A/A_0$, donde i_0 es la concentración total de

anticuerpo y A_0 la absorbancia obtenida por la lectura del anticuerpo en ausencia de antígeno.

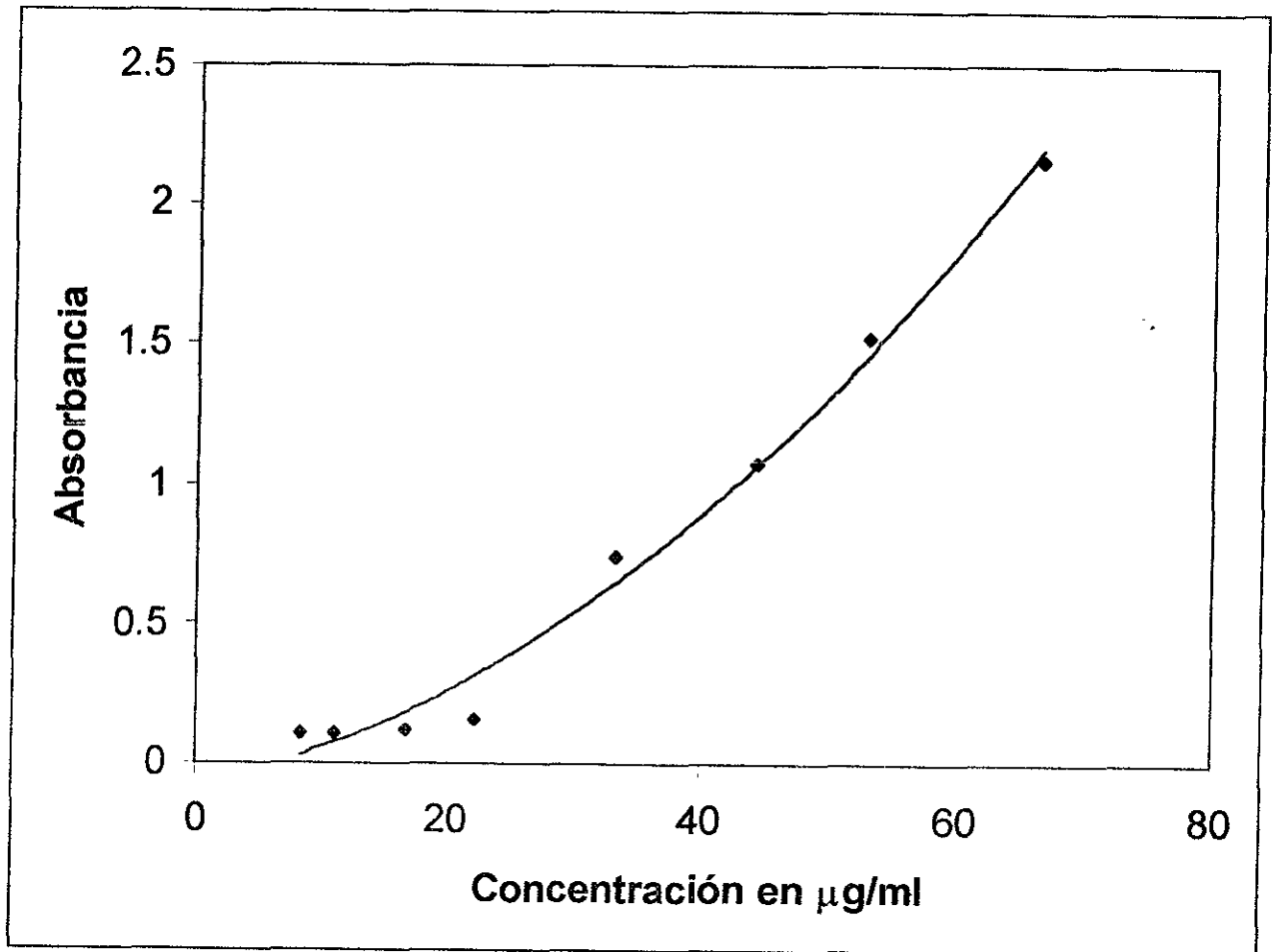


figura 2. Relación entre absorbancia y concentración de proteína.

Las afinidades se simularon en tres casos:

1- Sin interacción en sus sitios de unión, siendo el valor de K_2 un cuarto del de K_1 . Según

Klotz¹³:

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} k \quad (14)$$

donde K_i es la constante de afinidad del i -ésimo sitio ocupado de dado anticuerpo, n la valencia del anticuerpo, y k la constante de afinidad intrínseca ¹².

Para un anticuerpo con dos sitios de unión, se obtiene:

$$K_1 = \frac{2-1+1}{1} k = 2k \quad (15)$$

$$K_2 = \frac{2-2+1}{2} k = \frac{1}{2} k \quad (16)$$

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{2k}{\frac{k}{2}} = 4 \quad (17)$$

Este resultado (17) sirvió de referencia para las otras dos condiciones simuladas,

2- interacción positiva ($K_2 > K_1$) cuyos valores fueron diez veces más $K_2 = K_1/4$.

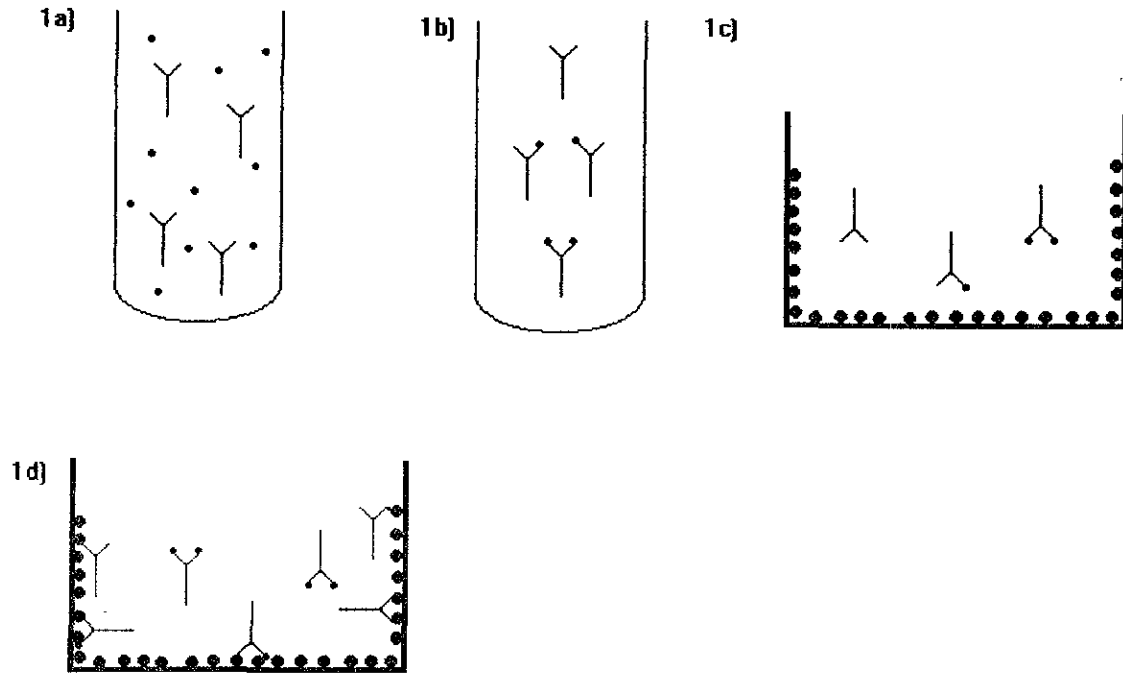
3- interacción negativa, cuyos valores fueron diez veces menos $K_2 = K_1/4$.

El programa calcula de forma numérica iterativa los sitios libres resolviendo las ecuaciones mediante el método de Newton- Raphson (ver apéndice).

Los resultados se analizaron por medio de gráficas de D.O. vs $\log[I_i]$, al igual que por el método desarrollado por Sciutto et.al.¹⁷. Brevemente, el método consiste en interpretar la

fracción de sitios ocupados (r)¹¹ como a una serie de frecuencias acumuladas que al descomponerse en intervalos y ser graficadas contra el logaritmo de $[I]$, muestra su cambios (Δr). La interpretación se basa en los siguientes puntos: a) los sitios de unión con mayor afinidad son ocupados por las concentraciones más pequeñas de antígeno, por lo que están presentes en el lado izquierdo de las abscisas. b) El rango de la concentración de antígeno es función de la heterogeneidad; esto es, entre más heterogénea la muestra, mayor será el rango $[I]$ que cubrirá. Considerando la observación de Reina et.al. (ver modelo teórico), se sustituyeron los valores de $[I]_t$ por los de $[I]$.

Diseño Experimental:



Al incubarse una concentración constante de anticuerpo con varias diluciones de antígeno (a), se obtienen tres grupos de anticuerpos (b): anticuerpo libre [A], anticuerpo con un sitio ocupado [AI_1], y anticuerpo con dos sitios ocupados [AI_2]. Como paso seguido, estas reacciones son transferidas a una placa de ELISA previamente incubada con una concentración conocida de antígeno (c), donde se detectan los grupos [A] y [AI_1], ya que [AI_2] es eliminado en el paso de lavado (d).

Método experimental

Para el ELISA experimental se utilizaron el péptido sintético GM₁₅⁸ y los anticuerpos monoclonales anti DNP 2c5 y 3b5⁶, siguiendo el siguiente protocolo:

1.- Preadсорción del suero con diferentes concentraciones de péptido:

- Se hacen diluciones del péptido desde 1e-4 hasta 1e-12 M en una solución de PBS (pH 7.2) que contiene Tween-20 al 0.3%, y 1% de BSA, en un volumen total de 50 µl por dilución.
- Se adiciona a cada dilución de péptido 50 µl de suero diluido 1: 100 (en el caso de los anticuerpos monoclonales se utilizó una concentración de 10µg/ml) en una solución de PBS-Tween-20 0.3% - BSA 1%.
- Se deja preadsorbiendo toda la noche.

2- Ensayo de ELISA:

- Sensibilizar la placa de ELISA con 100 µl de péptido (15µg/ml) durante una hora a 37° C; el GM₁₅ se diluyó en buffer de carbonatos (Na₂CO₃ 0.2M, NaHCO₃ 0.2M, pH 9.6) , y ácido dinitrofenil sulfónico (DNBS) en buffer de boratos (ácido bórico 0.15M, NaCl 0.2 M, pH 8.5).
- Lavar la placa 4 veces con PBS-Tween-20 0.3%.

- Adicionar 100 μ l. por pozo del suero preadsorbido a la placa e incubar 30 min. a 37° C.
- Lavar la placa 4 veces con PBS-Tween-20 0.3%.
- Adicionar 100 μ l. por pozo del segundo anticuerpo; para el antisuero, anti IgG humana conjugada a fosfatasa alcalina diluida 1: 2000 en PBS-Tween-20 0.3%- BSA 1%, en tanto para los monoclonales anti IgG de ratón acoplada a fosfatasa alcalina en dilución 1: 750 en PBS-BSA 1%.
- Incubar 30 min. a 37° C.
- Lavar la placa 4 veces con PBS-Tween-20 0.3%.
- Adicionar 100 μ l. por pozo del sustrato p- nitrofenilfosfato disódico diluido a una concentración de 1 mg/ml en buffer de dietanolamina.
- Incubar 30 min. a 37° C.
- Parar la reacción con 50 μ l por pozo de NaOH 2N.
- Leer en espectrofotómetro a 405 nm.

Estas condiciones deben ser ajustadas a los requerimientos de anticuerpos particulares (ver discusión).

Resultados

Resultados teóricos

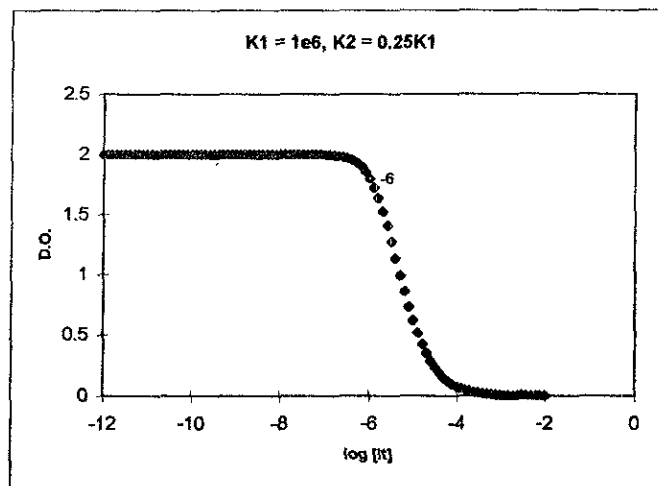
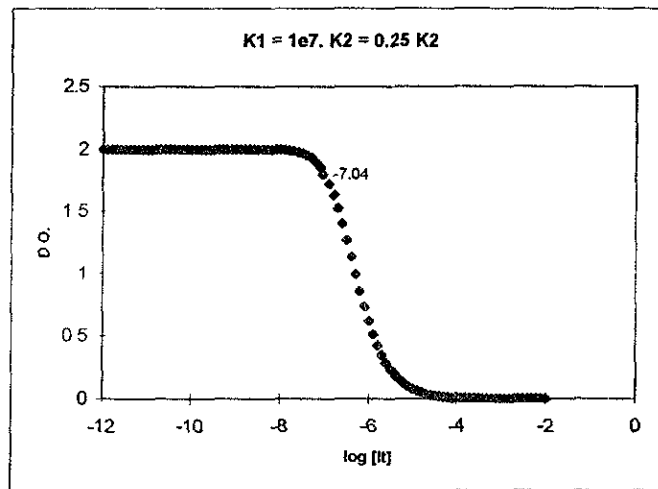
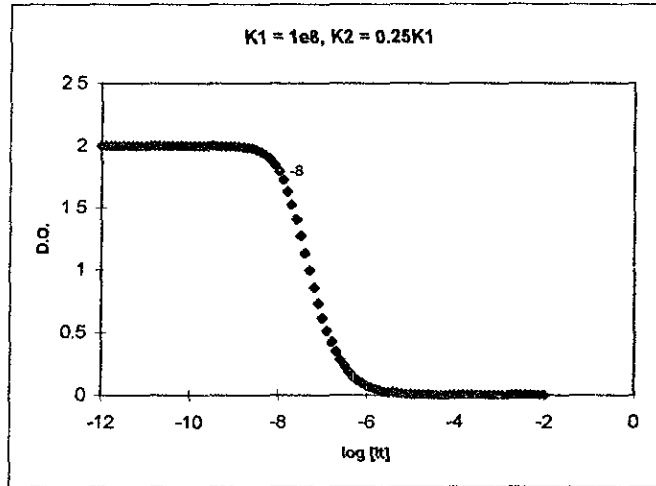
1- Población homogénea

a) Una población sin interacciones:

Se simularon poblaciones de anticuerpos (IgG s), manteniendo la relación $K_1 = 4K_2$ con el fin de estudiar el tipo de curva que se obtenía por el efecto de anticuerpos individuales sin interacción entre sus sitios de unión. Las concentraciones de anticuerpo utilizadas fueron para todos los casos $1/K_1$. De las simulaciones obtenidas se hicieron las siguientes observaciones (gráfica 1):

- la región de la curva donde comienza la inhibición, está relacionada con la constante de afinidad del primer sitio activo (K_1) del anticuerpo en cuestión, siendo el valor de la constante el recíproco de la concentración total de péptido ($[I_t]$) en ese punto. Así pues, en la gráfica 1A la inhibición comienza en $\log[I_t] = -6$ que corresponde al valor esperado para K_1 de 10^6 . Lo mismo se observa en los ejemplos B y C donde $\log[I_t] = -7$ y -8 para los valores de $K_1 = 10^7$ y 10^8 respectivamente.
- La inhibición abarca desde el punto relacionado con la constante de afinidad para el primer sitio activo hasta una concentración de $[I_t]$ cercana al valor de $1/K_2$; $\log K_2$ para la gráfica 1A = 5.39, para 1B = 6.39 y para 1C = 7.39.
- la pendiente de la zona de inhibición presenta valores alrededor a -1.25

Gráfica 1:



Gráfica 1: Efecto de una población homogénea sin interacciones, sobre la curva de inhibición.

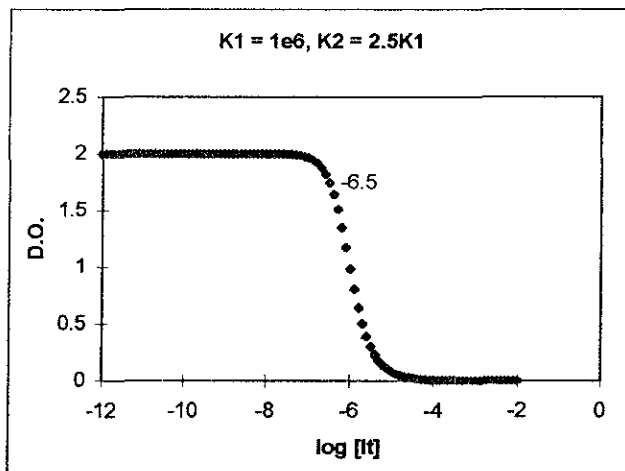
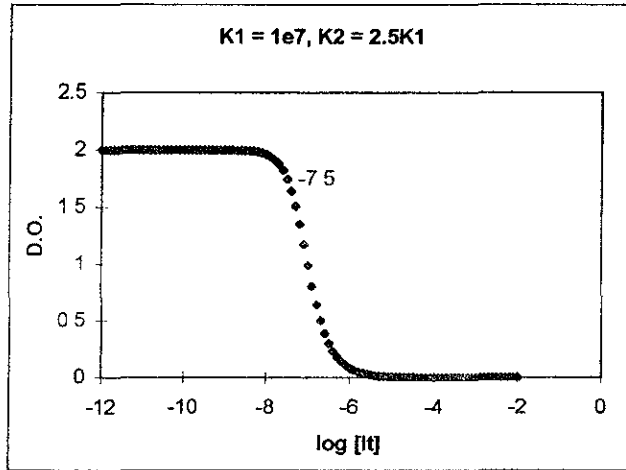
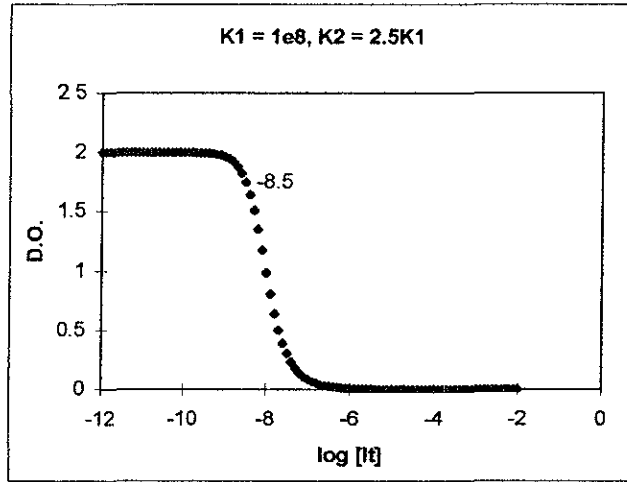
b) Una población con interacción positiva:

Con el fin de estudiar los cambios en la curva de inhibición por efecto de interacciones positivas entre los sitios de unión se simularon poblaciones individuales de anticuerpos manteniendo la relación* $K2 = 2.5K1$, haciéndose las siguientes observaciones (gráfica 2):

- el inicio de la inhibición se relaciona con la constante de afinidad, sólo que en esta ocasión el valor se ha desplazado al de $K2$ (ya que $K2 > K1$). Obsérvese en los ejemplos la correspondencia de éstos puntos con los valores esperados de $\log K2 = 9.4, 8.4$ y de 7.4 .
- la inhibición abarca la región comprendida entre las dos constantes, iniciando alrededor del valor para $K2$ y terminando alrededor del de $K1$.
- la pendiente de la zona de inhibición se encuentra en -1.5

Gráfica 2

A



Gráfica 2: Efecto de cooperatividad sobre la gráfica de una población homogénea.

c) una población con interacción negativa:

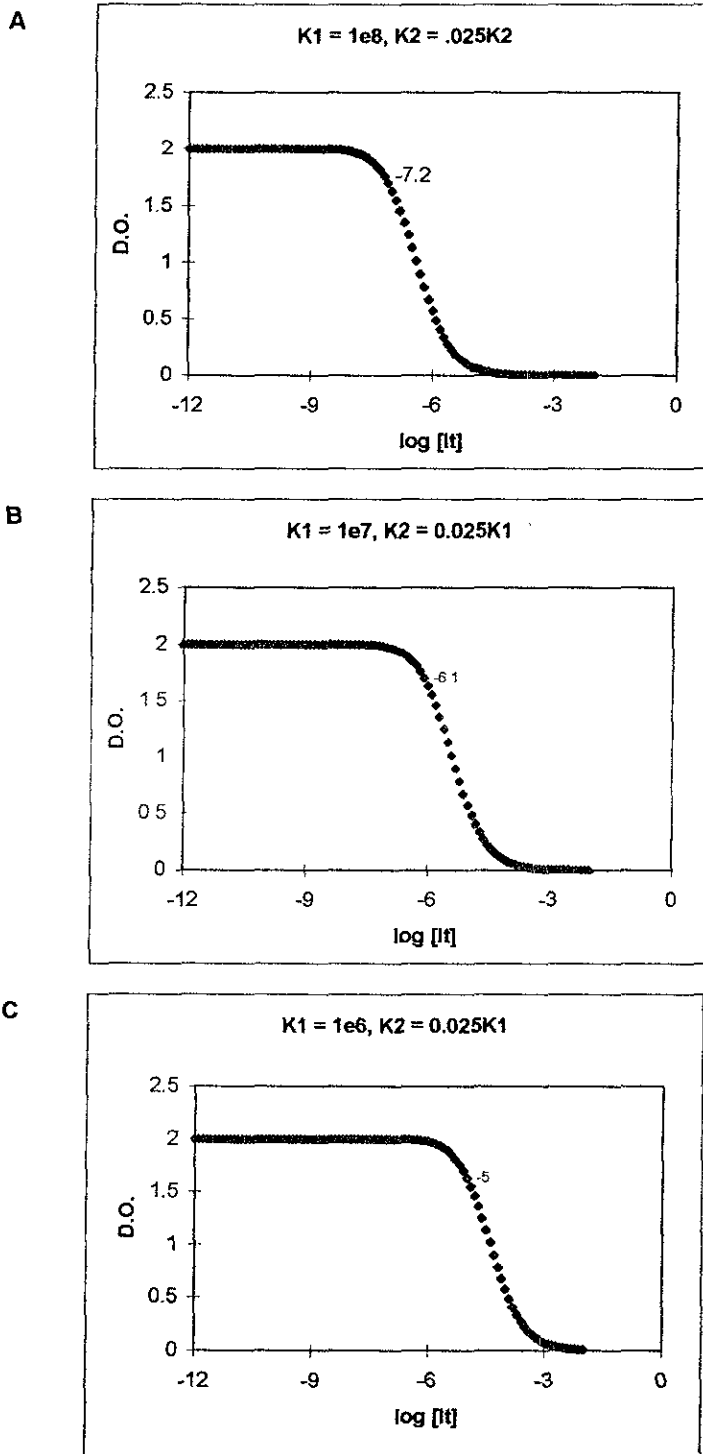
Como paso siguiente, se estudió la variación sufrida por la curva de inhibición a causa de la interacción negativa entre los sitios de unión. Se modelaron anticuerpos con $K2^* = .025K1$ observándose lo siguiente (gráfica 3):

- El inicio de la inhibición se presenta alrededor del valor para $K2$ en cada uno de los casos; compárense los datos obtenidos en los ejemplos contra sus valores esperados: $\log K2_A = 5.4$, $\log K2_B = 6.4$ y $\log K2_C = 7.4$.
- En este caso, el rango de inhibición no cubre hasta el valor de la otra constante de afinidad siendo quizá un reflejo del bajo valor de la $K2$.
- la pendiente de la zona de inhibición presenta valores de -0.3

De las observaciones hechas en los distintos casos podemos resumir:

- la zona del inicio de la inhibición es reflejo del valor de $K2$.
- la inhibición abarca los valores comprendidos entre las dos constantes ($K1$ y $K2$).
- la pendiente indica el tipo de interacción entre los sitios de unión de la Ig , siendo más vertical bajo el influjo de la cooperatividad, e inclinándose horizontalmente en el caso de interacciones negativas.

Gráfica 3



Gráfica 3: Efecto de interacción negativa sobre una población homogénea

2- Heterogeneidad

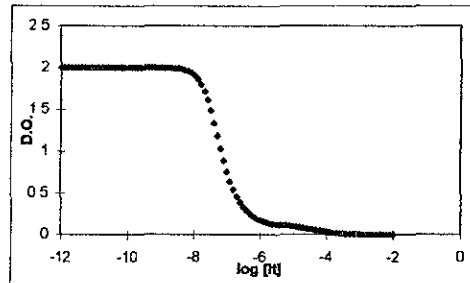
Una vez estudiadas las curvas de inhibición producto de una sola población de anticuerpos, la siguiente pregunta giró en torno a la presencia de otra población de inmunoglobulina. Resultaba interesante saber cómo se comportaría la curva si una de ellas fuera de una afinidad considerablemente mayor a la otra, si se presentara cooperatividad o interacciones negativas entre sus sitios de unión. No solo ello, sino qué pasaría si la segunda población estuviera representada por una relación distinta a la de 1:1. Para contestar estas preguntas, se modeló una muestra compuesta equimolarmente por dos poblaciones de anticuerpos primero sin algún tipo de interacción y luego estudiando los casos de cooperatividad e interacción negativa.

En la gráfica 4, se simuló una población heterogénea compuesta por los anticuerpos A con una $K1_A = 10^5$ y B con una $K1_B$ de 10^8 , ambas poblaciones sin interacciones, para analizar su participación individual en la curva de inhibición. Para ello, se variaron sus contribuciones de 1:1 a 1:3 y 1:20 sobre la concentración total de anticuerpo, obteniéndose 5 gráficas arregladas de la siguiente manera:

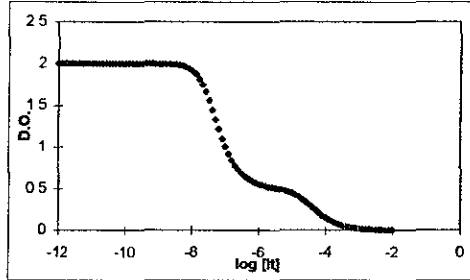
- 4A: muestra los anticuerpos A y B en relación 1: 20.
- 4B: muestra los anticuerpos A y B en relación 1: 3.
- 4C: muestra los anticuerpos A y B en relación 1: 1.
- 4D: muestra los anticuerpos A y B en relación 3:1.
- 4E: muestra los anticuerpos A y B en relación 20: 1.

Gráfica 4:

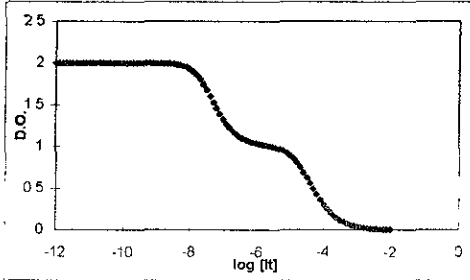
A



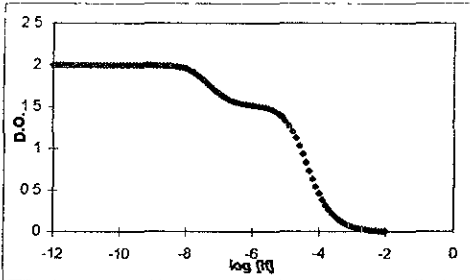
B



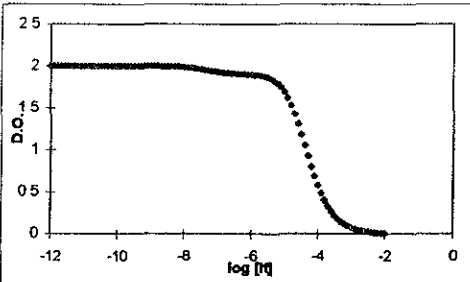
C



D



E



Gráfica 4: Efecto sobre la curva de inhibición de diferentes contribuciones a la concentración total por parte de dos anticuerpos.

(A) $K_{1A} = 1e5$, $K_{1B} = 1e8$ en relación 20:1, (B) $K_{1A} = 1e5$, $K_{1B} = 1e8$ en relación 3:1, (C) $K_{1A} = 1e5$, $K_{1B} = 1e8$ en relación 1:1, (D) $K_{1A} = 1e5$, $K_{1B} = 1e8$ en relación 1:3 y (E) $K_{1A} = 1e5$, $K_{1B} = 1e8$ en relación 1:20.

En todos los casos $K_2 = 0.25K_1$.

Se hicieron las siguientes observaciones:

- Cuando ambos anticuerpos contribuyen de igual manera al total de la concentración, la curva muestra dos curvas que representan cada una de las poblaciones. El inicio de ambas curvas corresponde al valor individual esperado para sus k_1 , alcanzando cada una un valle cerca de la estimación de sus respectivas k_2 (7.4 y 4.4 correspondientemente). Cuando las afinidades de las poblaciones no están lo suficientemente separadas, por al menos dos ordenes de magnitud, se observa un continuo que pudiera confundirse con el caso de una población con interacciones negativas.
- Cuando las proporciones varían, se pierde la definición entre las curvas, observándose principalmente aquella que representa a la población de mayor concentración: en cualquiera de los casos de 1:3 la población de menor concentración es apenas detectable perdiéndose por completo en la última relación (1: 20).
- La pendiente de inhibición para las poblaciones individuales mantuvo un valor parecido en los casos de 1:20 y 1:3: -0.38 y -0.31 respectivamente $K_1 = 1e4$, y -0.92 y -1.17 para $K_2 = 1e7$. Cuando ambas poblaciones tuvieron el mismo peso, el valor de la pendiente fue menor para el caso de $1e4$ (-0.22 contra -0.6).

Obsérvese en las gráficas que a pesar de la diferencia en constantes de afinidad la concentración relativa de cada población es el factor principal detrás de la forma de la curva.

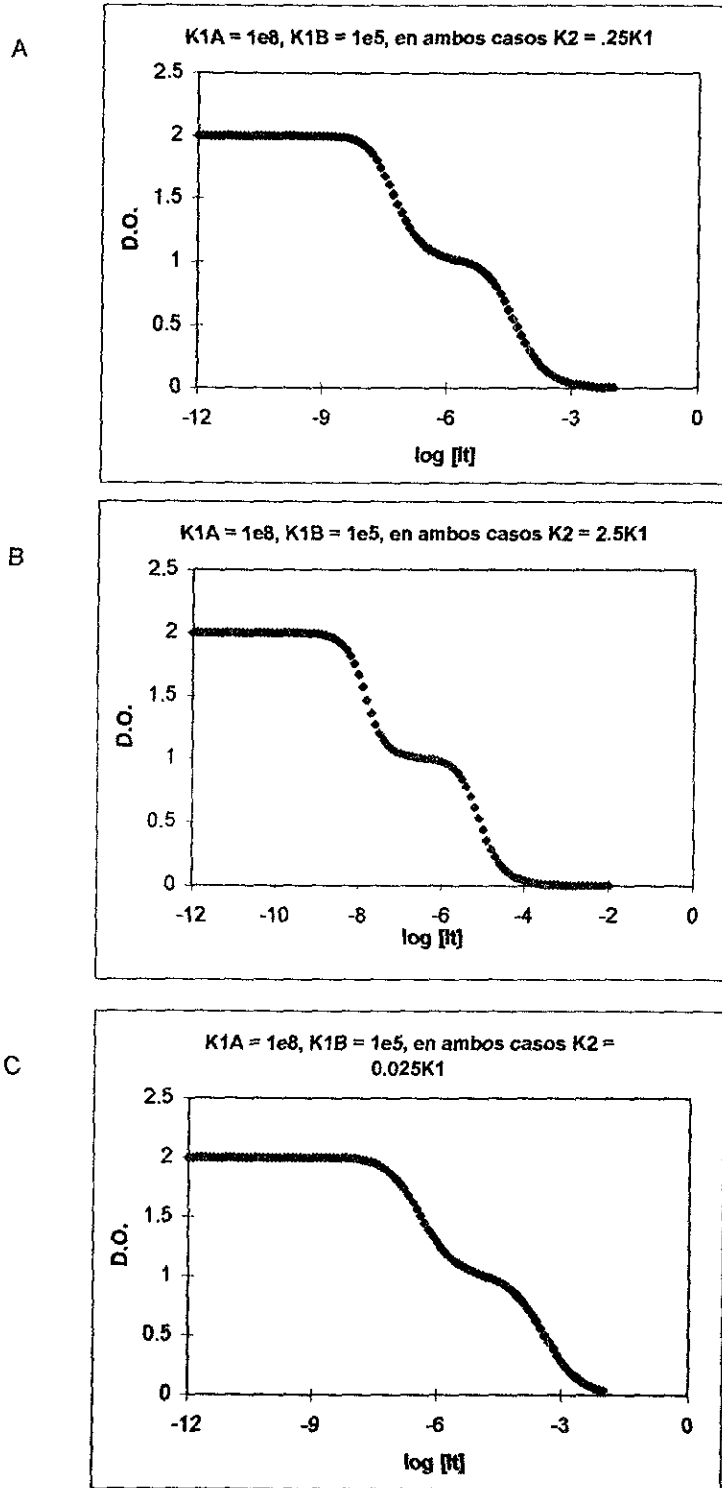
b) Heterogeneidad e interacciones.

Posteriormente, se modeló una población heterogénea de anticuerpos con el fin de estudiar el efecto de las interacciones sobre la curva de ELISA. Como se puede observar en la gráfica 5, las interacciones positivas (b) desplazan la inhibición a la derecha iniciándose esta alrededor del valor esperado para K2. Por su parte, las interacciones negativas (c) desplazan la curva hacia la izquierda también comenzando la inhibición alrededor del valor esperado para K2. Por otra parte, la pendiente de la inhibición mostró valores más cercanos entre si que a los obtenidos en los ejemplos sin interacción: para el caso de no interacciones, las jorobas individuales dieron valores de -0.61 y -0.59 contra -0.76 y -0.75 con cooperatividad. Para interacciones negativas, la pendiente fue igual a -0.63 y -0.66; obsérvese la pérdida de resolución entre las poblaciones a causa de la interacción.

De los datos anteriores, se ve que la pendiente de la inhibición se inclina dependiendo de las condiciones impuestas por las constantes de afinidad del sistema. Para ilustrar mejor este punto, se simuló una población de anticuerpo $K1 = 1e5$ sin interacciones y se le fue adicionando anticuerpos de mayor afinidad (de $1e6$ hasta $1e9$) (gráfica 6). Los valores de la pendiente variaron de -0.6 en los casos donde estaba presente otra población de Ig's hasta llegar a -1.29 cuando el ejemplo fue monoclonal. Asimismo, se calcularon las pendientes que habrían entre la población de mayor y de menor afinidad en los casos donde existe poca resolución entre los dos grupos de anticuerpos (ver tabla 1).

Resumiendo, la pendiente varía de acuerdo no solo con el grado de heterogeneidad de la mezcla, sino también con el grado de separación entre las diferentes constantes de afinidad.

Gráfica 5



Gráfica 5: Efecto de las interacciones entre los sitios de unión sobre la curva de inhibición de una población heterogénea. (A) Sin interacciones, (B) con cooperatividad y (C) bajo interacción negativa.

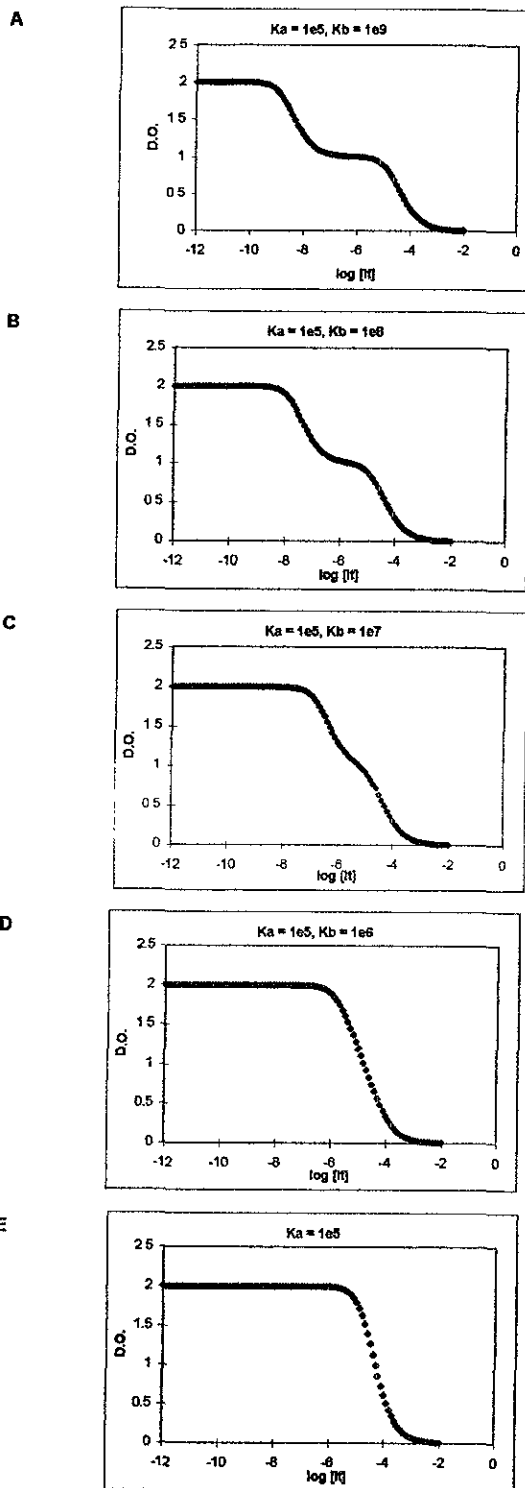
| concentración | 1e5 | 1e6 | 1e7 | 1e8 | 1e9 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | ** | ** | -0.62 | -0.62 | -0.53 |
| 1e5 | -1.29 | -0.85 | -0.61 | -0.55 | -0.55 |

Tabla1. valores de las pendientes de inhibición de la gráfica 6. Cada fila muestra las pendientes resultantes de cada inhibición. En los casos 1e5 y 1e6 sólo se obtuvo una pendiente.

Las principales observaciones del caso heterogéneo fueron:

- La zona del inicio de la inhibición es reflejo de la K de la población mayoritariamente representada.
- En el caso de poblaciones con K's lo suficientemente alejadas (más de dos órdenes de magnitud) se observan jorobas individuales correspondiendo el inicio de cada una a los valores de sus K's.
- Las pendientes individuales se comportan de acuerdo al tipo de interacción entre los sitios de unión (ver homogeneidad).
- Cuando las poblaciones no están lo suficientemente separadas, la pendiente de la inhibición es reflejo del grado de heterogeneidad; en tanto más inclinada mayor el número de poblaciones.

Gráfica 6



Gráfica 6: Distorsión de la curva de inhibición por la presencia de una segunda población. En todos los casos se utilizaron dos anticuerpos A y B siendo siempre $K_{1A} = 1e5$ y K_{1B} los valores siguientes: para la gráfica A) $1e9$, para B) $1e8$, para C) $1e7$ y para D) $1e6$. La gráfica E) muestra la población homogénea $K_1 = 1e5$. Todos los casos fueron sin interacciones.

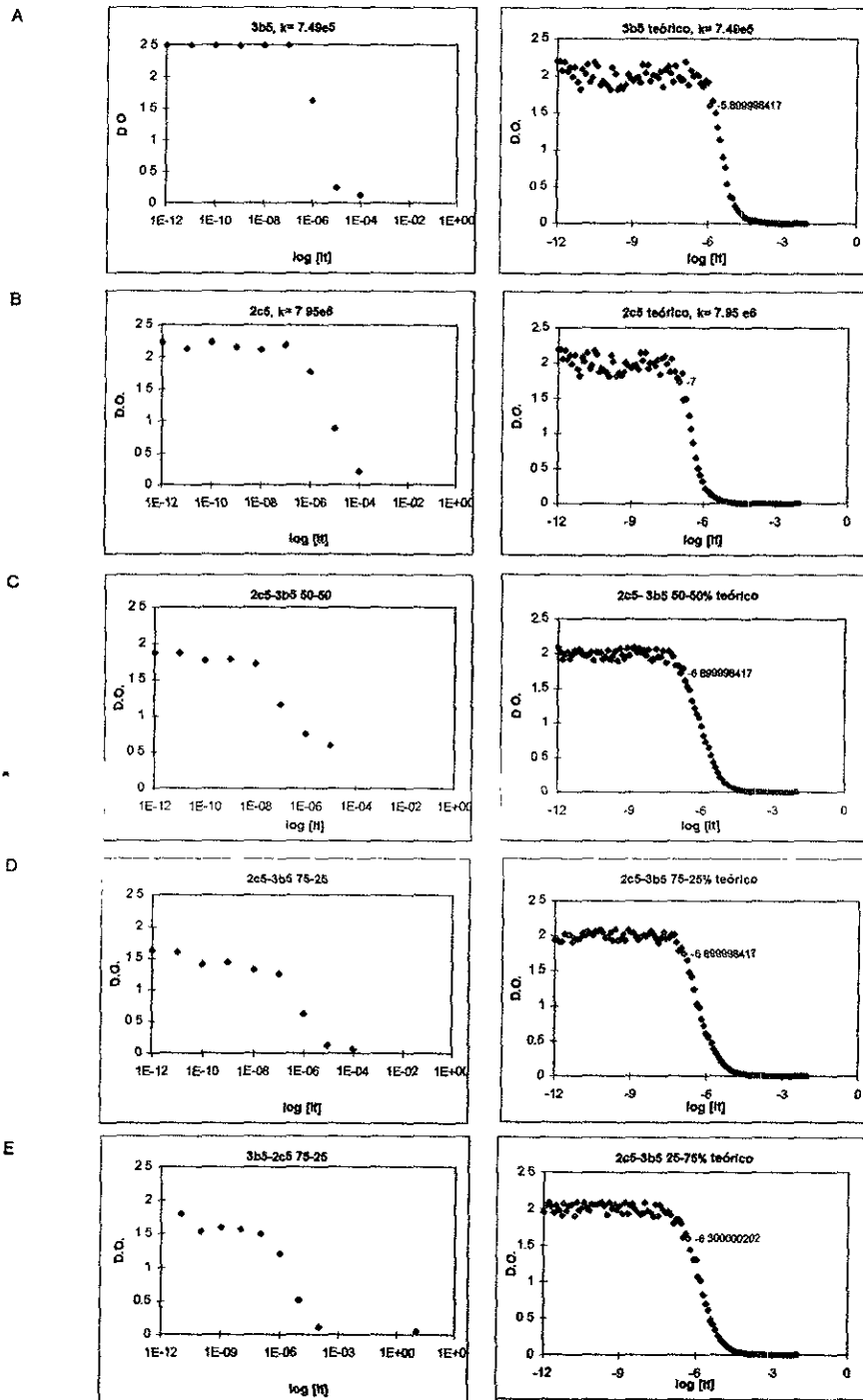
Resultados Experimentales:

1- Anticuerpos Monoclonales

Para comparar los resultados obtenidos por las simulaciones teóricas con resultados experimentales, se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti DNP 2c5 y 3b5 a los que previamente se les había medido la constante de afinidad por el método de apagamiento de fluorescencia. Los datos obtenidos por Garay et.al.⁶ dieron los siguientes valores : para el anticuerpo 2c5 su K fue $7.95e6$, en tanto para el 3b5 su K fue $7.49e5$.

Así pues, se siguió el mismo protocolo que con las simulaciones teóricas: se probaron los anticuerpos de forma individual y se combinaron variando su contribución individual a la concentración total de proteína. Como se puede ver en los resultados (ver gráfica 7), existe una gran concordancia entre la teoría y la práctica. Los valores para la afinidad de ambos anticuerpos se encontraron en el inicio de sus respectivas inhibiciones y la pendiente de la zona de inhibición varió de acuerdo al grado de heterogeneidad de la muestra.

Gráfica 7

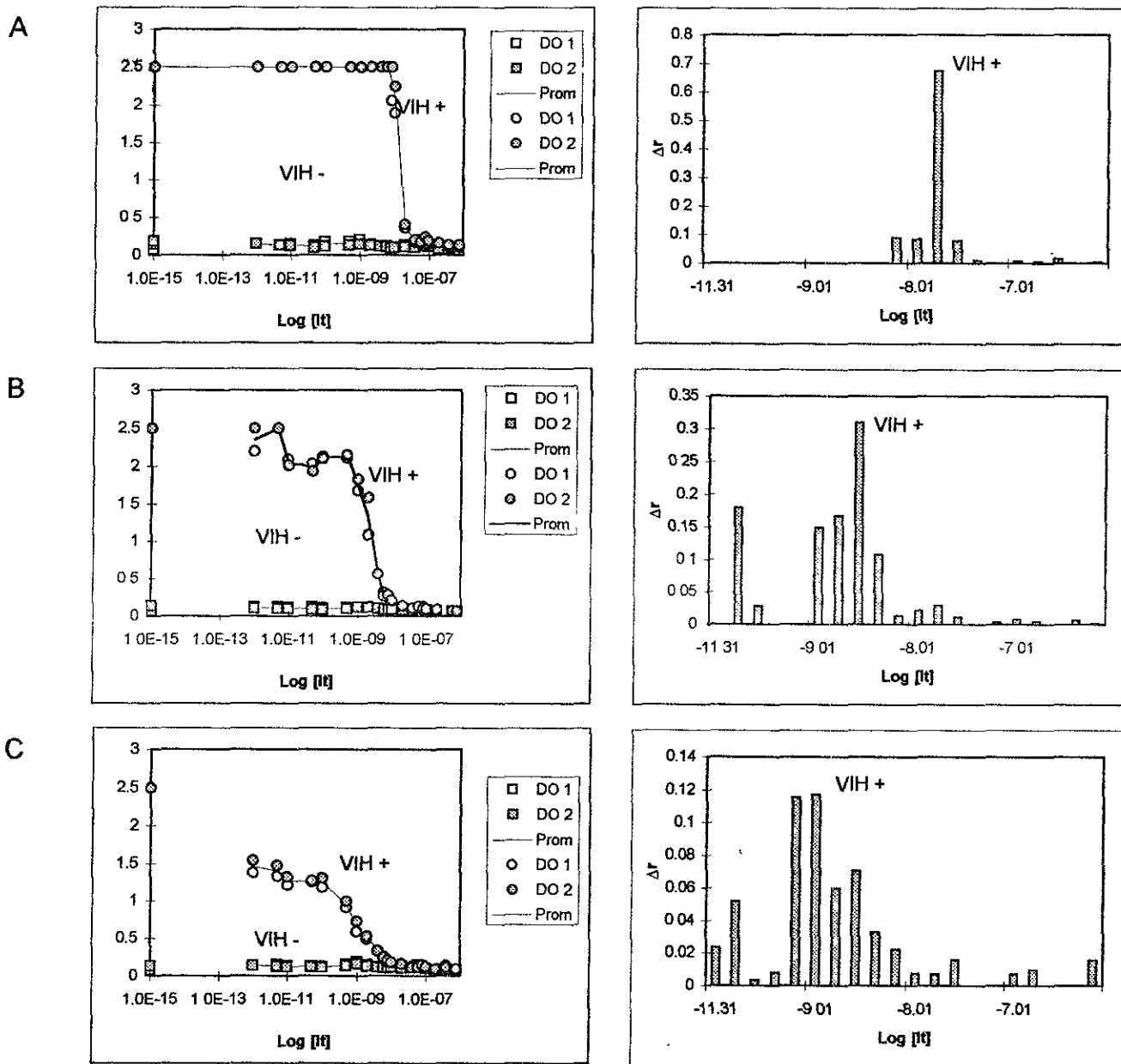


Gráfica 7: Comparación entre curvas de inhibición teóricas y experimentales. A) Anticuerpo 3b5 $K=7.49e5$, B) Anticuerpo 2c5 $K=7.95e6$, C) Mezcla de ambos anticuerpos contribuyendo de igual manera a la concentración total de anticuerpo, D) Mezcla de ambos anticuerpos donde 2c5 está representada mayoritariamente (75%-25%), E) Mezcla de ambos anticuerpos donde 3b5 está representada mayoritariamente (75%-25%).

2- Sueros

Obtenidos los datos anteriores, el siguiente paso fue extrapolarlos a una situación real: utilizando antisuero de tres pacientes HIV positivos, se hicieron ELISA's experimentales (ver método experimental), de los cuales inferimos la siguiente información (gráfica 8). La gráfica 8A representa un suero formado por una población bastante homogénea de afinidad de 10^8 , (comparar la pendiente de inhibición con la ofrecida en la gráfica 2b). Para ilustrar los datos obtenidos, se siguió el método de Sciutto et.al. donde podemos observar la barra que representa a esta población y otras contribuciones menores que no fueron detectadas por el ELISA. La siguiente gráfica (8B), ilustra una población más heterogénea con al menos dos poblaciones de anticuerpos claramente diferenciables - K 's 10^{12} y 10^9 -. Comparando esta gráfica con las 8A y 5B, observamos que la forma de la curva de menor afinidad sugiere una interacción positiva. De la misma manera, la gráfica de Δr_2 ilustra ambas poblaciones mostrando una barra para la población de mayor afinidad -lo que vendría a corroborar su carácter sin interacciones-, y cuatro barras para la de menor afinidad. Por último, en la gráfica 8C aparece un suero heterogéneo compuesto de anticuerpos cuyas afinidades aparentes van desde el orden de 10^{12} hasta 10^9 . Obsérvese que la gráfica muestra una pequeña meseta alrededor del valor para $\log[It]$ de 10^{-10} que podría significar que las afinidades no están distribuidas equitativamente a lo largo de la pendiente, sino que se encuentran en un grupo de alta afinidad (a la izquierda de dicha meseta) y de baja (a su derecha). La gráfica de Sciutto nos muestra las diferentes poblaciones.

Gráfica 8



Gráfica 8: ELISAs experimentales. Los puntos que se encuentran en $\text{Log } [It] = 10^{-15}$ corresponden en realidad a $[It] = 0$.
DO 1 y DO 2 son las densidades ópticas obtenidas en duplicados.

Discusión:

Los resultados descritos muestran que el método propuesto sirve para obtener información sobre la constante de afinidad y el grado de heterogeneidad de un suero determinado. El método ofrece datos sobre estos parámetros de manera sencilla y práctica, obteniéndose la información directamente de la curva de inhibición sin necesidad, como es el caso en otros métodos, de un posterior análisis matemático. La posibilidad de utilizar el antisuero directamente, lo vuelve un método práctico que pudiera utilizarse en la clínica no solo para ensayos cuantitativos como es la práctica general, sino cualitativos buscando relacionar la maduración⁴ y las variaciones en la distribución de la afinidad con el estado de salud de un paciente determinado.

Por otra parte, la simulación de dos sitios activos permitió el análisis directo de las interacciones sin la necesidad de hacer ajustes matemáticos²² o sacar inferencias de situaciones monovalentes. En cuanto al no rompimiento del equilibrio termodinámico, se asume una velocidad de disociación (k_d) lo suficientemente lenta como para perturbar lo menos posible el equilibrio en la segunda parte del experimento (en la placa). En un artículo por Larvor et.al.¹⁴, se reportan constantes de disociación de varios complejos antígeno- anticuerpo que van desde 1.8×10^{-2} hasta $2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, que cae dentro de los tiempos de incubación empleados en los experimentos. Por otra parte, Friguet et.al.⁵ consideran que dadas las condiciones experimentales sólo una fracción del anticuerpo libre del paso de preincubación (entre 5 y 10%) es capturado por el antígeno pegado a la placa con lo que el equilibrio no es afectado significativamente. Esto refuerza la necesidad de hacer un experimento previo para conocer las condiciones de cada suero en particular y

poder así, utilizar el método propuesto. Hay que tener en cuenta que dichas condiciones dependerán de la concentración de antígeno en la placa, la concentración del anticuerpo y la avidéz del anticuerpo en fase líquida por el antígeno absorbido al pozo. Finalmente, a pesar de que la afinidad contribuye a la estabilidad del complejo antígeno- anticuerpo, otros factores tales como impedimento estérico, o la valencia del anticuerpo pueden afectar el equilibrio. Sobre este último punto, Hetherington SJ ¹¹ considera que es la densidad de epitopos lo que determina la cantidad de anticuerpo unido con lo que se puede alterar el equilibrio en la fase líquida sobre todo de anticuerpos de baja afinidad. Tomando estos factores en consideración, otros autores⁹ describen la estabilidad del complejo de acuerdo a un parámetro operacional que depende exclusivamente de las condiciones del experimento. En este caso en particular, aún considerando que la "afinidad" medida no es exacta, el fin era poder comparar sueros de diferentes características y que esto permitiera hacer comparaciones entre ellos. Como se observa en la comparación con los anticuerpos monoclonales, el valor obtenido no se encuentra significativamente alejado del medido experimentalmente probándose así, la validez del método. Como se observa en otros métodos, el valor de la afinidad se encuentra en la zona de inhibición de la curva. El hecho de que encontremos el valor de K al inicio de la inhibición en lugar del 50% como es estándar en el método de Nieto, es reflejo quizá del uso de dos sitios de unión en nuestra propuesta, no hay que olvidar que la curva tiende a empezar a inhibirse alrededor del valor para K₂ para las situaciones de cooperatividad o de K₁ para situaciones sin interacción, alejándose un poco en la situación de interacción negativa quizá por el peso impuesto por una mayor K₁. Nieto asume que una concentración muy baja del antígeno en solución será unido (hay que recordar que su método involucra la competencia del anticuerpo por

antígeno en solución y adsorbido a la placa), con lo que el antígeno libre puede ser calculado del antígeno total. Sin embargo, ya que esto vendrá determinado por la relación entre la concentración del antígeno y del anticuerpo, así como por las constantes de equilibrio de las fases líquida y sólida²³, una combinación de alta afinidad para la fase líquida y baja para la sólida provocará la unión de una concentración considerable de antígeno en solución violándose la asunción inicial.

El grado de heterogeneidad es obtenido por la pendiente de inhibición de la curva siendo mayor conforme decrece la pendiente, esto como resultado de los diferentes puntos de equilibrio que se necesitan satisfacer para cada población de anticuerpo. Cuando se presentan interacciones, los valores varían con respecto a los ejemplos individuales debido al peso impuesto por la presencia de otro anticuerpo. En los ejemplos donde dos poblaciones contribuyen equitativamente a la concentración total de proteína, la diferencia entre pendientes refleja la alteración sufrida en la inhibición de la población de mayor afinidad: obsérvese (gráfica 4C) como la curva comienza a aplanarse antes del rango observado en los otros casos. Asimismo, los resultados pueden variar debido a interacciones inter e intra anticuerpos, esto es, por la interacción de los sitios de unión y la acción de otras inmunoglobulinas. Por otra parte, los valores entre las k 's de un anticuerpo con valores contrastantes (separadas por más de dos órdenes de magnitud) podrían dar una gráfica más heterogénea con una combinación de interacciones. Lo opuesto también podría suceder en el caso una población variada de anticuerpos cuyos integrantes tuvieran constantes de afinidad cercanas: las afinidades se solaparían dando como resultado una pendiente de inhibición que sugeriría homogeneidad. Aún con el método de Scitutto et.al.

cuya gráfica es más sensible a los cambios, si el experimento es hecho con pocos puntos se podrían no detectar las diferencias.

Con el fin de obtener la mayor cantidad de información posible, se recomienda hacer un experimento previo para ajustar las condiciones a sueros o anticuerpos particulares: por una parte, tomar en cuenta que una concentración baja de anticuerpo es la óptima para el ELISA (esto es una concentración alrededor de $1/k$ con lo que el pre ELISA daría una idea de que concentración usar) y por otro lado, recordar que las condiciones expuestas en el método experimental son válidas para los sueros y anticuerpos que se utilizaron pero podrían no serlo para otros anticuerpos. Asimismo, se recomienda hacer un mayor número de diluciones del péptido en el área de la inhibición con el fin de obtener un valor más exacto de la constante de afinidad.

El programa computacional mostró que el método de ELISA propuesto es sensible a los cambios de afinidad, heterogeneidad, así como a la interacción entre los sitios de unión de la inmunoglobulina. Los resultados experimentales mostraron que dicha sensibilidad también se presenta en una situación real extrayéndose la información directamente de la curva de inhibición.

Dada la facilidad de la técnica y la cantidad de información que proporciona, el método propuesto ofrece un camino para obtener algunos datos que pudieran dar algún día más luz en el todavía oscuro camino de la inmunología.

Apéndice:

Método de Newton para resolver sistemas de ecuaciones con dos incógnitas:

$$\text{Sea} \quad x_{n+1} = f(x_n, y_n), \quad (1)$$

$$y_{n+1} = g(x_n, y_n), \quad (2)$$

donde $n = 0, 1, 2, \dots$ y las funciones f y g están definidas por

$$f(x, y) := x + \delta(x, y), \quad g(x, y) := y + \varepsilon(x, y),$$

donde δ y ε denotan la solución del sistema lineal

$$F_x(x, y)\delta + F_y(x, y)\varepsilon = -F(x, y), \quad (3)$$

$$G_x(x, y)\delta + G_y(x, y)\varepsilon = -G(x, y), \quad (4)$$

La secuencia (x_n, y_n) converge cuadráticamente a la solución (s, t) para cada (x_0, y_0) lo suficientemente cercano a (s, t) . Para ello, basta mostrar que los elementos de la matriz jacobiana de las funciones iterativas f y g ,

$$\mathbf{J}(x, y) = \begin{pmatrix} f_x(x, y) & f_y(x, y) \\ g_x(x, y) & g_y(x, y) \end{pmatrix} \quad (5)$$

son todas cero para $(x, y) = (s, t)$.

Tenemos:

$$f_x = 1 + \delta_x, \quad f_y = \delta_y, \quad (6)$$

$$g_x = \varepsilon_y, \quad g_y = 1 + \delta_y, \quad (7)$$

Los valores de δ_x , δ_y , ε_x , y ε_y son determinados de (3) y (4) por derivación implícita.

Diferenciando la primera de estas ecuaciones obtenemos:

$$F_{xx}\delta + F_x\delta_x + F_{xy}\varepsilon + F_y\varepsilon_x = -F_x, \quad (8)$$

$$F_{xy}\delta + F_x\delta_y + F_{yy}\varepsilon + F_y\varepsilon_y = -F_y, \quad (9)$$

Se obtienen dos relaciones similares al diferenciar para G la segunda ecuación (4).

Dejando $(x,y) = (s,t)$, observamos que para $\delta(s,t) = \varepsilon(s,t) = 0$.

Así pues, se obtiene para $(x,y) = (s,t)$

$$F_x\delta_x + F_y\varepsilon_x = -F_x, \quad (10)$$

$$G_x\delta_x + G_y\varepsilon_x = -G_x, \quad (11)$$

$$F_x\delta_y + F_y\varepsilon_y = -F_y, \quad (12)$$

$$F_x\delta_y + F_y\varepsilon_x = -F_y, \quad (13)$$

El determinante de estos dos sistemas de ecuaciones es el determinante jacobiano

$D(s,t)$. De aquí se encuentra

$$\delta_x = -1 \quad \delta_y = 0$$

$$\varepsilon_x = 0 \quad \varepsilon_y = -1$$

De acuerdo a (6) y (7), todos los elementos de la matriz \mathbf{J} (5) en el punto (s,t) son cero.

Para la ejecución del método de Newton, es necesario resolver (3) y (4) para δ y ε en cada paso de la iteración. Para sistemas de segundo orden, la solución es efectuada por la regla de Cramer que da

$$\delta = \frac{GF_y - FG_y}{F_x G_y - F_y G_x} \qquad \varepsilon = \frac{FG_x - GF_y}{F_x G_y - F_y G_x}$$

En el modelo, los elementos de la matriz fueron los siguientes:

$$[A] = x, [I] = y.$$

$$F = x + K1xy + K1K2xy^2 - [A_i] \qquad (14)$$

$$G = y + K1xy + 2(K1K2xy^2) - [I_i] \qquad (15)$$

Los valores iniciales de la iteración fueron calculadas mediante el método general para resolver ecuaciones de segundo grado.

$$[A_i] = x + K1xy \qquad (16)$$

$$[I_i] = y + K1xy \rightarrow y = \frac{[I_i]}{(1 + K1x)} \qquad (17)$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Bibliografía:

- 1.- Azimzadeh A, Weiss E, Van Regenmortel MHV: Mol Immunol 1992, 29: 601-608.
- 2.- Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG: J. Immunol. Methods. 1987, 100: 173-179
- 3.- Bruderer U, Deusinger M, Schürch U, Lang AB: J Immunol Methods. 1992, 151: 157-164.
- 4.- Foote J, Eisen HN: Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92: 1254-1256.
- 5.- Friguet B, Chaffotte AF, Djavadi- Ohaniance L, Goldberg ME: J Immunol Methods. 1985, 77: 305-319.
- 6.- Garay Canales CA: "Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales de la clase IgG específico para el 2,4 dinitrofenol., Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM, México 1994.
- 7.- Gearhart PJ: "Fundamental Immunology", (Paul WE ed.): Raven Press. 1993, 865-885.
- 8.- Gevorkian G, Viveros M, Zamudio F, Larralde C.: Org.Prep. Proced. Int. 1995, 27: 375-377.
- 9.- Golberg ME y Djavadi - Ohaniance L: Curr. Opinion in Immunol. 1993, 5: 278- 281.
- 10.- Hethcote HW and De Lisi C: J of Chromatography. 1982, 248: 183-202
- 11.- Hetherington S: J Immunol Methods. 1990, 131: 195-201.
- 12.- José MV y José JV: J. Theor. Biol. 1998, 190: 85- 92.
- 13.- Klotz I: Protein interactions. "The Proteins" (Neurath H. y Bailey K. eds.), Academic Press vol. 1, 1953, 727-806.
- 14.- Larvor MP, Djavadi- Ohaniance L, Nall B, Goldberg E: J. Immunol. Methods. 1994, 170: 167-175.
- 15.- Nieto A, Gaya A, Jansa M, Moreno C, Vives J: Mol Immunol. 1984, 21: 537-543.
- 16.- Pesce AJ, Michael JG. J Immunol Methods. 1992, 150: 111-119.

- 17.- Rath S, Stanley CM, Steward MW: J Immunol Methods. 1988, 16: 245-249.
- 18.- Reyna B, Afinidad de los anticuerpos anti VIH: Método de Medición y primeras descripciones teóricas y experimentales. Tesis de licenciatura, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México 1995.
- 19.- Scatchard G. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1949, 51: 660.
- 20.- Sciutto E, Garat B, Ortega E, Larralde C.: Mol Immunol 1987, 24: 577-585.
- 21.- Sips R: J Chem Phys 1948, 16: 490-495.
- 22.- Stevens FJ: Mol Immunol 1987. 24: 1055-1061.
- 23.- Underwood PA: J Immunol Methods, 1993, 164: 119-30.
- 24.- Winzor DJ, Bowles MR, Pentel PR, Schoof DD, Pond SM: Mol Immunol. 1991, 28: 995-1001.
- 25.- Zubay G: Biochemistry, 3 ed. WCB. 1993, 54