

03062  
2e/2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

Colegio de Ciencias y Humanidades  
Unidad de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Proyecto Académico de Licenciatura, Maestría y Doctorado  
en Investigación Biomédica Básica

Instituto de Investigaciones Biomédicas

CARACTERIZACION DE LA HETEROGENEIDAD DE  
ANTICUERPOS ANTI-DINITROFENOL

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO  
DE  
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
QUE PRESENTA

RAFAEL BOJALIL PARRA

1988

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El trabajo presentado en esta tesis se realizó en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Rug Pérez Montfort, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto de investigación tuvo su origen en el laboratorio del Dr. Carlos Larralde del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Para el desarrollo del trabajo el autor contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

# Índice

	Página
<b>Resumen</b>	
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Material y Métodos</b> .....	8
Animales .....	8
Preparación del antígeno .....	8
Immunización .....	8
Obtención del suero .....	10
Purificación de anticuerpos .....	10
Obtención de curvas de fijación del hapteno .....	11
Cálculo de fracción de sitios ocupados (r) y hapteno libre (L) .....	12
Obtención de la distribución de afinidades .....	13
Obtención de la afinidad promedio .....	14
Determinación de concentración de anticuerpos anti-dinitrofenol .....	14
Iodinación .....	16
<b>Resultados</b> .....	18
Ratones .....	18
<i>Balb/c</i> .....	18
Estudio con anticuerpos puros .....	18
Estudio con gammaglobulinas totales .....	22
<i>CS7Bl/6</i> .....	27
5 inoculaciones .....	27
7 inoculaciones .....	32
Conejo .....	37
<i>Histogramas con proporciones de anticuerpos</i> .....	37
Estudio cada dos semanas .....	37
Estudio de la variación diaria en hiperinmunización .....	42
<i>Histogramas con cantidades totales de anticuerpos</i> .....	49
Estudio cada dos semanas .....	50
Estudio de la variación diaria en hiperinmunización .....	52
<b>Discusión</b> .....	57
<b>Referencias</b> .....	69
<b>Apéndices</b>	
a) Abreviaturas	
b) Programa computacional	

## Resumen

En este trabajo estudiamos la heterogeneidad de afinidades de los anticuerpos anti-dinitrofenol producidos por dos cepas singénicas de ratones (Balb/c Ann y C57Bl/6) y un conejo (Nueva Zelanda Blanco).

En los ratones investigamos el efecto de diferentes variables en la distribución de afinidades de los anticuerpos producidos. Estudiamos dos diferentes dosis de antígeno, dos números de inoculaciones y el papel del Adyuvante Completo de Freund (ACF). Las hembras y los machos fueron estudiados por separado. En el conejo analizamos los cambios en la distribución de afinidades a medida que aumentábamos el número de inoculaciones. Investigamos también la evolución de la respuesta del conejo después de un último reto en estado de hiperinmunización.

En los ratones observamos diferentes distribuciones de afinidades tanto entre las cepas como entre los sexos. Las hembras, principalmente las de la cepa Balb/c, produjeron más rápidamente grandes proporciones de anticuerpos de alta afinidad que los machos. En ratones hay otros dos hallazgos notables: 1) la dosis baja del antígeno indujo anticuerpos de menor afinidad que la dosis alta; 2) los anticuerpos de baja afinidad nunca desaparecieron de la distribución de afinidades. Se discuten las posibles causas de estos hallazgos.

En el conejo encontramos también anticuerpos de baja afinidad aún después de varios retos con el antígeno, a pesar de que claramente se observa una maduración de la afinidad. El estudio del conejo en estado de hiperinmunización nos muestra datos que apoyan la idea de que los anticuerpos de baja afinidad pueden ser producto del constante reclutamiento de nuevas células.

Por otro lado, diversos histogramas mostraron una tendencia a una distribución común de las afinidades, se discuten sus posibles implicaciones.

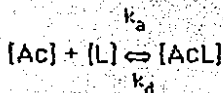
Finalmente, proponemos una modificación al método que utilizamos para describir la heterogeneidad. La modificación propuesta otorga a cada distribución de afinidades un peso proporcional a la cantidad de anticuerpos que le corresponden. Esto permite evaluar la distribución de afinidades de una manera más completa: en la misma gráfica pueden hacerse simultáneamente el análisis cualitativo y el cuantitativo.

## Introducción

La respuesta inmune está representada por una gran diversidad de fenómenos cuyos protagonistas son un conjunto de células y moléculas que interactúan entre sí para dar lugar a acciones de una alta complejidad que aún no son conocidas ni comprendidas en su totalidad. Los anticuerpos que se obtienen como resultado de un estímulo antigénico único, presentan heterogeneidad tanto estructural como funcional, contribuyendo de esta manera a la diversidad de la respuesta inmune. La heterogeneidad de afinidades de los anticuerpos es el tema que nos ocupa.

Las interacciones antígeno-anticuerpo pertenecen a un grupo de reacciones biológicas de fijación no covalente entre un ligando y un sitio activo de una macromolécula. Estas reacciones incluyen las que se dan entre enzima y sustrato, hormona y receptor, ligando a proteína acarreadora, etc. Sin embargo, la reacción antígeno-anticuerpo tiene características especiales debido tanto a la gran diversidad de antígenos, como a la respuesta policlonal de los anticuerpos, que da lugar a una heterogeneidad de afinidades. La complejidad de la reacción de fijación, depende principalmente de la cantidad de determinantes antigénicos presentes en la molécula de antígeno.

En el caso más simple, es decir, la fijación de un hapteno, la reacción puede describirse de la siguiente manera, en equilibrio (revisado por Steward & Steensgard, 1983):



Donde [Ac] es la concentración de anticuerpos libres; [L] la concentración de hapteno libre; [AcL] la concentración del complejo antígeno-anticuerpo;  $k_a$  la constante de asociación y  $k_d$  la constante de disociación.

En estado de equilibrio químico o termodinámico, la constante de equilibrio (K) se define como sigue:

$$K = k_a/k_d = [\text{AcL}]/[\text{Ac}][\text{L}]$$

Termodinámicamente la afinidad se define como el negativo del cambio de energía libre de la reacción. El cambio de energía libre ( $\Delta G^\circ$ ) se define como sigue:

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

Donde R es la constante del estado gaseoso (8.314 J/mol °K) y T es la temperatura absoluta en grados Kelvin (°K).

Experimentalmente, sin embargo, la constante de asociación (es decir, la constante de equilibrio del proceso de asociación) se usa frecuentemente como una medida aproximada de la afinidad.

Para describir la interacción entre un hapteno monovalente y un anticuerpo se ha utilizado el término de afinidad intrínseca; para describir la interacción entre un antígeno oligovalente y los sitios activos de un anticuerpo se ha utilizado el de afinidad funcional (Hornick & Karush, 1972). Este último concepto implica que se toman en cuenta factores ajenos a la reacción antígeno-anticuerpo en sí misma. Estos factores incluyen la valencia del anticuerpo, la del antígeno, interacciones entre sitios de fijación, etc. (Larralde & Janof, 1972; Klotz & Hunston, 1975; Celis et al., 1977).

La afinidad promedio de los anticuerpos que reaccionan ante un antígeno aumenta progresivamente con el tiempo, después de la administración del antígeno (Eisen & Siskind, 1964; Steiner & Eisen, 1967a). Así mismo, la afinidad promedio es mayor durante la respuesta secundaria que durante la primaria (Steiner & Eisen, 1967b). Esta maduración de la afinidad se ha explicado por un proceso de selección de las células capaces de producir anticuerpos de alta afinidad (Siskind & Benacerraf, 1969; Davie & Paul, 1973).

¿Tiene la maduración de afinidad un papel biológico importante? En otras palabras, ¿le da ventajas al organismo la formación de complejos inmunes más estables?. Efectivamente diversas reacciones biológicas se realizan con mayor eficiencia en presencia de anticuerpos de alta afinidad: fijación de complemento (Fauci et al., 1970); eliminación del antígeno



(Alpers et al., 1972); neutralización viral (Blank et al., 1972); protección en contra de infecciones bacterianas (Ahlstedt et al., 1974); inactivación de enzimas (Erickson, 1974), etc. Sin embargo, la mayor afinidad promedio de los anticuerpos no siempre es ventajosa para el organismo, principalmente patologías autoinmunes se han asociado a una alta afinidad (Goldl et al., 1983; Ahmed et al., 1985). Existen por otro lado, organismos incapaces de desarrollar maduración de la afinidad de los anticuerpos que producen; esta deficiencia se ha asociado a enfermedad crónica por complejos inmunes (Soothill & Steward, 1971). La mayoría de estos estudios se han hecho considerando exclusivamente la afinidad promedio. Esta sin embargo, se calcula suponiendo que la distribución de afinidades es unimodal y de forma normal o cercana a ella (Sips, 1948). Diversos autores sin embargo, han demostrado que la distribución de afinidades no sólo no es simétrica sino tampoco unimodal (Werblin & Siskind, 1972; Flanagan et al., 1978). Esto significa que la afinidad promedio no puede ser más que un reflejo simplista de fenómenos muy complejos. Distribuciones de afinidades muy distintas pueden dar lugar a afinidades promedio similares; no sabemos sin embargo, si estas distintas distribuciones tienen un papel biológico distinto. De hecho, no se conoce el papel biológico de la heterogeneidad de afinidades. Esto se debe a que no se conocen fenómenos muy diversos que contribuirían a aclararlo; por ejemplo: la distribución inicial de las diversas poblaciones de anticuerpos que responden a un estímulo antigénico, las modificaciones que sufre a través

del tiempo, o la manera como se comporta bajo la influencia de diversas variables.

Se han hecho diversos intentos para describir la heterogeneidad de afinidades (para una revisión reciente ver Sciutto, 1986); la mayoría de los métodos son muy complejos y de difícil aplicación, por lo que no se han resuelto problemas fundamentales en el tema.

Recientemente se desarrolló un método sencillo (Sciutto et al., 1987) que se basa en la interpretación de la gráfica de Klotz (1982) como una curva de frecuencias acumuladas. Esta gráfica de fracción de sitios ocupados en función del logaritmo de hapteno libre, es susceptible de dividirse en intervalos, de tal manera que puede graficarse el cambio en la fracción de sitios activos ocupados por cada intervalo de logaritmo de hapteno libre. Se obtienen así histogramas que por sí mismos describen la distribución de afinidades (Sciutto et al., 1987). Estos histogramas pueden diferenciar entre dos poblaciones de anticuerpos si éstas difieren en más de un orden de magnitud en afinidad. Es decir, no detectan más de una población por cada unidad logarítmica de hapteno libre y por lo tanto el número máximo de poblaciones encontradas es limitado. Sin embargo, es un método sensible a la heterogeneidad de afinidades, los histogramas se derivan directamente de datos de fijación y es sencillo de aplicar e interpretar.

Desde un punto de vista técnico, el método de apagamiento de fluorescencia (Eisen & McGuigan, 1971) nos ha sido muy útil para la

obtención de los datos de fijación fundamentalmente por dos razones: pueden obtenerse un gran número de puntos, a diferencia de otros métodos como la diálisis en equilibrio; y es ideal para el sistema que utiliza el dinitrofenol (DNP) para la inducción de anticuerpos. Esto último se debe a que el DNP es una molécula cuyo máximo de absorción está en los 363 nm de longitud de onda. Las proteínas en general, y los anticuerpos en particular, al ser excitados a 295 nm de longitud de onda tienen su máximo de emisión de fluorescencia a una longitud de onda cercana a los 345 nm, fundamentalmente por su contenido de triptofanos (Eisen & McGuigan, 1971). Entonces, el DNP es capaz de absorber la fluorescencia emitida por las proteínas. La ocupación con DNP de los sitios activos de los anticuerpos anti-DNP, absorbe la fluorescencia de los triptofanos de ese lugar, y provoca su apagamiento específico. Esto significa que las diferencias más notables entre el apagamiento de los anticuerpos específicos y las gammaglobulinas normales (o cualquier otra proteína), se observan a concentraciones relativamente bajas del hapteno. A altas concentraciones, las constantes colisiones provocan apagamientos inespecíficos de gran magnitud (Cantor & Schimmel, 1980).

Con el fin de avanzar en el conocimiento del papel biológico de la heterogeneidad de afinidades, este trabajo reconoce como principales objetivos:

- Conocer la influencia de diversas variables en la heterogeneidad de afinidades.

- Estudiar las diferencias en el perfil de afinidades de anticuerpos específicos producidos por distintas cepas de ratones.

Y a más largo plazo:

- Relacionar la distribución de afinidades de anticuerpos con susceptibilidad a ciertas enfermedades (en especial las autoinmunes).

Inoculamos 2,4-Dinitrofenol (DNP) acoplado a un acarreador (albúmina sérica bovina, BSA) a dos diferentes cepas singénicas de ratones y a un conejo. Estudiamos dos diferentes dosis del antígeno, el papel del Adyuvante Completo de Freund (ACF) y un número diverso de inoculaciones. Los datos de los ratones machos y hembras fueron obtenidos por separado para conocer sus diferencias. Utilizamos el método de apagamiento de fluorescencia (Eisen & McGuigan, 1971) para obtener los datos, y los procesamos de acuerdo al método descrito por Sciutto y colaboradores (1987).

## Material y métodos.

### Animales.

Se utilizaron ratones de las cepas singénicas Balb/c Ann y C57B1/6, obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, a cargo del Dr. Ciro Lornelí. Se utilizó también un conejo hembra Nueva Zelanda blanco del bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

### Preparación del antígeno.

Se acopló dinitrofenol (DNP) a albúmina sérica bovina (BSA) de acuerdo por el método descrito por Eisen (1964). Una vez hecho el acoplamiento y dializada la solución exhaustivamente para eliminar el DNP libre, se determinó el número promedio de moléculas del hapteno por molécula de BSA ( $\alpha$ ), que fue de 13. El cálculo de la concentración de DNP se basó en su coeficiente de extinción molar a 363. nm de longitud de onda, y la concentración de BSA se calculó por el método de Lowry (1951).

### Inmunización.

Se inoculó DNP<sub>13</sub>BSA a varios grupos de ratones Balb/c. Se utilizaron dos diferentes dosis (20 y 200  $\mu$ g), inoculados en presencia o ausencia de adyuvante completo de Freund (ACF). Unos se inocularon una sola vez y otros en 5 ocasiones. En este último caso la frecuencia de estímulos fue de

cada dos semanas. En todos los casos la primera inoculación se aplicó por vía intramuscular (IM) y las subsiguientes por vía intraperitoneal (IP); el volumen inyectado siempre fue de 100  $\mu$ L. En los grupos con ACF, éste se utilizó únicamente para la primera inoculación. Se estudio cada uno de los sexos por separado. Estos datos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Protocolo de Inmunización de Cepas Murinas.**

GRUPO	SEXO	NO. DE RATONES	DOSIS( $\mu$ g)	ADYUVANTE	NO. ESTIMULOS
CONTROL	H	20	0	NO	0
HS120	H	20	20	NO	1
HS1200	H	20	200	NO	1
HC120	H	20	20	SI	1
HC1200	H	20	200	SI	1
HS520	H	20	20	NO	5
HS5200	H	20	200	NO	5
HC520	H	20	20	SI	5
HC5200	H	20	200	SI	5
CONTROL	M	20	0	NO	0
MS120	M	20	20	NO	1
MS1200	M	20	200	NO	1
MC120	M	20	20	SI	1
MC1200	M	20	200	SI	1
MS520	M	20	20	NO	5
MS5200	M	20	200	NO	5
MC520	M	20	20	SI	5
MC5200	M	20	200	SI	5

Antígeno utilizado: DNP<sub>13</sub>BSA; vol. de inoculación: 100 $\mu$ L; vía de inoculación: IM primer estímulo, IP subsiguientes; frecuencia de estímulos: cada dos semanas.

En el caso de los ratones C57/B16 se utilizó el mismo protocolo, con la diferencia de que el número de inoculaciones fue de 5 y 7. Esto se debió a que en los ratones Balb/c no encontramos anticuerpos después de una inoculación (ver resultados).

Utilizamos también un conejo hembra Nueva Zelanda blanco. Le inoculamos la misma preparación de DNP<sub>13</sub>BSA. La primera inoculación fue vía intramuscular y con ACF. Las subsiguientes fueron intraperitoneales, en solución salina. En todos los casos la dosis fue de 500 µg, tomando en cuenta la concentración de BSA. El conejo se inoculó 12 veces consecutivas, con una separación de dos semanas entre cada reto. Siempre se sangró siete días después de la inoculación. Posteriormente se dejó reposar durante siete meses y se volvió a inyectar vía i.p. con la misma dosis. En esta ocasión se obtuvo sangre diariamente.

#### **Obtención del suero.**

Los ratones se sangraron 15 días después de la inoculación cuando ésta fue única, y 7 días después de la última inoculación cuando se trataba de los grupos de 5 ó 7 estímulos. El suero se obtuvo en todos los casos por los métodos convencionales.

#### **Purificación de anticuerpos.**

La detección inicial de anticuerpos se hizo por el método de doble inmunodifusión. Los sueros positivos para DNP se procesaron de la siguiente manera. Las gammaglobulinas de los sueros de ratones y del conejo, se obtuvieron por precipitación con sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] al 33% (Williams & Chase, 1967). En el caso de los ratones Balb/c, además

se purificaron anticuerpos por cromatografía de afinidad en columnas de *Sepharose 4B* a las que previamente se les había acoplado DNP-1-lisina (March et al., 1974). La elución se hizo con ácido acético 0.2 y 0.5 N, las fracciones de 1 mL se neutralizaron inmediatamente con Tris 2.5 M. Las fracciones seleccionadas por D.O.  $280_{nm} > 0.04$ , se concentraron con membrana XM-100 en un equipo de ultrafiltración de Amicon.

#### **Obtención de curvas de fijación del hapteno.**

Las curvas de fijación del hapteno a los sitios activos de los anticuerpos se obtuvieron por apagamiento de fluorescencia, de acuerdo con el método descrito por Eisen (1971). Brevemente, en una cubeta de cuarzo se pusieron 1.5  $\mu$ L de una solución de anticuerpos puros o de gammaglobulinas totales a una concentración de 40  $\mu$ g/mL (determinada por D.O. 280nm) y se leyó la fluorescencia inicial en un fluorómetro Aminco-Bořman, la longitud de onda de excitación fue de 295 nm y la de emisión de 345 nm. Hecho esto, con una microjeringa se hicieron adiciones 5  $\mu$ L cada vez a partir de un conjunto de diferentes soluciones de DNP-1-lisina a concentraciones de  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-3}$  M, de tal manera que la concentración inicial del hapteno en la solución fuera de  $3.65 \times 10^{-10}$  M y la final después de 50 agregados de  $5.75 \times 10^{-5}$  M. Después de cada uno de los agregados se midió la fluorescencia.



Cálculos de fracción de sitios activos ocupados ( $r$ ) y hapteno libre ( $L$ ).

Los apagamientos específicos parciales ( $Q$ ) y máximos ( $Q_{max}$ ) se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(Q_i = (FG_i - FA_i) * 100 / FG_i) \quad (1)$$

Donde:  $Q_i$  es el apagamiento específico de los anticuerpos en el agregado  $i$ , expresado en por ciento, y  $Q_{max}$  es el máximo apagamiento específico logrado;  $FG_i$  es la fluorescencia de las gammaglobulinas normales (control) en el agregado  $i$ ;  $FA_i$  es la fluorescencia de los anticuerpos problema en el agregado  $i$ .

El valor de fluorescencia que se utiliza en la fórmula (1) se calcula en base a la fluorescencia inicial (tomada como el 100%) y la fluorescencia posterior a cada agregado. Esta última se ajusta de acuerdo al volumen de hapteno adicionado hasta el agregado  $i$ , y se expresa en porcentaje de la fluorescencia inicial.

El cálculo de fracción de sitios activos ocupados ( $r$ ) se hace indirectamente tomando como base  $Q$  y  $Q_{max}$ :

$$(r_i = Q_i / Q_{max}) \quad (2)$$

Donde  $r_i$  es la fracción de sitios ocupados en el agregado  $i$ .

La cantidad de hapteno unida a los sitios activos (P) se calcula, también de manera indirecta, con la siguiente fórmula:

$$(P_i = r_i * S_0) \quad (3)$$

Donde  $P_i$  es la cantidad de hapteno unida a los sitios activos en el agregado  $i$ , y  $S_0$  es la concentración inicial de sitios activos.

Y finalmente el cálculo de hapteno libre (L):

$$(L_i = T_i - P_i) \quad (4)$$

Donde  $L_i$  es la concentración de hapteno libre y  $T_i$  la concentración total de hapteno en la solución, ambos en el agregado  $i$ .

Todos estos cálculos se hacen utilizando un programa computacional elaborado por nosotros (ver apéndice).

### **Obtención de la distribución de afinidades.**

A partir de estos datos se trazaron las gráficas de logaritmo de hapteno libre (Log L) vs fracción de sitios activos ocupados ( $r$ ) (Klotz, 1982) de las que se derivaron los histogramas que describen el número de poblaciones y su distribución de afinidades, de acuerdo con el método propuesto por Sciutto y cols. (1987), con la diferencia que presentamos los histogramas en forma de áreas bajo la curva y no en forma de barras como ellos proponen. Brevemente, el método consiste en interpretar la gráfica de Klotz como una curva de frecuencias acumuladas, susceptible de

descomponerse en intervalos, de manera que se grafica el cambio en la fracción de sitios ocupados ( $\Delta r$ ), por cada intervalo del logaritmo de la concentración de hapteno libre (Log L). La interpretación de los histogramas resultantes se basa fundamentalmente en dos puntos: a) los sitios activos de mayor afinidad son aquellos que se ocupan a menor concentración de hapteno libre en la solución, y por lo tanto están representados hacia la izquierda del eje de las abscisas; b) la amplitud del rango de fijación de hapteno libre está en función de la heterogeneidad de afinidades de los sitios activos de los anticuerpos: cuando ésta es mayor, el rango de Log l también lo es.

#### **Obtención de la afinidad promedio.**

La afinidad promedio la obtuvimos a partir de la forma logarítmica de la ecuación de Sips (1948):

$$\text{Log } r/1-r = a \text{ Log } K + a \text{ Log } L \quad (5)$$

Donde  $a$  es el índice de heterogeneidad y  $K$  es la constante de asociación intrínseca.

#### **Determinación de concentración de anticuerpos anti-DNP.**

Utilizando un ensayo inmunorradiométrico determinamos la proporción de anticuerpos anti-DNP en las gammaglobulinas totales del conejo.

Para hacer el ensayo inmunorradiométrico, el primer paso fue por un lado definir la concentración óptima de las gammaglobulinas a utilizar, y por el otro determinar tanto el acarreador y la concentración de DNP, como el amortiguador más adecuados para adherir el DNP a los pozos.

Se probaron 1, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , tanto de las gammaglobulinas normales (control negativo) como de la  $10^3$  inoculación del conejo (control positivo).

Se probaron además distintas concentraciones de DNP-lisina ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  M) y de DNP-hemocianina (1, 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ); ambas preparaciones en dos distintos amortiguadores: de boratos salino (SABS, ácido bórico 200 mM y cloruro de sodio 160 mM, pH 8) y de carbonatos (3:1 bicarbonato/carbonato, 100 mM, pH 9.5).

Utilizando lisina como acarreador, no se adhirió DNP a los pozos con ninguna de las concentraciones probadas y con ninguno de los dos amortiguadores. Por el contrario, el DNP acoplado a hemocianina se adhirió con todas las concentraciones utilizadas y suspendido en ambos amortiguadores; sin embargo, las lecturas fueron más estables con el amortiguador de carbonatos. La cantidad de anticuerpos pegados aumentó proporcionalmente a la concentración de gammaglobulinas utilizadas, independientemente de la concentración de DNP-hemocianina.

Decidimos entonces utilizar una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  de DNP-hemocianina (para asegurar saturación) en amortiguador de carbonatos y de 10  $\mu\text{g/mL}$  de gammaglobulinas (para asegurar una gran diferencia con las gammaglobulinas normales).

A cada uno de los pozos de la placa utilizada (*Immulon 2 Removawel strips*, Dynatech Laboratories Inc.) le agregamos 100  $\mu$ L del antígeno, lo dejamos a temperatura ambiente durante 4h y posteriormente toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente lavamos los pozos 5 veces con PBS-T 0.05%, bloqueamos sitios de pegado inespecífico con gelatina al 1% durante 40 minutos y volvimos a lavar 5 veces con PBS-T 0.05%. Hecho esto agregamos 100  $\mu$ L de las gammaglobulinas marcadas con  $I^{125}$  (controles o problema), determinamos en un contador de radiaciones gamma (*Gamma 5500*, Beckman) la radiactividad agregada en cada pozo, y las dejamos incubando durante 4h. Posteriormente lavamos 5 veces con PBS-T 0.05% y contamos nuevamente la radiactividad correspondiente a los anticuerpos pegados específicamente. De esta manera obtuvimos el porcentaje de anticuerpos anti-DNP en las inmunoglobulinas de cada uno de los grupos de conejos.

### **Iodinación.**

A 200 $\mu$ L de gammaglobulinas a una concentración de 5 mg/mL se les agregó 1 $\mu$ L de  $I^{125}$  (NEN) y una perla *Iodo-bead* (Calbiochem, Co.). Se dejaron reaccionando durante 15 minutos y para eliminar el yodo libre se pasaron posteriormente por columnas de 5 cm de largo de *Sephadex G-25 coarse* (Pharmacia) previamente equilibradas en SABS (Tuszynski, 1980).

Para definir si efectivamente se ha eliminado todo el yodo libre, medimos qué porcentaje de la radiactividad precipitaba con ácido

tricloroacético (TCA) al 10% (junto con las proteínas). Brevemente, hicimos lo siguiente: en un tubo con 4 mL de SABS agregamos 100  $\mu$ L de suero bovino y 1  $\mu$ L de las gammaglobulinas iodadas. Se tomaron 500  $\mu$ L de esta mezcla y se agregaron a 500  $\mu$ L de SABS (control) o de TCA al 20%; se incubaron durante 30 minutos a 4°C, se centrifugaron las muestras a 10 000 rpm durante un minuto, y se leyó el sobrenadante en un contador de radiaciones gamma. El porcentaje de precipitabilidad se obtuvo de la siguiente manera:

$$[(\text{cpm en SABS} - \text{cpm en TCA}) / \text{cpm en SABS}] \times 100$$

Se espera que el porcentaje de radiactividad precipitada sea superior al 90%, si esto no es así significa que todavía hay demasiado iodo libre; es necesario en ese caso pasar nuevamente la muestra por una columna de *Sephadex G-25*, hasta obtener una precipitación superior a esa cifra.

Hecho esto, se mide la radiactividad de cada una de las soluciones de gammaglobulinas iodadas así como la concentración de proteína, para determinar su actividad específica.

## Resultados

Ratones.

Cepa Balb/c.

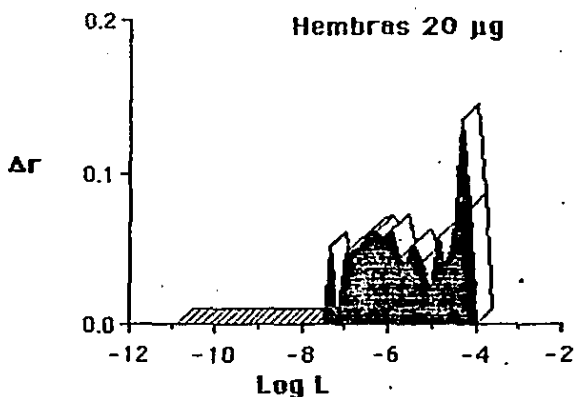
Estudio con anticuerpos puros.

Después de inocular en una sola ocasión, no pudimos detectar anticuerpos anti-DNP por el método de doble inmunodifusión, por lo que los sueros obtenidos de estos grupos no se estudiaron. Por otro lado, detectamos anticuerpos contra el hapteno en todos los grupos inoculados en 5 ocasiones, por lo que procedimos a obtener las gammaglobulinas de estos sueros. Purificamos los anticuerpos en columnas de afinidad y estudiamos su apagamiento de fluorescencia.

En todos los casos, los anticuerpos producto de la inoculación sin ACF presentaron un apagamiento indistinguible de los controles (gammaglobulinas normales). Así, los resultados presentados a continuación corresponden a cuatro grupos, todos inoculados con ACF y en 5 ocasiones: hembras y machos con 20  $\mu$ g y hembras y machos con 200  $\mu$ g.

En el caso de los anticuerpos de las hembras, al comparar el efecto de las dos dosis empleadas, encontramos tanto una mayor heterogeneidad como una mayor afinidad promedio al utilizar la mayor de ellas (200  $\mu\text{g}$ ) (ver tabla 2).

Con 20  $\mu\text{g}$  todos los anticuerpos poseen una constante de afinidad aparente por debajo de  $1 \times 10^8$  L/M, y pueden separarse claramente en dos grupos poblacionales, unos de baja ( $< 1 \times 10^5$  L/M) y otros de mediana (entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^8$  L/M) afinidades.

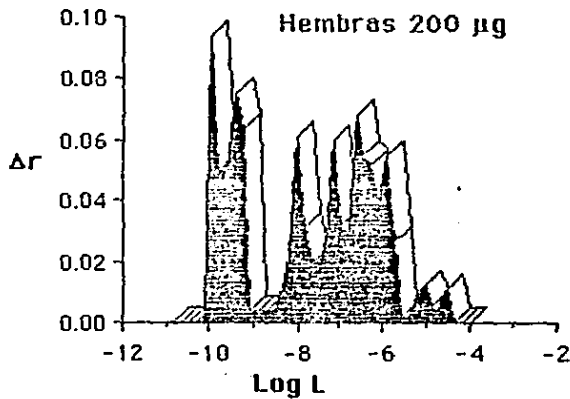


$\Delta r$  es el cambio en la fracción de sitios activos ocupados;  $\text{Log L}$  es el logaritmo de la concentración de hapteno libre.

En la gráfica de 200  $\mu\text{g}$  se pueden ver poblaciones de alta afinidad que no se observan con la otra dosis, y una mucho menor proporción de las poblaciones de más baja afinidad. Esto se refleja en un aumento en el rango de fijación (es decir en un aumento de heterogeneidad) y en un incremento de casi dos órdenes de magnitud en la afinidad promedio (ver

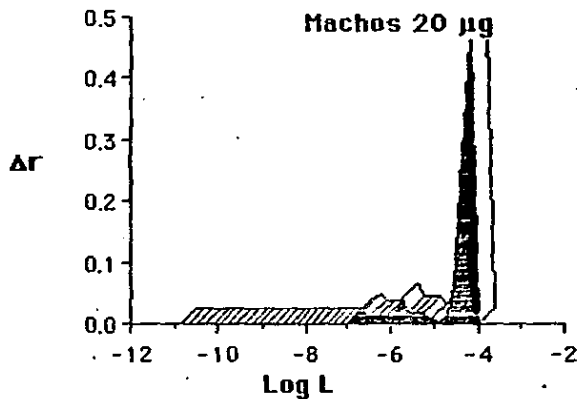


Tabla 2).

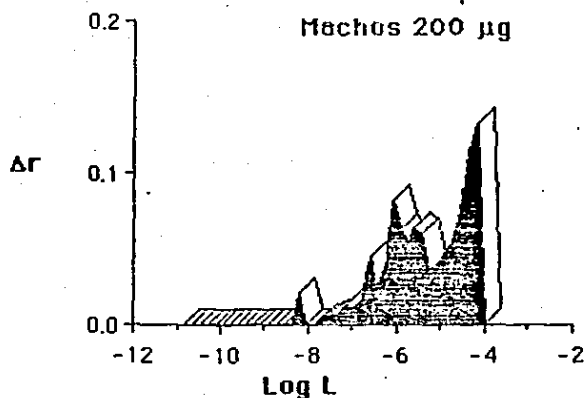


Nótese que el tamaño del eje de las ordenadas varía en algunas gráficas.

En el caso de los machos los efectos globales son similares, sin embargo, aquí con 20 µg es notable el predominio de los anticuerpos de muy baja afinidad ( $< 1 \times 10^5$  L/M).



Ya con 200  $\mu\text{g}$  aumenta la proporción de los anticuerpos de mediana afinidad y aparece una población con una afinidad de alrededor de  $1 \times 10^8$  L/M.



Con ninguna de las dos dosis el rango de Log L en el que se ocupan sitios activos es tan amplio como en la hembras y la diferencia en la afinidad promedio entre dosis es, en los machos, de sólo un orden de magnitud.

**TABLA 2. Afinidad Promedio de Ratonos Balb/c.  
Afinidad Promedio**

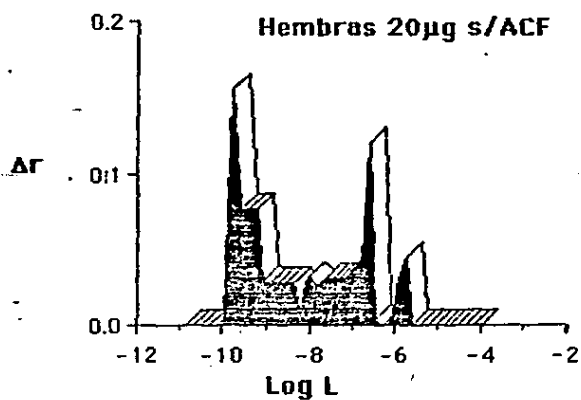
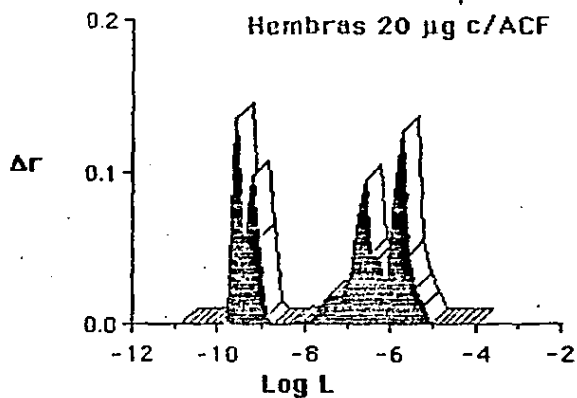
<b>Hembras</b>	
20 $\mu\text{g}$	$3.35 \times 10^5$
200 $\mu\text{g}$	$2.43 \times 10^7$
<b>Machos</b>	
20 $\mu\text{g}$	$2.34 \times 10^4$
200 $\mu\text{g}$	$2.24 \times 10^5$

Quisiera aquí recalcar un hallazgo: con ambas dosis estudiadas las hembras presentaron poblaciones de más alta afinidad que los machos, lo que dió lugar a una mayor heterogeneidad de afinidades y a una mayor afinidad promedio en las primeras.

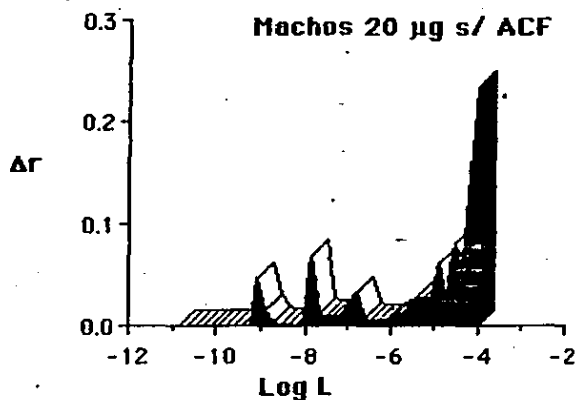
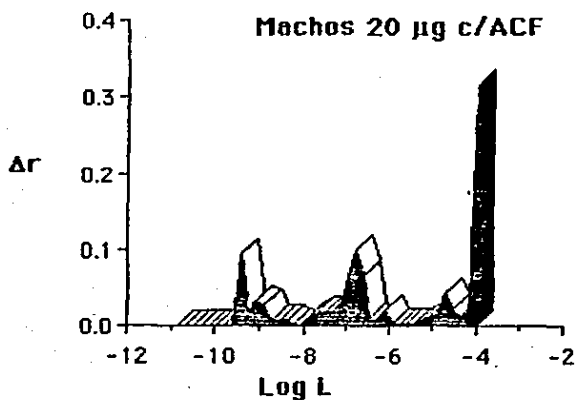
#### **Estudio con gammaglobulinas totales.**

Hasta aquí encontramos entonces que, de las cuatro variables estudiadas, sólo pudimos comparar dos: dosis y sexo. Decidimos entonces estudiar en la misma cepa de ratones las diferencias producidas por el ACF. Reinoculamos a nuevos grupos de ratones en 5 ocasiones tanto con como sin adyuvante, siguiendo el mismo protocolo. En esta ocasión no purificamos los anticuerpos, utilizamos gammaglobulinas totales (ver explicación en la discusión).

En hembras encontramos que con la dosis baja (20  $\mu\text{g}$ ), la distribución de afinidades es muy similar entre los grupos con y sin Adyuvante Completo de Freund:



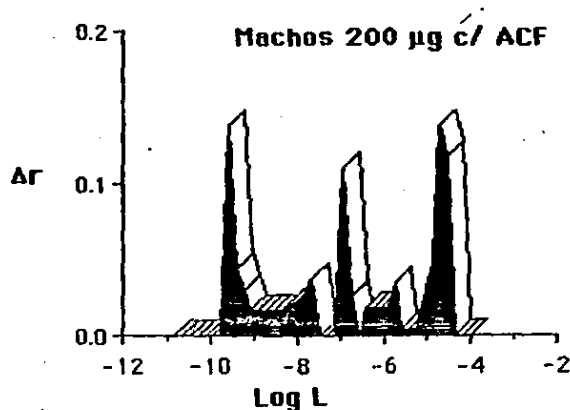
Esto lo observamos también en los machos:



Las diferencias en afinidad promedio observadas entre sexos al utilizar anticuerpos puros, se mantienen al emplear gammaglobulinas totales: en las hembras hay una mayor proporción de poblaciones con

afinidades alta y media. En este caso la heterogeneidad es mayor en machos debido a la presencia de poblaciones de muy baja afinidad que no encontramos en las hembras. Nótese por otro lado, que tanto en hembras como en machos se observan un mayor número de poblaciones de anticuerpos que en las distribuciones obtenidas con anticuerpos puros (figuras superiores páginas 13 y 14), principalmente hacia el extremo izquierdo (mayor afinidad) del eje de las abscisas. Esto probablemente se debe a que durante el proceso de purificación perdemos poblaciones de alta afinidad.

Al trabajar con las gammaglobulinas obtenidas con la dosis alta del antígeno (200  $\mu\text{g}$ ), obtuvimos resultados ambiguos y no reproducibles en ambos grupos de hembras y en uno de machos. El único grupo de esta dosis en el que encontramos resultados constantes fue el de machos con ACF.



Como en el caso de los anticuerpos puros, en este grupo en donde se estudiaron gammaglobulinas totales obtenidas con la dosis alta, se observa una mayor proporción de anticuerpos de afinidades alta y media que en su grupo homólogo de dosis baja. En este histograma es también clara la presencia de poblaciones de anticuerpos de mayor afinidad y un mayor rango de fijación que en aquel obtenido en las mismas condiciones de inoculación pero con anticuerpos puros.

**Cepa C57Bl/6.**

Estudiamos las mismas variables en otra cepa de ratones (C57Bl/6) para conocer si los hallazgos (diferencias en el perfil de afinidades entre hembras y machos, mayor afinidad con 200  $\mu\text{g}$  que con 20  $\mu\text{g}$  y también con ACF que sin ACF) pudiesen ser un fenómeno general. Dado que en ratones Balb/c no habíamos encontrado anticuerpos anti-DNP después de una inoculación, decidimos estudiar el efecto del número de inoculaciones con 5 y 7. En esta cepa utilizamos para todos los experimentos gammaglobulinas totales.

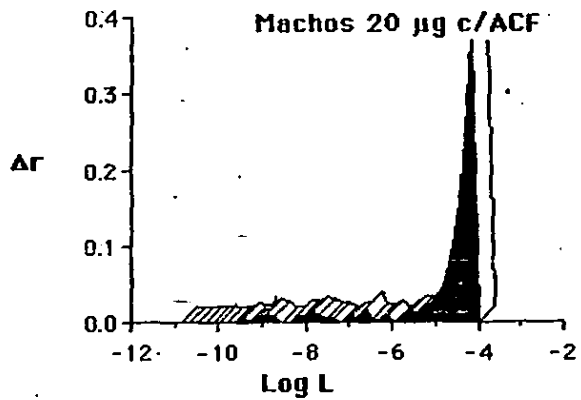
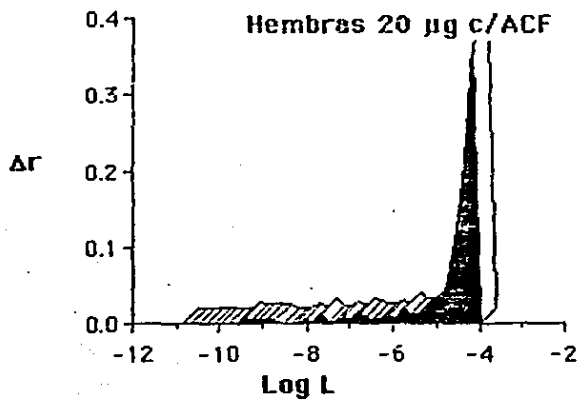
Esta cepa resultó ser más sensible al antígeno y murieron casi todos los ratones inoculados con la dosis de 200  $\mu\text{g}$  (ver discusión para una posible explicación); trabajamos por lo tanto con cantidades muy pequeñas de suero.

**Después de 5 inoculaciones.**

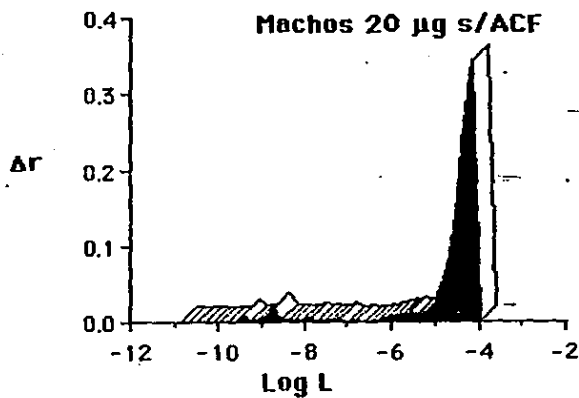
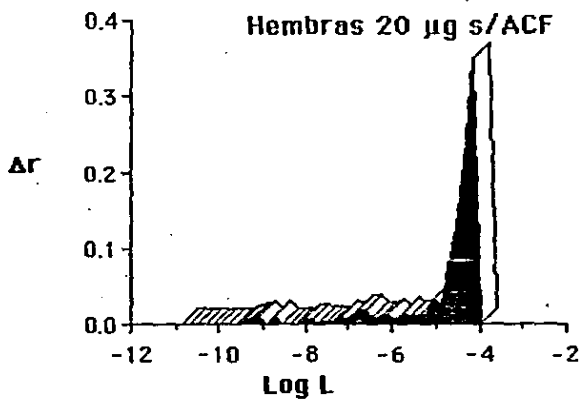
En los ratones C57Bl/6 observamos que tanto en hembras como en machos en presencia de ACF y con 20  $\mu\text{g}$ , predominan las clones de muy baja afinidad. En este caso no encontramos diferencias entre los sexos.



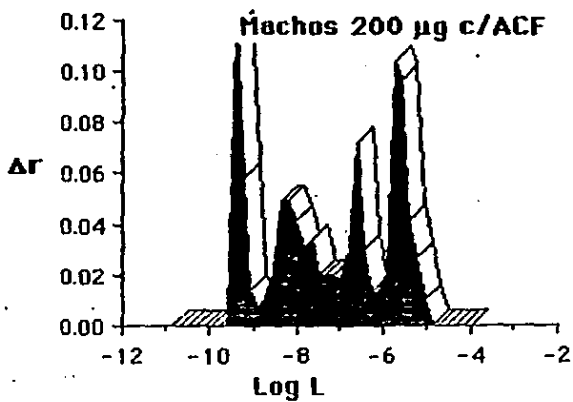
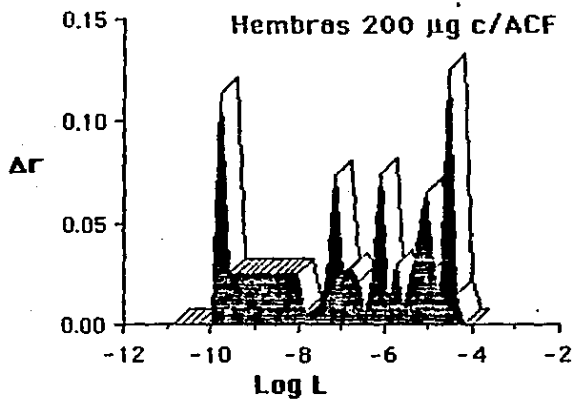
Esto se aprecia en los siguientes histogramas:



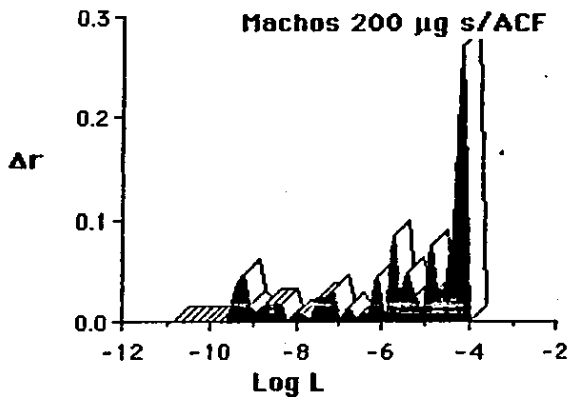
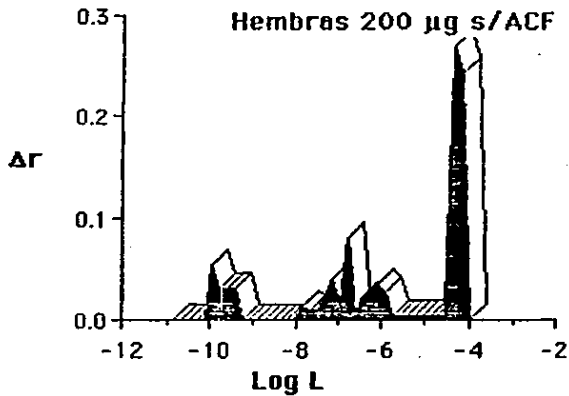
Con esta misma dosis, las distribuciones de los grupos en los que no se utilizó ACF son muy similares a las anteriores:



Como se ve en las siguientes figuras, con 200  $\mu\text{g}$  aumenta notablemente la proporción de anticuerpos de mediana y alta afinidad, lo que resulta en una mayor afinidad promedio.



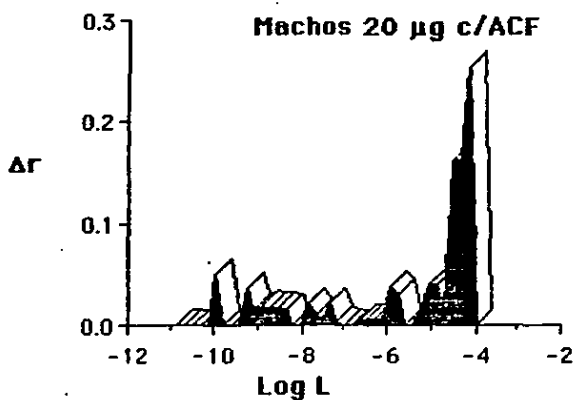
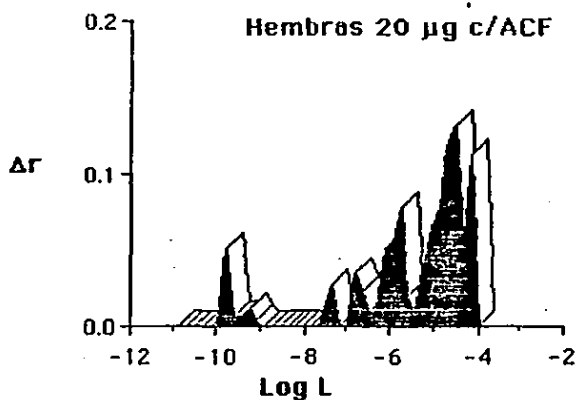
Con esta dosis si es notorio que con el adyuvante la proporción de anticuerpos de alta afinidad -y por tanto la afinidad promedio- es mayor que sin él.



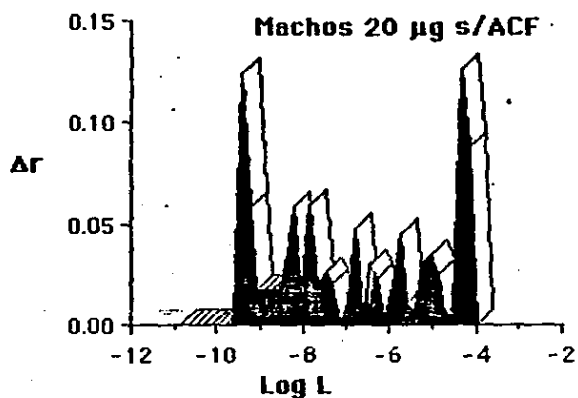
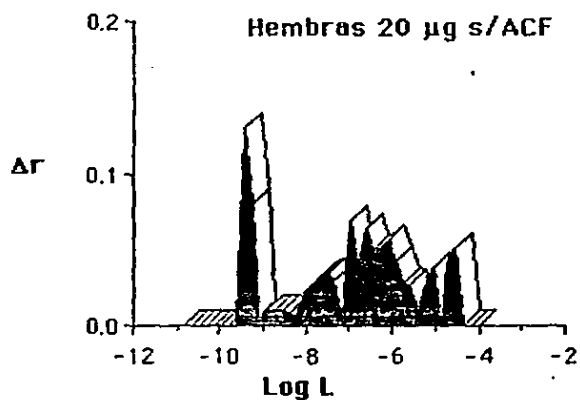
El rango de fijación es muy similar en todos los casos y nuevamente, a diferencia de lo hallado en ratones Balb/c, las diferencias entre hembras y machos no parecen ser importantes.

**Después de 7 inoculaciones.**

Al inocular en 7 ocasiones con ACF, las diferencias entre dosis no son ya tan notorias. Con 20  $\mu\text{g}$  empiezan a aumentar los anticuerpos de alta afinidad, y en las hembras los de mediana afinidad alcanzan ya una proporción significativa.

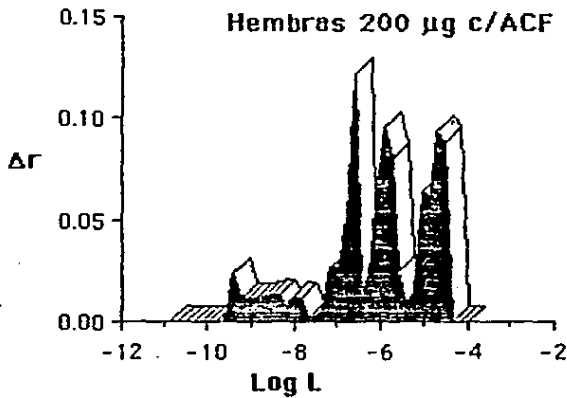


Nótese cómo en ausencia de adyuvante la proporción de anticuerpos de alta y mediana afinidades es mayor, en ambos sexos, que en presencia del mismo.

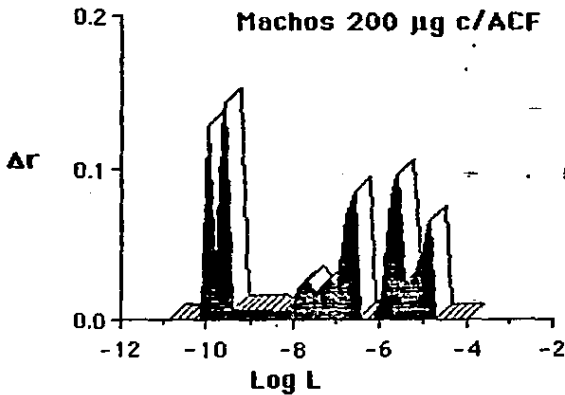


De hecho, no se ve mucha diferencia con respecto a los grupos de 200  $\mu$ g sin adyuvante (ver figuras de la página 35).

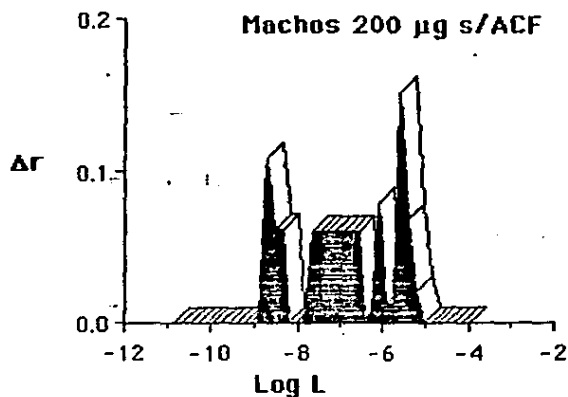
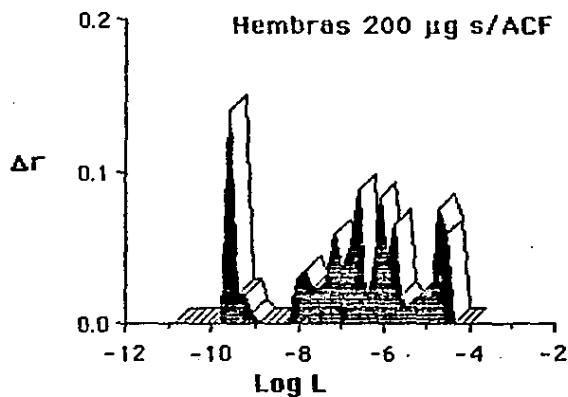
En las hembras del grupo de 200  $\mu\text{g}$  con ACF, encontramos una proporción muy baja de anticuerpos de alta afinidad. Esto fue un resultado totalmente inesperado.



En los machos, a pesar de que en la siguiente gráfica se observa una mayor proporción de anticuerpos de alta afinidad que con 5 inoculaciones, la diferencia entre ambas distribuciones no es muy grande (ver figura inferior página 30).



Con 200  $\mu\text{g}$  sin ACF, a diferencia de lo que observamos con ACF, encontramos un gran aumento en la proporción de anticuerpos de alta afinidad con respecto a los ratones inoculados 5 veces. La distribución de afinidades de cada uno de estos dos grupos semeja a la correspondiente de los de 5 inoculaciones con ACF y la misma dosis.





El papel del ACF es difícil de valorar en estos grupos debido al hallazgo inesperado en el grupo de las hembras inoculadas con 200  $\mu\text{g}$  y ACF.

En los grupos de hembras con adyuvante, la diferencia en distribución de afinidades entre ambas dosis no fue la esperada debido a la sorprendente ausencia de anticuerpos de alta afinidad en el grupo de 200  $\mu\text{g}$ . Con los machos se repitió el fenómeno observado con anterioridad: predominio de anticuerpos de baja afinidad al inocular con 20  $\mu\text{g}$ , y predominio de los de mediana y alta afinidad al hacerlo con 200  $\mu\text{g}$ .

En el caso de los ratones hembras inoculados sin ACF, no se observan diferencias importantes entre ambas dosis. En machos encontramos una mucho menor heterogeneidad con 200  $\mu\text{g}$  que con 20  $\mu\text{g}$ , y sin embargo la distribución de afinidades es similar.

## **Conejo.**

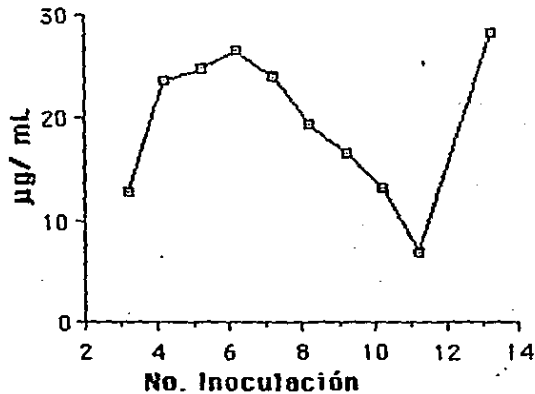
En el conejo estudiamos por un lado las modificaciones en la distribución de afinidades a medida que íbamos aumentando el número de estímulos, y por el otro sus variaciones diarias después de un nuevo reto en estado de hiperinmunización.

El conejo empezó a producir anticuerpos detectables por doble inmunodifusión después de la tercera inoculación con 500  $\mu$ g de DNP<sub>13</sub>BSA.

## **Estudio de la respuesta a inoculaciones cada dos semanas.**

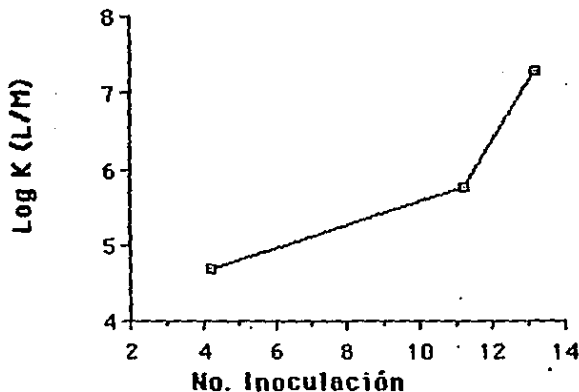
El título de anticuerpos del conejo fue aumentando después de las primeras inoculaciones, llegó a un máximo después de la sexta y empezó entonces a disminuir a medida que seguíamos estimulando al animal.

Después de dejarlo reposar durante 7 meses (ver más adelante), un nuevo estímulo (13ª inoculación) renovó su capacidad de producir altos títulos de anticuerpos:

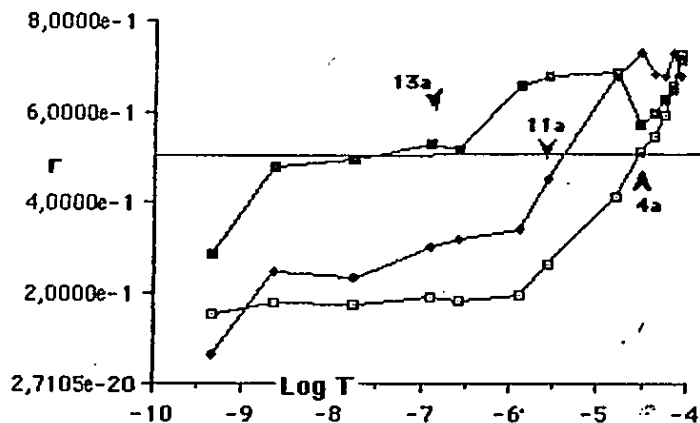


µg/mL se refiere a la concentración de anticuerpos en una solución de gammaglobulinas a 1 mg/mL.

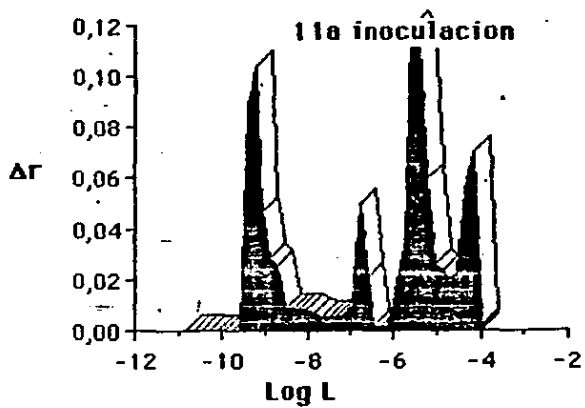
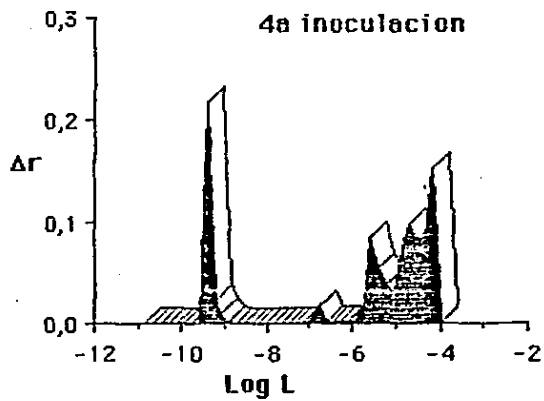
A diferencia de lo ocurrido con el título de anticuerpos, la afinidad promedio (K) aumentó paulatinamente después de cada inoculación, y no disminuyó mientras se continuó estimulando:



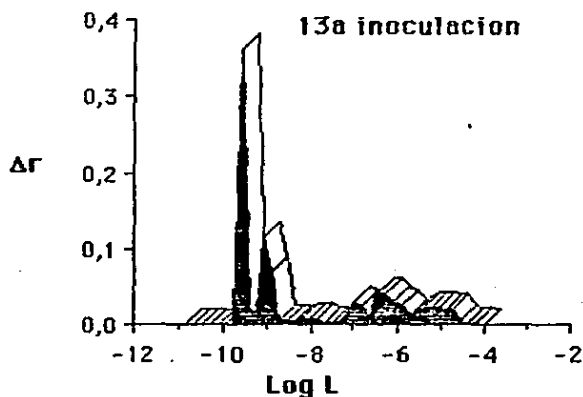
Este fenómeno puede observarse claramente en la siguiente figura en donde se ve que a medida que aumenta el número de inoculaciones hay una mayor proporción de sitios activos ocupados ( $r$ ) a menor concentración de antígeno en la solución (Log T: logaritmo de la concentración de hapteno en la solución).



En los histogramas siguientes se observa que el aumento de la afinidad promedio se debe principalmente al aumento en la proporción de clonas de mediana y alta afinidades. Es decir, a medida que aumenta el número de inoculaciones aumenta el área de la mitad izquierda de la gráfica (ver también la tabla 3).



La siguiente gráfica se obtuvo 7 días después de una inoculación que siguió a 7 meses sin estímulo antigénico.



Un hallazgo que se repite durante todo el estudio es que aún después de varias inoculaciones, persiste cierta proporción de anticuerpos de baja afinidad.

**TABLA 3.**  
**Porcentaje de Anticuerpos por Orden de Magnitud en Afinidad.**  
**Estudio Cada Dos Semanas.**

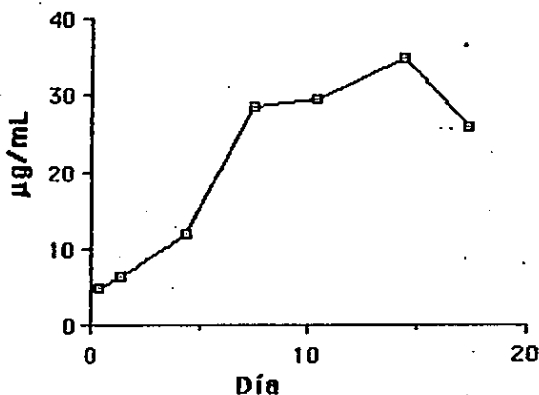
	Afinidad,(L/M)						
	$\geq 10^{10}$	$\geq 10^9$	$\geq 10^8$	$\geq 10^7$	$\geq 10^6$	$\geq 10^5$	$\geq 10^4$
4ª inoc.	-	24.88	0.30	0.39	2.95	24.87	46.61
			(25.18)	(25.57)	(28.52)	(53.39)	(100)
11ª inoc.	-	24.98	7.71	3.54	8.77	36.44	18.55
			(32.69)	(36.23)	(45.00)	(81.44)	(100)
13ª inoc.	-	54.29	7.60	5.20	16.76	11.92	4.22
			(61.89)	(67.09)	(83.85)	(95.77)	(100)

Los números indican el porcentaje de anticuerpos encontrados por cada orden de magnitud en afinidad. Los números en paréntesis indican el porcentaje acumulado.

### Estudio de la variación diaria de la respuesta en estado de hiperinmunización.

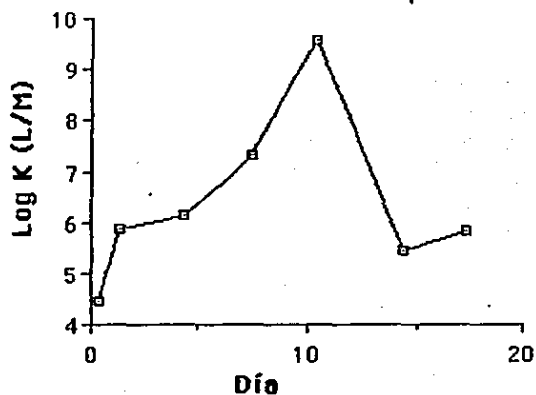
Después de inocular al conejo 12 veces (1 cada 2 semanas), lo dejamos reposar durante 7 meses. Posteriormente lo inoculamos una décimotercera vez para conocer la evolución de la respuesta en un estado de hiperinmunización. Al inocular por última vez, seguimos el desarrollo de la respuesta en los días subsiguientes.

El título de los anticuerpos aumentó día con día hasta llegar a un máximo alrededor del día 14, para después empezar a disminuir rápidamente por unos días y estabilizarse después del 17.



µg/mL se refiere a la concentración de anticuerpos en una solución de gammaglobulinas a 1mg/mL.

En este caso la afinidad promedio aumentó diariamente, alcanzó un máximo alrededor del día 10 y después disminuyó para estabilizarse en los días posteriores.

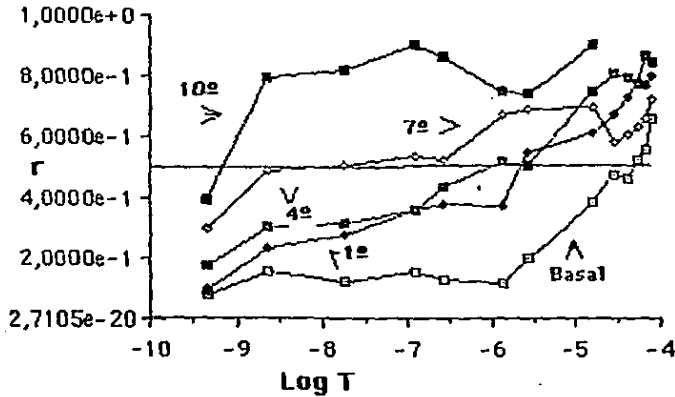


Nuevamente, el fenómeno puede observarse con claridad al graficar la ocupación de sitios activos de los anticuerpos en función de la concentración de hapteno en la solución.



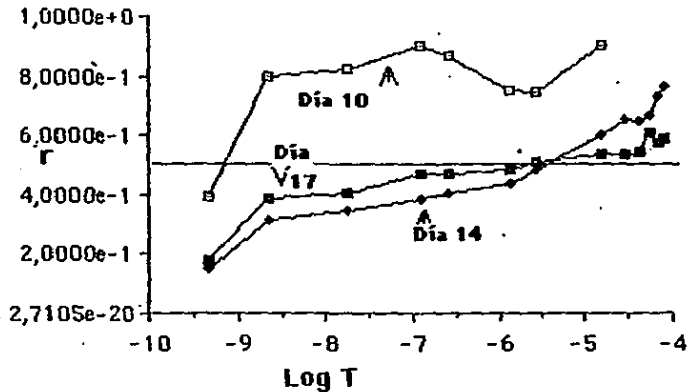
En la primera de ellas se encuentran los datos hasta el día 10

(afinidad en ascenso):



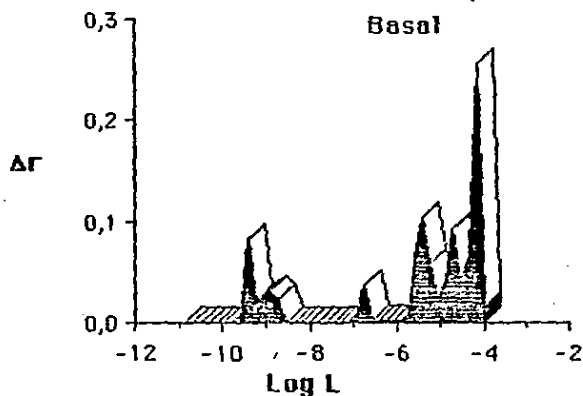
En la segunda graficamos nuevamente los datos del 10º día y además

los subsiguientes (descenso y estabilización de la afinidad):

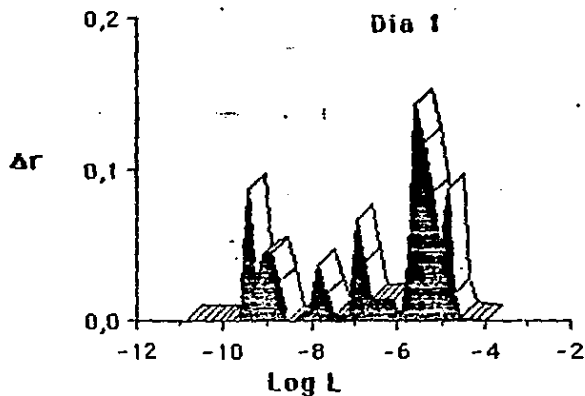


El aumento en la afinidad promedio se debió, como en los puntos anteriores, a un aumento en la proporción de anticuerpos de alta afinidad.

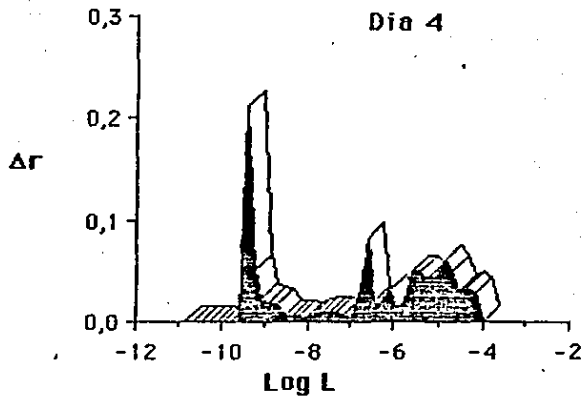
Nótese cómo aún después de 7 meses sin estímulo es posible detectar anticuerpos anti-DNP (aunque a títulos muy bajos) en el conejo (ver también la tabla); la mayoría de ellos tiene una afinidad baja.



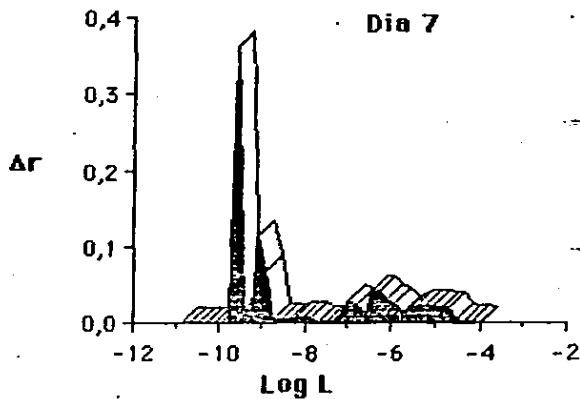
Ya desde el primer día posterior al nuevo reto la distribución de afinidades es distinta; persiste sin embargo el predominio de las clones de baja afinidad y el título de anticuerpos es aún bajo.



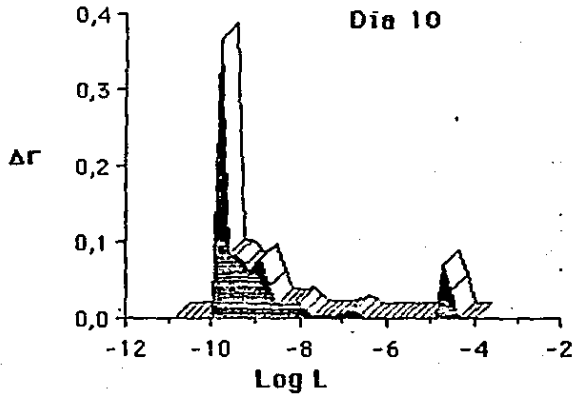
A partir del cuarto día el aumento en la proporción de anticuerpos de afinidades cada vez mayores es notorio.



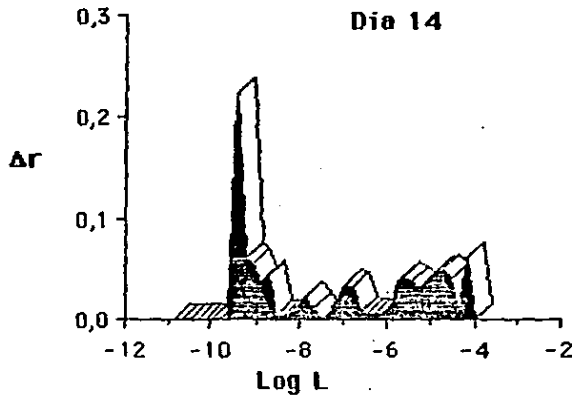
El séptimo día estos son ya francamente mayoritarios.

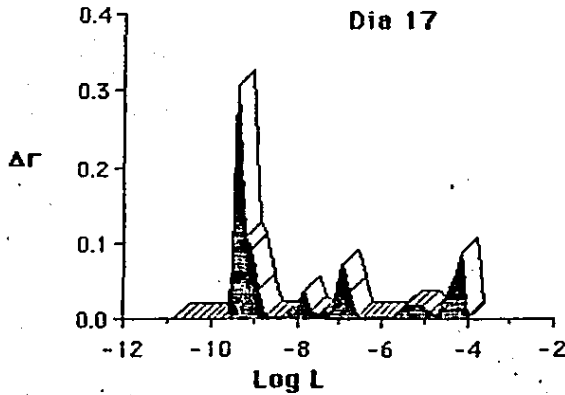


Y llegan a su máximo alrededor del día 10.



A partir del día 14 observamos nuevamente una disminución paulatina de los anticuerpos de alta afinidad.





Es notorio que a pesar de que se observan modificaciones en el patrón de distribución a todo lo largo del rango detectado, los principales cambios y movimientos se dan en los extremos del mismo. Hay incluso zonas del histograma, principalmente en el centro del mismo, que prácticamente no sufren modificaciones durante la evolución de la respuesta estudiada. (Ver también la tabla 4).

**TABLA 4.**  
**Porcentaje de Anticuerpos por Orden de Magnitud en Afinidad.**  
**Estudio en Hiperinmunización.**

	Afinidad (L/M)						
	$\geq 10^{10}$	$\geq 10^9$	$\geq 10^8$	$\geq 10^7$	$\geq 10^6$	$\geq 10^5$	$\geq 10^4$
Basal	-	13.93	4.35	0.51	4.59	26.71	49.91
			(18.28)	(18.79)	(23.38)	(50.09)	(100)
Día 1	-	17.20	6.89	12.00	9.94	45.70	8.25
			(24.09)	(36.09)	(46.03)	(91.73)	(100)
Día 4	-	29.57	5.07	4.78	19.07	22.78	18.73
			(34.64)	(39.42)	(58.49)	(81.27)	(100)
Día 7	-	54.29	7.60	5.20	16.76	11.92	4.22
			(61.89)	(67.09)	(83.85)	(95.77)	(100)
Día 10	-	69.29	16.10	2.59	1.61	0.11	10.29
			(85.39)	(87.98)	(89.59)	(89.70)	(100)
Día 14	-	35.57	8.98	8.55	7.06	20.73	19.11
			(44.55)	(53.10)	(60.16)	(80.89)	(100)
Día 17	-	52.13	4.72	12.83	5.84	6.79	17.70
			(56.85)	(69.68)	(75.52)	(82.31)	(100)

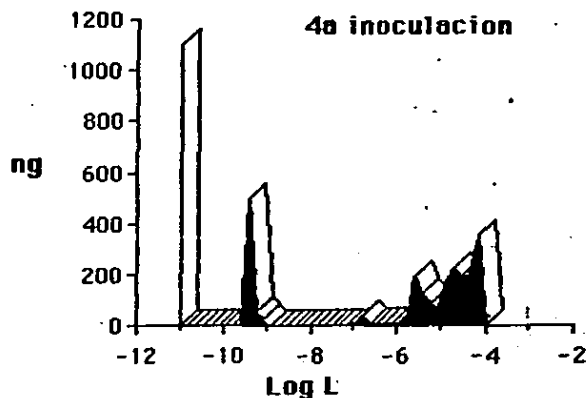
Los números indican el porcentaje de anticuerpos encontrados por cada orden de magnitud en afinidad. Los números en paréntesis indican el porcentaje acumulado.

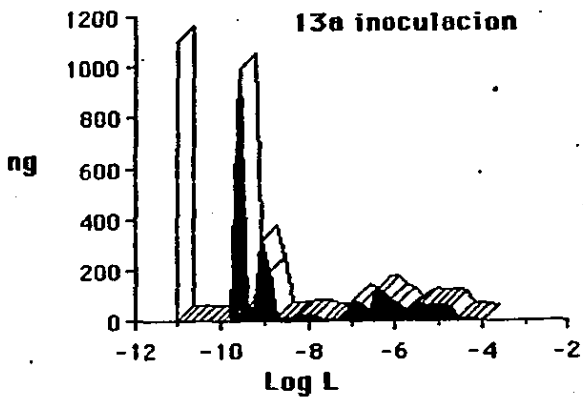
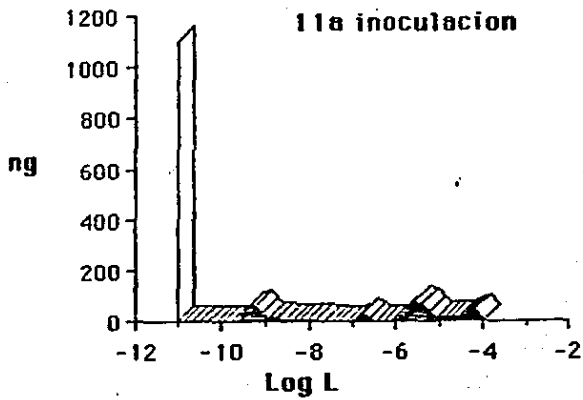
### Histogramas con cantidades totales de anticuerpos.

Todos los histogramas descritos anteriormente, fueron elaborados graficando el cambio en la proporción de sitios activos ocupados en función de la concentración de hapteno libre en la solución. Con el fin de poder comparar no sólo cómo cambian las proporciones de las diferentes poblaciones de anticuerpos, sino también cómo se modifica la cantidad de cada una de ellas, determinamos -utilizando un ensayo inmunoradiométrico- la cantidad de anticuerpos anti-DNP en las

inmunoglobulinas de cada uno de los tiempos en que fue estudiada la respuesta del conejo. A continuación se exponen nuevamente las gráficas correspondientes, esta vez modificadas de acuerdo a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en cada uno de los tiempos. (La barra blanca de la izquierda de todos estos histogramas es un artefacto que fue necesario introducir para mantener idéntico el rango en el eje de las ordenadas).

**Cada dos semanas.**

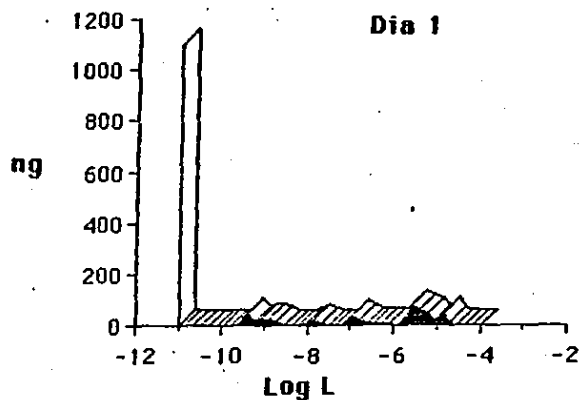
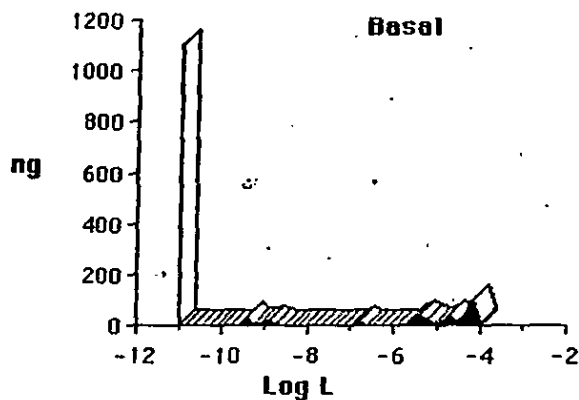


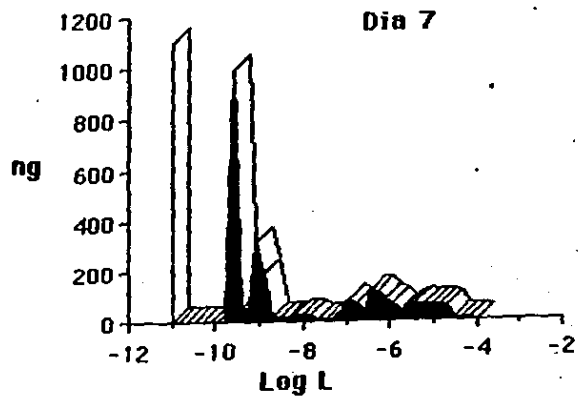
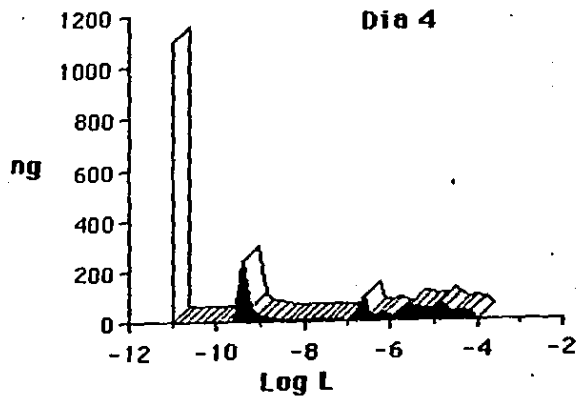


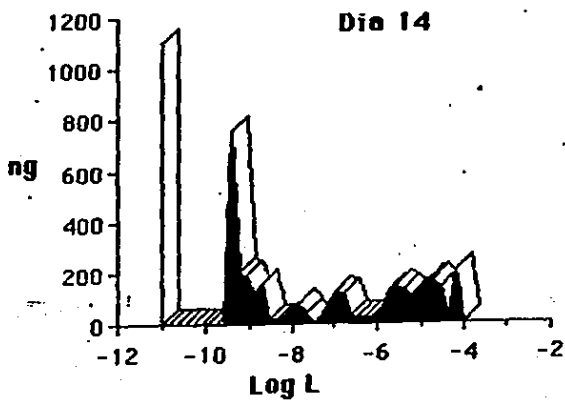
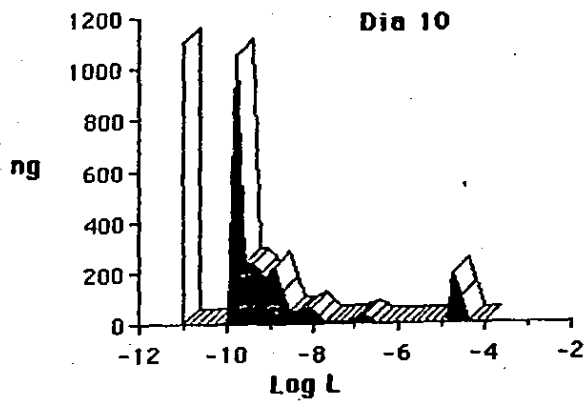


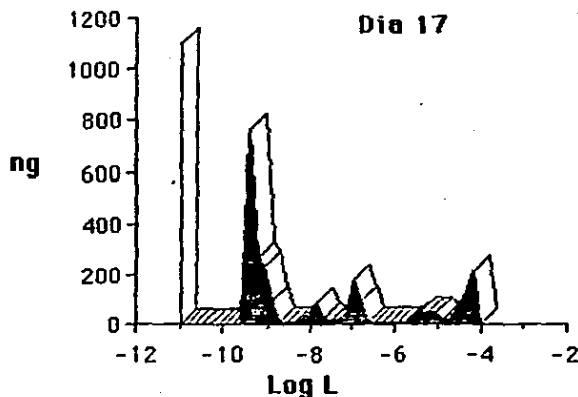
**En hiperinmunización.**

En las siguientes figuras se puede observar como la cantidad de anticuerpos detectados en el estado basal después de 7 meses de reposo del conejo es mínima (ver también la tabla 5), y va aumentando rápidamente hasta llegar a un máximo el día 10 después del estímulo.









En la siguiente tabla se muestra la cantidad de anticuerpos anti-DNP encontrados por cada 100  $\mu$ g de inmunoglobulinas totales, de los días que se estudiaron del conejo en estado de hiperinmunización.

**TABLA 5.**  
**Cantidad de Anticuerpos (ng) por Orden de Magnitud en**  
**Afinidad.**  
**Estudio en Hiperinmunización.**

	Afinidad (L/M)						
	$\geq 10^{10}$	$\geq 10^9$	$\geq 10^8$	$\geq 10^7$	$\geq 10^6$	$\geq 10^5$	$\geq 10^4$
Basal	-	52.93	16.53	1.95	17.45	101.50	189.68
			(69.46)	(71.41)	(88.86)	(190.36)	(380)
Día 1	-	92.88	37.23	64.83	53.70	246.78	44.55
			(130.11)	(194.94)	(248.64)	(495.42)	(540)
Día 4	-	325.28	55.73	52.63	209.78	250.55	206.08
			(381.01)	(433.64)	(643.42)	(893.97)	(1100)
Día 7	-	1492.93	209.03	143.05	460.95	327.93	116.15
			(1701.96)	(1845.01)	(2305.96)	(2633.89)	(2750)
Día 10	-	1981.83	460.33	74.05	46.18	3.28	294.38
			(2442.16)	(2516.21)	(2562.39)	(2565.67)	(2860)
Día 14	-	1205.93	304.35	289.80	239.30	702.73	647.85
			(1510.28)	(1800.08)	(2039.38)	(2742.11)	(3390)
Día 17	-	1298.10	117.43	319.35	145.40	169.13	440.70
			(1415.53)	(1734.88)	(1880.28)	(2049.41)	(2490)

Los números indican la cantidad de anticuerpos (en ng) encontrados por cada orden de magnitud en afinidad. Los números en paréntesis indican la cantidad acumulada.

Nótese como a partir del cuarto día la cantidad de anticuerpos casi se ha triplicado con respecto a la del basal, pero los anticuerpos de más alta afinidad (marcados como  $\geq 10^9$ ) se han sextuplicado. Para el día 7, hay 28 veces más anticuerpos de la más alta afinidad que en el basal y sin embargo la cantidad total de anticuerpos sólo ha crecido 7 veces. El aumento proporcional de anticuerpos de alta afinidad alcanza su máximo el día 10: hay 37 veces lo que en el basal, contra 7.5 veces en lo que se refiere a cantidad total de anticuerpos. Por el contrario, para el día 14 la cantidad de anticuerpos de alta afinidad ha disminuido y la del total de anticuerpos es mayor; este fenómeno se revierte entre los días 14 y 17.

## Discusión.

Este trabajo marca el inicio de estudios sobre las diferencias en el perfil de afinidades de anticuerpos específicos producidos por distintas cepas de ratones y su relación con diversos aspectos inmunológicos, entre los que nos interesan particularmente las enfermedades autoinmunes.

Si bien aún no se estudió una cepa propensa a desarrollar patología autoinmune, entre las dos cepas estudiadas encontramos diferencias en la respuesta al DNP. Por ejemplo, después de 5 inoculaciones en la cepa Balb/c observamos diferencias grandes en la respuesta de machos y hembras. Las hembras desarrollaron una importante proporción de anticuerpos de mediana y alta afinidades -independientemente de la utilización de ACF- mientras que en los machos predominaron los clones de baja afinidad. Por otro lado, en la cepa C57Bl/6 después de 5 estímulos las distribuciones de afinidades de todos los grupos inoculados con 20 µg fueron similares a las de los machos Balb/c, aunque sin las pequeñas proporciones de anticuerpos de mediana y alta afinidad, y fueron necesarias 7 inoculaciones para encontrar diferencias entre sexos. Estas diferencias fueron más sutiles que en Balb/c pero en el mismo sentido (mayor afinidad en las hembras).

Las diferencias en afinidades que nosotros encontramos entre sexos y entre cepas correlacionan con diferencias en la susceptibilidad de los ratones Balb/c y C57Bl/6 a la infestación peritoneal por cisticerco de

*Taenia crassiceps* (Sciutto et al., 1987a). Los ratones C57Bl/6 son más resistentes a este parásito, e incluso las hembras Balb/c son todavía más susceptibles que los machos de la misma cepa. Los autores han encontrado un mayor título de anticuerpos a medida que aumenta el número de parásitos. Es decir, los anticuerpos no parecen tener un papel importante en el rechazo al cisticerco; sin embargo, los grupos que ellos encuentran resistentes son los mismos que en nuestro estudio producen anticuerpos de baja afinidad. Si esto se repitiera con los anticuerpos elaborados en respuesta al parásito, probablemente significaría que aquellos de alta afinidad funcionan como protectores en contra de la acción de las células del sistema inmune.

Valdría la pena estudiar la distribución de afinidades en cepas autoinmunes dado que nuestro sistema de análisis detectó diferencias entre hembras y machos, tal vez triviales, sin embargo es bien conocida la distinta susceptibilidad entre los sexos a diversas enfermedades en varias especies animales, fundamentalmente en lo que se refiere a patología autoinmune (Ahmed et al., 1985).

Uno de los hallazgos fundamentales para la proposición de la Teoría de Selección Clonal (Burnet, 1959; Siskind & Benacerraf, 1969) fue el hallazgo de que la afinidad promedio de los anticuerpos producidos en contra de un antígeno aumenta a medida que pasa el tiempo después de un primer contacto con este. Esta maduración de la afinidad es mayor a

medida que la dosis del antígeno es menor (Siskind et al., 1968). De acuerdo con esta teoría tanto el efecto de la dosis como el aumento mismo de la afinidad promedio de los anticuerpos, podría explicarse de la siguiente manera: si el antígeno se encuentra a concentraciones suficientemente altas, estimula a células de un amplio rango de afinidades; a medida que la concentración del antígeno disminuye, se da una presión selectiva para la producción de anticuerpos de afinidad cada vez mayor, es decir, aquellas células con receptores de la más alta afinidad fijan preferencialmente el antígeno (Siskind & Benacerraf, 1969).

Nosotros observamos en ambas cepas de ratones una mayor proporción de anticuerpos de alta afinidad al inocular a los ratones con la dosis alta que al hacerlo con la baja. No son estos hallazgos contradictorios con la teoría de selección clonal los mismos autores en su trabajo original encontraron que dosis inferiores a una óptima daban lugar a un menor título de anticuerpos y también a una menor maduración de la afinidad (Siskind et al., 1968). Podemos entonces suponer que con 20 µg nos encontramos por debajo de la dosis óptima. En este caso en la selección de células que han de proliferar y diferenciarse, seguramente intervienen también factores estadísticos. Es decir, las células que se fijan al antígeno no necesariamente son aquellas con receptores de la más alta afinidad sino tal vez las que se encuentren en mayores cantidades en el lugar en donde se da la interacción. Esto se debe a que difícilmente con concentraciones muy pequeñas de antígeno se llega a un estado de



equilibrio. La selección entonces podría darse en función de la probabilidad y la frecuencia de encuentros.

Bajo esta consideración podríamos pensar que los histogramas que obtenemos con 20  $\mu$ g en casi todos los casos de 5 inoculaciones, pudieran estar reflejando una distribución de afinidades inicial de las clones capaces de producir anticuerpos anti-DNP. Es decir, que esta dosis estimularía constantemente (aunque no necesariamente de manera exclusiva) a aquellas células que fuesen más abundantes y que por lo tanto su probabilidad de encuentro con el antígeno -en condiciones en donde no se alcanza el equilibrio- sería más alta. Nuestros datos indicarían que esta probabilidad de encuentro es más alta con células poseedoras de receptores de baja afinidad que son mucho más abundantes. Esto coincide con los hallazgos de Ortega, E. y cols. (1984) y con las predicciones teóricas de Inman (1978).

El hecho de que después de 7 inoculaciones ya existan anticuerpos de alta afinidad en los ratones retados con 20  $\mu$ g, podría explicarse tanto por la acumulación de células de mayor afinidad que pudieron haber sido estimuladas desde un principio (aunque en pequeña escala) como por la probabilidad de que las mutaciones somáticas generadas después del contacto con el antígeno (Griffiths et al., 1984), hayan ya dado lugar a anticuerpos de mayor afinidad.

Un hallazgo notable que seguramente tiene relación con el anterior es que

en casi todos los grupos estudiados encontramos poblaciones de anticuerpos de baja afinidad, a pesar de que observamos maduración de la misma. Ya en 1972, Werblin y Siskind (1972) habían descrito un hallazgo similar.

Los estudios en conejos proporcionaron datos que contribuyen a aclarar este punto. La tabla correspondiente al estudio hecho cada dos semanas nos muestra que los anticuerpos de afinidad menor a  $1 \times 10^5$  L/M pasan de representar cerca del 50% del total en la cuarta inoculación a ser alrededor del 20% en la decimoprimerá. En ambos casos los anticuerpos de afinidad superior a  $1 \times 10^9$  L/M corresponden al 25% del total. ¿Por qué aún después de 11 inoculaciones hay todavía una proporción importante de anticuerpos de baja afinidad?. Después de 7 meses sin estímulo antigénico el conejo se volvió a retar con DNP<sub>13</sub>BSA (décimotercera inoculación). Las proporciones de anticuerpos cambiaron notablemente: los de afinidad menor a  $1 \times 10^5$  L/M fueron únicamente de alrededor del 4% y aquellos de más de  $1 \times 10^9$  L/M se acercaron al 55%. Sin embargo, 3 días después los anticuerpos de baja afinidad representaron el 10% y 4 días más adelante fueron ya nuevamente cerca del 20%. Si analizamos el patrón de crecimiento de las poblaciones de más alta y más baja afinidades, encontramos que son distintos: los primeros registran su mayor aumento entre los días 4 y 7, mientras que los segundos lo tienen entre el día 10 y el 14. Esto sugiere que los anticuerpos de baja afinidad podrían estar

producidos, al menos en parte, por clonas recientemente estimuladas. En un trabajo reciente Berek y cols. (1987) encontraron también que además de las células productoras de anticuerpos de alta afinidad, existen clonas productoras de anticuerpos de baja afinidad durante toda la respuesta estudiada por ellos (primaria, secundaria y terciaria). Indican incluso que los anticuerpos de baja afinidad de la respuesta terciaria tienen otra característica que los hace similares a los de la respuesta primaria: una alta proporción de ellos son de clase IgM.

Los datos anteriores parecen indicar que las células que producen los anticuerpos encontrados en la respuesta a un antígeno, tienen al menos dos orígenes relativamente independientes. Por un lado, las poblaciones de anticuerpos de alta afinidad pueden ser producto de la selección tanto de células presentes en el repertorio inicial como de mutantes somáticas de alta afinidad. Por otro lado, las poblaciones de menor afinidad podrían proceder del constante reclutamiento de nuevas células. No podemos descartar tampoco que a estas poblaciones contribuyan anticuerpos anti-anti-idiotipos, esto es, el anticuerpo 3 de la red idiotipo-antiidiotipo (Jerne, 1974).

En resumen, la selección de anticuerpos de alta afinidad parece ser sólo una parte de la evolución global de la respuesta humoral. La distribución de afinidades encontrada en determinado momento refleja hechos mucho más complejos. Necesariamente influyen además factores como: repertorio y

número de células totales con las que puede reaccionar el antígeno, maduración constante de células B potencialmente capaces de reaccionar con el antígeno, número de receptores por célula, velocidad de respuesta, senescencia de clones ya produciendo anticuerpos, reacciones cruzadas, etc. Sobre estos factores actúan a su vez las condiciones de inoculación, número de ellas, tiempo transcurrido entre éstas, vía de inoculación, etc.

La constante aparición de células capaces de reaccionar con un antígeno podría dar al organismo la posibilidad de probar constantemente nuevas alternativas de respuesta. Así mismo, los anticuerpos de baja afinidad podrían tener un papel regulador. A este respecto, Goidl y colaboradores (1983) han encontrado una distribución homogénea y de muy alta afinidad en ratones que tienden a desarrollar enfermedades autoinmunes. Una posible explicación a este fenómeno lo encontramos en un artículo de Steward y cols. (1986), en el que se describe que los ratones NZB y NZB/W  $F_1$  producen altos niveles de anticuerpos timocitotóxicos, con acción preferencial sobre los T supresores. Los autores concluyen que es posible que la pérdida temprana de células T supresoras en estos ratones pueda llevar a una falla en los mecanismos reguladores normales que actúan sobre la maduración de la afinidad.

En nuestro trabajo encontramos una tendencia a una distribución común.

de las afinidades, después de varios estímulos con el antígeno. Esto pudo deberse a varias razones. En primer lugar las muestras de sangre fueron siempre tomadas al séptimo día después del reto antigénico (excepto después de la decimotercera inoculación en conejo). En segundo lugar, un número alto de inoculaciones probablemente dio lugar a que aún las condiciones de inoculación menos favorables logran estimular a una población suficientemente amplia de células productoras de anticuerpos de alta afinidad. Las de baja afinidad estarían presentes independientemente de las condiciones.

Esto llama la atención sobre un punto: si el estímulo constante provoca atenuación de diferencias importantes -entre sexos, entre cepas y entre especies- que se observan en etapas tempranas de la respuesta, significaría que la velocidad y las características de la respuesta inicial podrían ser determinantes para la susceptibilidad o la resistencia a ciertas patologías. Estudios para aclarar este punto resultarían interesantes.

La utilización de adyuvante completo de Freund (ACF) tuvo distintos efectos en la distribución de afinidades de los anticuerpos. Por un lado, cuando los ratones de ambas cepas fueron retados con 20  $\mu\text{g}$  del antígeno, no hubo diferencias entre los grupos a los que se aplicó adyuvante y aquellos a los que no. De hecho, en los ratones C57Bl/6 la maduración fue mayor después de 7 estímulos sin ACF que con él.

Con 200  $\mu$ g del antígeno, los ratones inoculados con ACF tuvieron una maduración de la afinidad más rápida. Es decir, las clones de alta afinidad requirieron de un menor número de inoculaciones para ocupar una proporción importante de los anticuerpos totales en los grupos en los que se utilizó ACF. Sin embargo, aún sin utilizarlo se observaron dichas poblaciones de alta afinidad, aunque más tardíamente. Esto probablemente signifique que el ACF no sólo amplifica la respuesta en general (Warren et al., 1986), sino que aumenta las probabilidades de contacto con células que poseen receptores de alta afinidad. Su ausencia de efecto en la heterogeneidad de afinidades sugiere que no aumenta el repertorio de células capaces de reaccionar con el antígeno, a pesar de ser mitogénico para linfocitos B (Damais et al., 1978).

La mayoría de nuestras curvas de fijación las obtuvimos a partir de gammaglobulinas totales. En la descripción original del método de apagamiento de fluorescencia (Eisen & McGuigan, 1971) se menciona como limitación la necesidad de utilizar anticuerpos puros para poder distinguir diferencias entre los grupos control y los experimentales. En la mayoría de los grupos estudiados no tuvimos los problemas previstos por los autores, sin embargo algunos puntos quedaron sin datos claros precisamente por la falta de resolución entre el apagamiento de las gammaglobulinas de los grupos problema y el de los controles. La utilización de gammaglobulinas totales se debió fundamentalmente a dos consideraciones: a) la mayoría de

los ratones de la cepa C57Bl/6 murieron en algún momento del proceso de inmunización, y la cantidad de suero disponible no permitía purificar los anticuerpos en la mayoría de los casos; b) el estudio pretendía fundamentalmente conocer la totalidad del rango de fijación, la purificación de los anticuerpos podía introducir sesgos importantes. Entre ellos pensamos en la posibilidad de perder algunas poblaciones de anticuerpos, principalmente de afinidades extremas, modificando -tal vez de manera sustancial- la distribución de afinidades obtenida. De esta manera la utilización de gammaglobulinas totales probablemente nos permitiría tener un sistema menos alejado de las condiciones *in vivo*.

De hecho, si comparamos las gráficas obtenidas en ratones Balb/c al estudiar anticuerpos puros con aquellas resultantes del estudio con gammaglobulina totales, podemos observar diferencias que consisten principalmente en mucho menor proporción de anticuerpos de alta afinidad en los purificados y, al menos en un caso (hembras 20 µg), en aparición de una población importante de anticuerpos de baja afinidad que no se encontró al utilizar gammaglobulinas totales. La explicación de la menor proporción de anticuerpos de alta afinidad podría ser la pérdida de estos anticuerpos debido a que el método de elución (cambio de pH) no hubiese permitido que se liberasen de la columna y, alternativamente, que el ácido utilizado para la elución hubiese dañado a los anticuerpos reduciendo su afinidad. Esto último podría también explicar la presencia de anticuerpos de menor afinidad en los anticuerpos puros que en las gammaglobulinas de

las hembras inoculadas con 20  $\mu$ g y ACF.

La principal desventaja teórica (además de la ya mencionada) introducida al estudiar gammaglobulinas totales en lugar de anticuerpos puros es que podría modificar sustancialmente la concentración de sitios activos. Para conocer el efecto de esto, realizamos simulaciones computacionales que demuestran que el histograma obtenido no cambia de forma ni de tamaño al variar la concentración de sitios activos considerados -aún cuando esta variación sea de tres órdenes de magnitud- siempre y cuando se incluyan todos los puntos. El histograma cambia de ubicación en el eje de las abscisas, lo que significa que la afinidad promedio obtenida sí se altera. Esto sucede principalmente si dicha afinidad es alta: en este caso la estimación obtenida es menor a la esperada. Esta es la razón por la que no hacemos explícito el valor de la afinidad promedio obtenido con gammaglobulinas totales y lo mencionamos únicamente como relativo, con fines comparativos entre los distintos grupos.

El método descrito por Sciutto y cols. (1987) permite distinguir claramente el cambio en proporciones de anticuerpos de distintas afinidades en la evolución de la respuesta inmune. En nuestro caso el método fue particularmente demostrativo cuando seguimos diariamente la respuesta del conejo en hiperinmunización. Sin embargo, la sola descripción de proporciones puede no reflejar fielmente el papel que en determinado momento tengan los anticuerpos. Cantidades totales



significativamente distintas tienen necesariamente efectos distintos, aún cuando las proporciones de anticuerpos de todas las afinidades fuesen idénticas. Es posible hacer una evaluación no sólo cualitativa sino también cuantitativa de la respuesta humoral, si se modifican los datos que dan lugar a los histogramas, de tal manera que para elaborarlos se les adscribe un peso proporcional a la cantidad de anticuerpos que le corresponden.

Así, a cada valor de  $\Delta r$  se le asigna un valor en ng correspondiente a la fracción del total de anticuerpos específicos de la muestra. De esta manera, si uno gráfica en función del título de anticuerpos y manteniendo las escalas de ambos ejes fijas, se obtienen trazos que permiten evaluar visualmente una respuesta inmune simultáneamente desde dos parámetros fundamentales: la cantidad de anticuerpos y su distribución en poblaciones de distinta afinidad.

## Referencias

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Ahlstedt, S.; Holgren J. and Hanson, L.A. Protective capacity of antibodies against *E. coli* O antigen with special reference to the avidity. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 46: 470-480, 1974.

Alpers, J.H.; Steward, M.W. and Soothill, J.F. Differences in immune elimination in inbred mice. The role of low affinity antibody. *Clin. Exp. Immunol.* 12: 121-132, 1972.

Ahmed, S.A.; Penhale, W.J. and Talal, N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am. J. Pathol.* 121(3): 531-551, 1985.

Berek, C.; Jarvis, J.M. and Milstein, C. Activation of memory and virgin B cell clones in hyperimmune animals. *Eur J Immunol* 17: 1121-1129, 1987.

Blank, S.E.; Leslie, G.A. and Clem, L.W. Antibody affinity and valence in viral neutralization. *J. Immunol.* 108(3): 665-673, 1972.

Burnet, F.M., *The Clonal Selection Theory of Immunity*, Vanderbilt and Cambridge University Press, New York, 1959.

Cantor and Schimmel. Techniques for the study of biological structures and function. In *Biophysical Chemistry*. Part II, pp. 433-445. W.H. Freeman and Co. San Francisco, USA. 1980.

Celis, E.; Ridaura, R. and Larralde, C. Effects of the extent of DNP substitution on the apparent affinity constant and cooperation between sites in the reactions of dinitrophenylated human serum albumin with anti-DNP and anti-HSA antibodies coupled to agarose. *Immunochemistry*, 14: 553-559, 1977.

Domais, C.; Parant, M.; Chedid, L.; Lefrancier, P. and Choay, J. *In vitro* spleen cell responsiveness to various analogs of MDP (N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine), a synthetic immunoadjuvant, in MDP high responder mice. *Cell. Immunol.* 35: 173-179, 1978.

Davie, J.M. and Paul, W.E. Immunological maturation. Preferential proliferation of high-affinity precursor cells. *J. Exp. Med.* 137: 201-204, 1973.

- Eisen, H.N. Preparation of purified anti-2,4-dinitrophenyl antibodies. In *Methods in Medical Research* (Edited by Eisen, H.N.), vol. 10, p. 115. Year Book Publishers, Chicago, 1964.
- Eisen, H.N. and McGuigan, J.E. Quenching of antibody fluorescence by haptens and antigens: a method for determining antibody-antigen affinity. In *Methods in Immunology and Immunochemistry* (Edited by Williams C.A. and Chase, M.W.), Vol.3, pp. 395-406. Academic Press, New York, 1971.
- Eisen, H.N. and Siskind, G.W. Variation in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 3: 996, 1964.
- Erickson, R.P. Inactivation of trypsin by antibodies of high affinity. *Immunochemistry* 11: 41-45, 1974.
- Fauci, A.S.; Frank, M.M. and Johnson, J.S. The relationship between antibody affinity and the efficiency of complement fixation. *J. Immunol.* 105(1): 215-220, 1970
- Flanagan, M.T.; Tattam, F.G. and Green, N.M. The characterization of heterogeneous antibody-antigen interaction using nonlinear regression analysis on fluorescence quenching curves. *Mol. Immunol.* 15: 261-267, 1978.
- Gold, E.A.; Fernandes, G.; Weksler, M.E.; Siskind, G.W. and Good, R.A. Studies of immune response in mice prone to autoimmune disorders. I. Heterogeneity of the affinities of anti-antigen antibodies produced by NZB, NZW and related strains of mice. *Cell Immunol* 80(1): 20-30, 1983.
- Griffiths, G.M.; Berek, C.; Kaartinen, M. and Milstein, C. Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone. *Nature* 312: 271-275, 1984.
- Hornick, C.L. and Karush, F. Antibody affinity III. The role of multivalence. *Immunochemistry* 9: 325-340, 1972.
- Inman, J.K. The antibody combining region: speculations on the hypothesis of general multispecificity. In *Theoretical Immunology* (Edited by Bell, G.I.; Perelson A.S. and Pimbley, G.H., Jr) p. 243. Marcel Dekker, New York, 1978.
- Jerne, N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. (Paris)* 125C: 373-389, 1974.
- Klotz, I.M. Number of receptor sites from Scatchard graphs: facts and fantasies. *Science* 217: 1247-1249, 1982.

Klotz, I.M. and Hunston, D.L. Protein interactions with small molecules. Relationship between stoichiometric binding constants, site binding constants, and empirical binding parameters. *J. Biol. Chem.* 250(8): 3001-3009, 1975.

Larralde, C. and Janof, P. The effect of the DNP:HSA molar ratio on the quantity and the affinity of rat anti-DNP antibodies in the primary response. *Immunochimistry* 9: 1209-1219, 1972.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.

March, S.C.; Parikh, I. and Cuatrecasas, P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Analyt. Biochem.* 60: 149-152, 1974.

Ortega, E.; Kostovetsky, M. and Larralde C. Natural DNP-binding immunoglobulins and antibody multispecificity. *Nat. Immunol.* 21(10): 883-888, 1984.

Pauling, L.; Pressman D. and Gromberg, A.L. The serological properties of simple substances VII. A quantitative theory of the inhibition by haptens of the precipitation of heterogeneous antisera with antigens, and comparison with experimental results for polyhaptenic simple substances and for azoproteins. *J. Am. Chem. Soc.* 66: 784-792, 1944.

Sciutto, E. Procedimiento para la descripción de heterogeneidad en la afinidad de la reacción de fijación entre anticuerpo y hapteno: evaluación teórica y experimental. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UNAM, México, 1986.

Sciutto, E.; Díaz, M.L.; Montoya, R.M.; Govezensky, T.; Lomelí, C. y Larralde, C. Diferencias en susceptibilidad experimental en ratones por *Taenia Crassiceps* dependientes de sexo y H<sub>2</sub>. *Memorias del VII Congreso Nacional de Inmunología*. Zacatecas, Zac. 25-28 de agosto, 1987a.

Sciutto, E.; Garat, B.; Ortega, E. and Larralde C. Antibody heterogeneity: Theoretical and experimental evaluation of a simple procedure to describe differing affinities in hapten binding reactions. *Nat. Immunol.* 24(6): 577-585, 1987b.

Sips, R. On the structure of a catalyst surface. *J. Chem. Phys.* 16: 490-495, 1948.

Siskind, G.W. and Benacerraf, B. Cell Selection by antigen in the immune response. *Adv Immunol.* 10: 1-50, 1969.

Siskind, G.W.; Dunn, P. and Walker, J.G. Studies on the control of antibody synthesis II. Effect of antigen dose and of suppression by passive antibody on the affinity of antibody synthesized. *J. Exp. Med.* 127: 55-66, 1968.

Soothill, J.F. and Steward, M.W. *Clin. Exp. Immunol.* 9: 193, 1971.

Steiner, L.A. and Eisen, H.N. Sequential changes in the relative affinity of antibodies synthesized during the immune response. *J. Exp. Med.* 126: 1161-1183, 1967a.

Steiner, L.A. and Eisen, H.N. The relative affinity of antibodies synthesized in the secondary response. *J. Exp. Med.* 126: 1185-1205, 1967b.

Steward, M.W.; Stanley, C. and Furlong, M.D. Antibody affinity maturation in selectively bred high and low-affinity mice. *Eur. J. Immunol.* 16: 59-63, 1986.

Steward, M.W. and Steensgaard, J. Chemical and mathematical basis. In *Antibody Affinity: Thermodynamic aspects and biological significance*. pp. 1-56. CRC Press Inc. Florida, USA. 1983.

Tuszynsky, G.P.; Knight, L.; Piperno, J.R. and Walsh, P.N. A rapid method for removal of  $^{125}\text{I}$  iodide following iodination of protein solution. *Anal. Biochem.* 106: 118-122, 1980.

Warren, H.S.; Vogel, F.R. and Chedid, L.A. Current status of immunological adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.* 4: 369-388, 1986.

Werblin, T.P. and Siskind, G.W. Distribution of antibody affinities: technique of measurement. *Immunochemistry* 9: 987-1011, 1972.

Williams, C.A. and Chase, M.W. Salt purification of immunoglobulins. In *Methods in Immunology and Immunochimistry*. (Edited by Williams C.A. and Chase, M.W.) Vol 1, pp. 318-319. Academic Press, New York, 1967.

## Apéndices

### a) Abreviaturas.

ACF	Adyuvante Completo de Freund
BSA	Albúmina Sérica Bovina
DNP	Dinitrofenol
I	Iodo
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
SABS	Amortiguador de boratos salino
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
r	Fracción de sitios activos ocupados
Log L	Logaritmo de la concentración de hapteno libre
TCA	Acido tricloroacético
cpm	Cuentas por minuto
rpm	Revoluciones por minuto

b) Programa computacional elaborado para procesar los datos obtenidos del apagamiento de fluorescencia.

```

1  DTN CH(70),VT(70)
2  DIM FA(70),FR(70)
30  DTN P(70),R(70),F(70)
35  DTN NL(100)
4   DTN L(70),PL(70),FL(70)
50  DIM D(70),J(70)
90  HOME : HTAB 7: INVERSE
1  PRINT "APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA."
1  PRINT
105 NORMAL
110 INPUT "GRUPO: ";G$
1  INPUT "CONC. DEL AC. (ug/mL): ";C
115 INPUT "HAPTENO UTILIZADO: ";H$
115 INPUT "NO. DE PRUEBA: ";N
1  INPUT "VOLUMEN INICIAL (uL): ";V0
115 INPUT "VOL. FINAL (uL): ";VF
130 INPUT "CONCENTRACION MOLAR DE SITIOS ACTIVOS (M): ";M0
1  INPUT "% DEL TOTAL: ";T
1  INPUT "FLUORESCENCIA INICIAL DE LOS ANTICUERPOS: ";I0
152 INPUT "FL. FINAL DE LOS ANTICUERPOS: ";IF
153 B = B * VF * 100 / (A0 * V0)
1  INPUT "FLUORESCENCIA INICIAL DE LAS GAMMAS NORMALES: ";G0
155 INPUT "FL. FINAL DE LAS GAMMAS: ";E
157 E = E * VF * 100 / (G0 * V0)
1  B = (E - B) * 100 / E
1 9 PRINT "DMAX: ";DM
160 INPUT "NUMERO DE AGREGADOS DE HAPTENO: ";N
170 D1 = CHR$(4)
1 3 PRINT D1;"PRAB"
175 HOME : VTAB 20
180 INPUT "NOMBRE DEL ARCHIVO DEL HAPTENO AGREGADO: ";H$
1  PRINT D1;"OPEN";H$
2  PRINT D1;"READ";H$
210 FOR X = 1 TO N
2 1 INPUT CH(X)
2 2 NEXT X
213 PRINT D1;"CLOSE";H$: HOME
214 PRINT "CONCENTRACION DEL HAPTENO EN LA SOL.:"
2 5 FOR X = 1 TO N
216 PRINT X,CH(X)
217 NEXT
2 8 PRINT : PRINT
220 INPUT "NOMBRE DEL ARCHIVO DE VOLUMEN: ";V$
225 PRINT D1;"OPEN";V$
230 PRINT D1;"READ";V$
233 FOR X = 1 TO N
236 INPUT VT(X)
238 NEXT X
243 PRINT D1;"CLOSE";V$
244 HOME
246 PRINT "VOLUMEN DE LA SOL. DESPUES DE CADA AGREGADO:"
2 9 FOR X = 1 TO N

```

```

202 PRINT 'CALCULO'
250 NEXT X
260 PRINT : PRINT
270 INPUT 'EXISTE UN ARCHIVO DE FLUORESCENCIA DE LOS ANTICUERPOS? (S/N): '
    :AAS
280 IF AAS = 'N' THEN 270
290 IF AAS = 'S' THEN GOSUB 2000: GOTO 311
298 GOTO 262
299 PRINT : PRINT
300 PRINT 'FLUORESCENCIA DE LOS ANTICUERPOS DESPUES DE CADA AGREGADO:'
305 GOSUB 4000
310 FOR X = 1 TO N:FA(X) = J(X): NEXT
315 INPUT 'LO GRABO? (S/N) ' :S$
320 IF S$ = 'N' THEN 311
330 IF S$ = 'S' THEN GOSUB 1000: GOTO 311
335 GOTO 300
340 HOME
345 INPUT 'EXISTE UN ARCHIVO DE FLUORESCENCIA DE GAMAS NORMALES? (S/N): '
    :EX$
350 IF EX$ = 'N' THEN 319
360 IF EX$ = 'S' THEN GOSUB 3000: GOTO 345
365 GOTO 312
370 PRINT : PRINT
380 PRINT 'FLUORESCENCIA DE LAS GAMAS NORMALES:'
385 GOSUB 4000
390 FOR X = 1 TO N:FG(X) = J(X): NEXT
395 INPUT 'LO GRABO? (S/N) ' :S$
400 IF S$ = 'N' THEN 345
410 IF S$ = 'S' THEN GOSUB 1000: GOTO 345
415 GOTO 350
420 HOME : HTAB 10
430 PRINT 'GRUPO: ' :IG$
440 VTAB 12: HTAB 10
450 PRINT 'CALCULANDO...'
460 FOR X = 1 TO N
470 FA(X) = FA(X) * UT(X) * 100 / (AD * UD)
480 FG(X) = FG(X) * UT(X) * 100 / (GI * UI)
490 IF FG(X) < = FA(X) THEN 550
500 Q(X) = (FG(X) - FA(X)) * 100 / FG(X)
510 R(X) = Q(X) / QH
520 P(X) = R(X) * SR
530 L(X) = CH(X) - P(X)
540 PL(X) = P(X) / L(X)
550 RL(X) = R(X) / L(X)
560 IF L(X) < = 0 THEN DL(X) = 1: GOTO 500
570 DL(X) = LOG (L(X)) / 2.30258509
580 IF R(X) < 1 THEN 505
590 GOTO 550
600 A = R(X) / (1 - R(X))
610 Q(X) = LOG (A) / 2.30258509
620 NEXT
630 GOSUB 3000
640 INPUT 'LO GRABO? (SCATCH,SIPS,KLOTZ) (S/N): ' :SH$
650 IF SH$ = 'N' THEN 590
660 IF SH$ = 'S' THEN GOSUB 1100: GOTO 590
665 GOTO 540
670 INPUT 'LO IMPRIMO? (S/N) ' :I$
680 IF I$ = 'N' THEN 800
690 IF I$ = 'S' THEN GOSUB 2000: GOTO 800
695 GOTO 590
700 PRINT : PRINT 'ADINS': END
1000 PRINT 'GRUPO: ' :IG$
1003 INPUT 'NOMBRE DEL ARCHIVO: ' :AC$
1007 PRINT D$ : 'OPEN' : AC$
1010 PRINT D$ : 'WRITE' : AC$
1020 FOR X = 1 TO N

```



```

1140 NEXT Y
1150 PRINT D4:"CLOSE":A4
1155 RETURN
1160 INPUT "NUMBRE DEL ARCHIVO (SEARCH): "S4
1170 PRINT D4:"OPEN":S4
1180 PRINT D3:"WRITE":S4
1185 PRINT N
1190 FOR X = 1 TO N
1200 PRINT F(X)
1210 PRINT PL(X)
1220 NEXT X
1230 PRINT D4:"CLOSE":S4
1240 INPUT "NUMBRE DEL ARCHIVO (STPS): "S5
1250 PRINT D4:"OPEN":S5
1260 PRINT D3:"WRITE":S5
1265 PRINT N
1270 FOR X = 1 TO N
1280 PRINT OL(X)
1290 PRINT D(X)
1300 NEXT X
1310 PRINT D4:"CLOSE":S5
1320 INPUT "NUMBRE DEL ARCHIVO (KI OTZ): "K1
1330 PRINT D4:"OPEN":K1
1340 PRINT D3:"WRITE":K1
1345 PRINT N
1355 FOR X = 1 TO N
1360 PRINT OL(X)
1370 PRINT R(X)
1380 NEXT X
1390 PRINT D4:"CLOSE":K1
1400 PRINT "ARCHIVO GRABADO: "S4
1450 RETURN
1500 PRINT CHR$(4):"PR#1"
1530 PRINT CHR$(9):"BON"
1600 GOSUB 3000
1650 PRINT CHR$(4):"PR#3"
1700 RETURN
1800 PRINT "GRUPO: "G1:"(KI4)":"G:" "G/mi"
1810 PRINT "HAPTEMO UTILIZADO: "H1:" PRUEBA "W:" "GASAS NLS: "IGN"
1820 PRINT "SO: "S0:"(T)%"
1830 PRINT "QMAX: "Q1:"%"
1840 PRINT "
1850 FOR X = 1 TO N STEP 2
1910 PRINT X, X + 1
1930 PRINT "FA: "FA(X), "FA: "FA(X + 1)
1940 PRINT "FG: "FG(X), "FG: "FG(X + 1)
1950 PRINT "O: "O(X), "O: "O(X + 1)
1960 PRINT "R: "R(X), "R: "R(X + 1)
1970 PRINT "P: "P(X), "P: "P(X + 1)
1980 PRINT "L: "L(X), "L: "L(X + 1)
1990 PRINT "P/L: "PL(X), "P/L: "PL(X + 1)
2000 PRINT "R/L: "RL(X), "R/L: "RL(X + 1)
2010 PRINT "LOG I: "OL(X), "LOG I: "OL(X + 1)
2020 PRINT "LOG R/1-R: "OD(X), "LOG R/1-R: "OD(X + 1)
2030 NEXT X
2040 RETURN
2050 X = 1
2060 PRINT "PARA CAMBIAR UN VALOR TECLEE LA LETRA C"
2070 PRINT X:
2080 INPUT A$
2090 C$ = LEFT$(A$,1)
2100 IF C$ = "C" THEN GOSUB 5000: GOTO 4010
2110 H(X) = VAL(A$)
2120 X = X + 1: IF X <= N THEN 4010
2130 PRINT : PRINT

```

```

4042 FOR X = 1 TO 10
4043 PRINT X: "1)(X)" "X + 10" "1)(X + 10)" "X + 20" "1)(X + 20"
    "X + 30" "1)(X + 30)" "X + 40" "1)(X + 40)" "X + 50"
    "1)(X + 50)" "X + 60" "1)(X + 60)"
4044 NEXT X
4045 PRINT : PRINT
4070 INPUT "¿CORRECTO? (S/N) " : IF E
4080 IF E = "N" THEN GOSUB 5000: GOTO 4070
4082 IF E = "S" THEN 4090
4086 GOTO 4070
4090 RETURN
5000 INPUT "¿CUAL QUIERES CAMBIAR? " : INC
5010 PRINT "¿CUAL ES EL NUEVO VALOR DEL " : INC : " ?"
5020 INPUT : INC
5030 RETURN
6000 INPUT "¿CUAL ES SU NOMBRE? " : INC
6010 PRINT D: "OPEN" : INC
6020 PRINT D: "READ" : INC
6030 FOR X = 1 TO N: INPUT F(X): NEXT X
6040 PRINT D: "CLOSE" : INC
6050 PRINT "FLUORESCENCIA DE LAS GAMAS NORMALES: "
6060 FOR X = 1 TO N: PRINT X, F(X): NEXT X
6070 RETURN
7000 INPUT "¿CUAL ES SU NOMBRE? " : AC
7010 PRINT D: "OPEN" : AC
7020 PRINT D: "READ" : AC
7030 FOR X = 1 TO N: INPUT F(X): NEXT X
7040 PRINT D: "CLOSE" : AC
7050 PRINT "FLUORESCENCIA DE LOS ANTICUERPOS: "
7060 FOR X = 1 TO N: PRINT X, F(X): NEXT X
7070 RETURN

```