

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Papel de los puentes disulfuro de inmunoglobulinas en la
activación del sistema del complemento a través de la vía
alternativa**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Juan Pablo Albar Ramírez

Madrid, 2015

Juan Pablo Albar Ramírez

TP
1980s
049



x - 53 - 044210 - 7

PAPÉL DE LOS PUENTES DISULFURO DE INMUNOGLOBULINAS
EN LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO A TRAVÉS
DE LA VÍA ALTERNATIVA

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© Juan Pablo Albar Ramírez
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-10663-1980

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz bajo la dirección del Dr. Fernando Ortiz Masllorens.

Quiero expresar aquí mi agradecimiento al Dr. F. Ortiz Masllorens por dos motivos fundamentalmente. El primero por el continuo asesoramiento y los consejos que de él he recibido, y el segundo porque su trabajo, su sentido crítico, su vida son todo un ejemplo y un constante estímulo para superarse y amar la investigación.

Asimismo agradezco al Prof. Dr. Angel Martín Municio el haber aceptado la ponencia de esta tesis.

A Cándido Juárez Rubio quiero agradecerle toda la colaboración, crítica e ideas que para llevar a cabo este trabajo he compartido y recibido. Y a José Antonio López de Castro porque de él partió la idea inicial y general de la tesis.

A Fernando Vivanco, Rafael Bragado, Gonzalo Buitrago, José Gavilanes, Angeles García-Pardo, Rafael García Cañero, a todos ellos, porque de una forma u otra han colaborado en distintos niveles y hecho posible que esta memoria se pueda hoy presentar.

No puedo pasar por alto las inestimables aportaciones críticas, que el resto de los compañeros del Laboratorio me han dado durante estos últimos años y agradecerían aquí todo lo recibido.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

FACULTAD DE
CIENCIAS QUIMICAS

"PAPEL DE LOS PUENTES DISULFURO DE INMUNOGLOBULINAS EN LA
ACTIVACION DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO A TRAVES DE LA VIA
ALTERNATIVA".

MEMORIA que para optar al
grado de Doctor en Ciencias
Químicas presenta JUAN PABLO
ALBAR RAMÍREZ.

MADRID. NOVIEMBRE. 1979.

I N D I C E

Página

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Estructura general de Inmunoglobulinas	1
1.1.1. Generalidades.....	1
1.1.2. Determinantes Antigénicos.....	4
1.2. Biosíntesis de Inmunoglobulinas	5
1.2.1. Generalidades.....	5
1.2.2. Diversidad de Anticuerpos.....	8
1.2.3. Distribución de los genes de las cadenas polipeptídicas de inmunoglobulinas.....	12
1.2.3.1. Genes de las cadenas ligeras.....	12
1.2.3.2. Genes de las cadenas pesadas.....	15
1.2.4. Síntesis y ensamblaje de las moléculas de cuatro cade- nas (H_2L_2).....	17
1.2.5. Secreción de Inmunoglobulinas y adición de hidratos de carbono.....	20
1.2.6. Inmunoglobulinas poliméricas.....	22
1.3. Estructura de Inmunoglobulinas y funciones efectoras.....	24
1.3.1. Aspectos generales.....	24
1.3.2. Diferenciación funcional de los dominios de la región constante de las Inmunoglobulinas,.....	28
1.3.2.1. Funciones de los dominios C_L y C_{H1}	28
1.3.2.2. Funciones de los dominios C_{H2}	28
1.3.2.3. Funciones de dominios C_{H3} y C_{H4}	29
1.4. Inmunoglobulinas del conejo.....	29
1.5. Inmunoglobulina G de conejo.....	30
1.5.1. Descripción.....	30
1.5.2. Rotura enzimática por pepsina y papaina.....	35
1.5.3. Proteólisis limitada de la IgG por otras enzimas y agentes químicos.....	37
1.5.4. Contenido en hidratos de carbono de la cadena pesada de la IgG del conejo.....	39
1.6. Papel de los puentes disulfuro en la estructura de pro- teínas.....	40

Página

1.6.1. Longitudes y ángulos de enlace de los puentes disulfuro y de los grupos tioles.....	41
1.6.2. Reactividad química de los puentes disulfuro.....	43
1.6.2.1. Ruptura homolítica.....	45
1.6.2.2. Ruptura electrófila.....	45
1.6.2.3. Ruptura nucleófila.....	46
1.6.2.4. Reducción de los puentes disulfuros.....	46
1.6.3. Papel de los puentes disulfuro en inmunoglobulinas...	50
1.7. El sistema del Complemento.....	52
1.7.1. Vía clásica.....	56
1.7.2. Vía alternativa.....	60
1.8. Relaciones entre el fragmento $F(ab')_2$ de la IgG de conejo y el sistema del Complemento.....	66
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	70
3. MATERIALES Y METODOS.....	74
3.1. Obtención del suero de conejo normal.....	74
3.2. Obtención de la IgG de conejo.....	74
3.3. Obtención del fragmento $F(ab')_2$	76
3.4. Caracterización físico-química del fragmento $F(ab')_2$ de la IgG de conejo.....	77
3.4.1. Movilidad electroforética en gel de agar.....	77
3.4.2. Estimación de su peso molecular.....	78
3.4.2.1. Estimación por filtración en gel de Sephadex G-200 superfino.....	78
3.4.2.2. Estimación por electroforesis en gel de poliacrilamida.SDS.....	78
3.4.3. Cálculo del radio molecular.....	80
3.4.4. Cálculo del coeficiente de difusión del $F(ab')_2$	81
3.4.5. Espectroscopia de Absorción.....	81
3.4.6. Dicroísmo circular.....	82
3.4.7. Análisis de aminoácidos.....	83
3.4.7.1. Contenido en Treonina.....	85
3.4.7.2. Contenido en Serina.....	85

Página

3.4.7.3. Contenido en Valina.....	86
3.4.7.4. Cotenido Isoleucina.....	86
3.4.7.5. Contenido en Triptofano.....	86
3.4.7.6. Contenido en Cisteinas.....	87
3.4.8. Determinación del coeficiente de extinción.....	87
3.4.9. Punto Isoelectrico.....	88
3.4.10. Determinación cuantitativa de grupos sulfhidrilo...89	
3.4.10.1. Contaje de 1 microcurio de ^{14}C -yodoacetamida....	90
3.4.10.2. Marcaje de la proteína y medida de la radiactivi dad incorporada.....	91
3.4.10.3. Cálculos.....	92
3.5. Obtención de anticuero de cobayo frente a IgG de conejo.	93
3.6. Obtención de $\text{F}(\text{ab}')_2$ anti albumina humana.....	94
3.7. Obtención de fragmentos de IgG de conejo anti-eritrocito de carnero.....	94
3.8. Modificación química (carboximetilación) del fragmento $\text{F}(\text{ab}')_2$	96
3.8.1. Técnicas Isotópicas.....	96
3.8.2. Filtración en gel.....	97
3.8.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.....	97
3.9. Estudios de estructura.....	97
3.10. Medida de la actividad anticomplementaria del $\text{F}(\text{ab}')_2$ nativo y modificado por la via alternativa.....	98
3.10.1. Ensayo hemolítico en placa.....	98
3.10.2. Ensayo hemolítico en fase soluble.....	100
3.10.2.1. Estudios cinéticos.....	102
3.10.2.2. Variación de la actividad anticuerpo específico...102	
4. RESULTADOS.....	104
4.1. Obtención del suero de conejo normal.....	104
4.2. Obtención de la IgG.....	105
4.2.1. Control de pureza.....	105
4.2.1.1. Inmunolectroforesis.....	105
4.2.1.2. Inmunodifusión.....	107

Página

4.2.1.3. Filtración en gel.....	107
4.2.1.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	107
4.3. Obtención del fragmento F(ab') ₂	109
4.3.1. Control de pureza.....	111
4.3.1.1. Inmunolectroforesis.....	111
4.3.1.2. Inmunodifusión.....	112
4.3.1.3. Filtración en gel.....	113
4.3.1.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA)...	113
4.4. Caracterización fisico-química del F(ab') ₂	115
4.4.1. Movilidad electroforética en gel de agar.....	115
4.4.2. Estimación de su peso molecular.....	116
4.4.2.1. Filtración en gel.....	116
4.4.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presen cia de SDS (EGPA-SDS).....	116
4.4.3. Cálculo del radio molecular.....	116
4.4.4. Cálculo del coeficiente de difusión.....	121
4.4.5. Espectroscopia de Absorción.....	121
4.4.6. Dicroísmo circular.....	121
4.4.7. Análisis de aminoácidos.....	126
4.4.8. Determinación del coeficiente de extinción.....	126
4.4.9. Punto Isoelectrico.....	128
4.4.10. Determinación cuantitativa de grupos Sulfhidrilo..	131
4.5. Obtención de anticuero de cobayo frente a IgG de conejo	131
4.6. Carboximetilación selectiva del F(ab') ₂	131
4.7. Estudios de dicroísmo circular.....	133
4.8. Medida de la actividad anticomplementaria.....	133
4.8.1. Ensayos hemolíticos en placa.....	133
4.8.2. Ensayos hemolíticos en fase soluble.....	144
5. DISCUSION.....	155
6. CONCLUSIONES.....	164
7. BIBLIOGRAFIA.....	167

1. INTRODUCCION.-

1.1. ESTRUCTURA GENERAL DE INMUNOGLOBULINAS.-

1.1.1. Generalidades.-

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas plasmáticas presentes en todos los vertebrados, en las cuales reside la actividad anticuerpo.

Anticuerpo es un concepto funcional que designa a la proteína que se origina en respuesta a una estimulación antigénica adecuada y es capaz de combinarse específicamente con el mismo antígeno que dió lugar a su producción o con sustancias de estructura muy similar. Inmunoglobulina es un concepto estructural y comprende a todas las proteínas que poseen unos rasgos estructurales comunes y característicos, poseen o no actividad anticuerpo reconocida. Ambos conceptos sin embargo tienden a unificarse puesto que todos los anticuerpos son inmunoglobulinas y teóricamente cualquier inmunoglobulina podría funcionar como anticuerpo contra un posible antígeno, al menos en lo que a su capacidad de combinación específica se refiere.

Los aspectos estructurales básicos, mantenidos a lo largo de la evolución, consisten en la estructura de cuatro cadenas polipeptídicas, dos ligeras (L) y dos pesadas (H), siendo su fórmula general $(H_2L_2)_n$ mantenidas unidas por fuerzas no covalentes y habitualmente por puentes disulfuro intercatenarios. Conformacionalmente cada cadena está constituida por un número de dominios globulares, mantenidos por puentes disulfuro e interacciones no covalentes, de dimensiones aproximadamente constantes (Fig nº 1). En base a la homología en la secuencia de aminoácidos de las cadenas H estas se clasifican en clases, habiéndose descrito las M, G, A, E y D y dentro de estas en subclases p. ej. la IgG humana presenta las IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Asimismo las variaciones en la secuencia de las partes constantes de las cadenas ligeras son en base de su clasificación en tipos Kappa y Lambda (K y Λ). El dominio N-terminal de cada cadena exhibe mucha más variación en la secuencia que

molecula de IgG de conejo

- 2 -

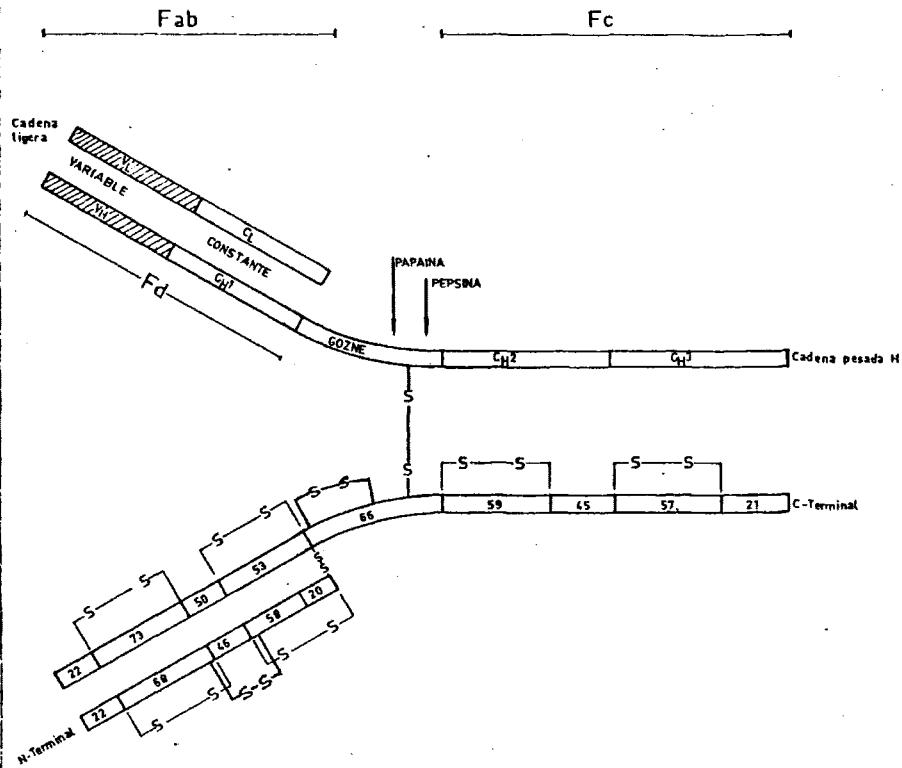


Fig. nº 1.

los otros dominios, pudiendo considerarse esta región como única para cada molécula y por ello se conoce como región variable (V) (V_H para la cadena pesada y V_L para la ligera). El sitio de unión al antígeno, resulta de la interacción entre V_H y V_L . De este modo la diversidad de anticuerpos refleja la diversidad de las regiones variables. La secuencia C-terminal restante de las cadenas pesadas y ligeras presenta una variabilidad mucho menor siendo invariante y distinta para una clasificación dada, por ello se la denomina región constante (C).(3). Así las regiones constantes de las cadenas ligeras pueden exhibir una u otra de sus secuencias invariantes características bien κ o bien λ , y las regiones o dominios constantes de las cadenas pesadas de por ejemplo la IgG humana podrán ser $C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2}$, $C_{\gamma 3}$ ó $C_{\gamma 4}$. Entre las regiones V y C de ambas cadenas existe una región de aproximadamente 10 aminoácidos que se denomina región conectante.

Cada par H-L conforma un sitio de unión para el antígeno por lo que la estructura de cuatro cadenas exhibe dos sitios de unión. Por esto la valencia mínima de una inmunoglobulina es dos. La presencia de más de un sitio combinante en la molécula de anticuerpo es de gran importancia biológica dado que permite la agregación de antígenos macromoleculares o particulados. Así, la bivalencia favorece el desarrollo de la fagocitosis mediada por el anticuerpo y la fijación del Complemento en presencia de antígeno.

Corolario necesario de la especificidad de los anticuerpos es su estructura heterogénea con respecto a los sitios combinantes. Dado que son moléculas con al menos dos funciones, el reconocimiento del antígeno y la iniciación de una amplia gama de fenómenos secundarios o independientes de la reacción con el antígeno como son la fijación del Complemento, la transmisión a través de membranas, la reactividad con factores reumatoides, la regulación del catabolismo y la liberación de histamina por los mastocitos, las inmunoglobulinas exhiben heterogeneidad en las estructuras relacio

nadas con ambas funciones.

Por otro lado ciertas partes de las regiones variables exhiben una mayor variación secuencial que las otras. Una representación de la variabilidad frente a sus posiciones en la secuencia muestra tres o cuatro picos dependiendo de la clase de la cadena. A estas porciones tanto de la cadena H como de la L se las denomina regiones hipervariables y están íntimamente implicadas en la formación del sitio al antígeno.

1.1.2. Determinantes Antigénicos.-

Como corresponde a moléculas de gran tamaño, marcada complejidad estructural y notable heterogenidad las inmunoglobulinas contienen una diversidad de caracteres antigénicos cada uno de los cuales destaca con mayor o menor relieve, dependiendo en gran medida del método empleado para su demostración.

Ante todo las inmunoglobulinas poseen caracteres antigénicos específicos de especie que permiten diferenciarlas de las inmunoglobulinas de otras especies animales y que son constantes para todos los individuos de una misma especie. Estos reciben el nombre de caracteres ISOTÍPICOS o ISOTIPOS. A estos pertenecen los determinantes de las clases de cadenas H(M,G,A,D,E) y de los tipos de cadena L (K y λ) y pueden ser detectados por anticuerpos preparados en otras especies. Algunos de estos caracteres son compartidos en mayor o menor grado por otras especies dando lugar a la existencia de reacciones cruzadas, cuya intensidad es tanto mayor cuanto más próximas filogenéticamente se encuentren.

Hay otros caracteres antigénicos demostrables en las inmunoglobulinas, cuya presencia y distribución varían notablemente de unos a otros individuos de una especie dada, estando esta variación determinada por mecanismos genéticos, de tal manera que -

los caracteres antigénicos correspondientes se heredan, en general, de una forma autosómica simple, sin relación con otros caracteres hereditarios conocidos, tales como los grupos séricos y los grupos sanguíneos. Estos caracteres, que crean un poliformismo dentro de la especie, reciben el nombre de caracteres ALOTÍPICOS o ALOTIPOS. Sobre estos nos detendremos posteriormente.

Otros caracteres antigénicos, distintos de todos los anteriores que marcan diferencias entre unas y otras moléculas de las inmunoglobulinas de un mismo sujeto y dudosamente también entre individuos, reciben el nombre de caracteres IDIOTÍPICOS o IDIOTIPOS. Estos están localizados en la región variable y pueden requerir una combinación específica H-L para su expresión.(4,5)

La tabla nº 1 (6) recoge los marcadores alotípicos de las inmunoglobulinas de conejo y su asociación con las clases de cadenas H y los tipos de cadenas L. Los determinantes alotípicos que se comportan como controlados por genes alélicos están expuestos como un grupo.

Como se evidencia en la tabla nº 1 el polimorfismo genético o alotipia se observa en las cadenas L de conejo de ambos tipos Kappa y Lambda y en las regiones constantes C_H de la IgG, IgM e IgA. Además un conjunto de diferentes marcadores alotípicos se localiza en las regiones V_H . Los mismos marcadores de la región V_H están presentes en todas las clases de cadenas H estudiadas IgG, IgM, IgA e IgE lo que viene a indicar que el mismo conjunto de genes V_H es compartido por todas las clases de cadenas pesadas.

1.2. BIOSÍNTESIS DE INMUNOGLOBULINAS.-

1.2.1. Generalidades.-

En los mamíferos los anticuerpos son producidos por unas

Especificidades alóticas en las inmunoglobulinas de conejo

Cadena o segmento de cadena	Locus	Especificidades conocidas	Localización	Alelismo
C _γ	de	d11 d12	COZNE Met/Thr(215)	SI
C _γ	de	e14 e15	Fc Thr/Ala (309)	SI
C _γ	NO NOMBRADO	A8 A10	Fc	-
C _{α1}	f	f69 f70 f71 f72 f73	C _α	SI
C _{α2}	g	g74g75g76g77	Fc _α y Fab _α	SI
C _μ	n	n81 n82		SI
C _μ	NO NOMBRADO	Ms1 Ms2 Ms3 Ms4 Ms5 Ms6		DESCONOCIDO
V _H (γ,α,μ,ε)	a	a1 a2 a3		SI
V _H (γ,α,μ,ε)	x	x32		
V _H (γ,α,μ,ε)	y	y33		
K (K _{2γ} K _δ)	b	b4 b5 b6 b9	C _k (V _k ?)	SI
λ	c	c7 c21		PROBABLEMENTE PSEUDOALELOS

Tabla nº 1.

células especializadas llamadas linfocitos B. El linfocito B en su estadio de diferenciación terminal recibe el nombre de célula plasmática que está caracterizada por la síntesis y secreción de inmunoglobulinas en gran intensidad. Estas células que están ampliamente distribuidas en los órganos linfoides tales como el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea, contienen, en sus estados diferenciados todo el complejo aparato intracelular asociado con la biosíntesis y secreción de proteínas. Las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo completa son sintetizadas a lo largo de la tupida red del retículo endoplasmático rugoso, ensambladas dando lugar a una molécula de inmunoglobulina completa, y transportadas al exterior de la célula. En el entorno extracelular los anticuerpos desarrollan una amplia colección de funciones biológicas e interaccionan con otras moléculas a fin de ejercer su papel protector en la economía del organismo.(7).

Un aspecto característico de los linfocitos B es la presencia de inmunoglobulina, de fácil detección, sobre su superficie(8) que actúa como receptor para el antígeno (9), tras esta interacción y quizá con la cooperación de linfocitos T y macrófagos, proliferan y diferencian con la producción de "células de memoria" y "células secretoras de inmunoglobulinas a alta velocidad o células plasmáticas". El mecanismo inequívoco por el que estas células son estimuladas para dividirse y diferenciarse, por el momento se desconoce.

Bajo circunstancias normales, la inmunoglobulina que secretan las células plasmáticas es homogénea y contiene el par V_H-V_L idéntico al expresado en el linfocito precursor original. De esta forma la especificidad de anticuerpo del linfocito es preservada en su progenie, exactamente como había predicho la teoría de selección clonal de Burnet (10). Asimismo una célula plasmática dada en general expresa solamente un C_H y un C_L .

Si las células plasmáticas secretoras de IgG e IgA se deri

Van de linfocitos B con IgM o IgD en su membrana debe haber un cambio ("switch") en la expresión genética de las inmunoglobulinas durante el desarrollo de tales clones. Experimentos en los que la administración de anticuerpos anti-IgM in vivo provocan la abolición de la aparición de IgG e IgA sugiere fuertemente la existencia de este tipo de switch.(11)

1.2.2. Diversidad de Anticuerpos.-

Los genes estructurales de las cadenas de inmunoglobulinas constituyen una familia multigénica. Las secuencias de DNA que codifican la mitad N-terminal de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, convencionalmente, se las ha llamado genes V_L y las que codifican la mitad C-terminal, que se encuentran separadas de los genes V_L en células embrionarias (12), genes C. Durante la diferenciación de los linfocitos parece que ocurren una serie de acontecimientos de reagrupación específica por los que uno de los múltiples genes V se sitúa en continuidad de un gen C.(13). Se ha visto sin embargo que este reagrupamiento de los genes V y C no produce una secuencia totalmente contigua del DNA que porta los genes V y C en un sentido lineal sino que el gen de la cadena-L activo de las células de mieloma contiene una secuencia interrumpida en, o cerca de, la región de unión de las regiones V y C.(13,14),

Actualmente se sabe que hay una sola copia de cada clase de gen de la región constante, por tanto el origen de la diversidad de anticuerpos, es decir como un único animal dá cuenta de su capacidad para producir alrededor de un millón de anticuerpos diferentes, es un problema que reside en la generación de las diferentes regiones variables.

Existen tres teorías que tratan de explicar este fenómeno de acuerdo con la "teoría de la línea germinal", la diversidad de anticuerpos está codificada por un amplio número de genes de la -

región variable presentes ya en la célula inmadura (germinal) y es heredada por todas las células productoras de anticuerpo (15).

La teoría de mutación somática mantiene que en las células germinales existe un número relativamente bajo de genes codificantes de las regiones variables, que son heredados por las células productoras de anticuerpos y que la diversidad se genera por mutación de estos genes. (16).

Un tercer modelo postula que el reagrupamiento de segmentos de genes de la región variable durante la diferenciación de las células productoras de anticuerpos genera la diversidad de anticuerpos. (17-19).

E. Kabat y T.T. Wu (17) mostraron que las diferencias de aminoácidos eran más probables que tuviesen lugar en determinadas porciones de las regiones variables de las cadenas de anticuerpo que en otras. Estas regiones se denominaron hipervariables y los segmentos con menor frecuencia de alteración regiones armazón. Kabat y Wu predijeron que los aminoácidos de los segmentos hipervariables conformaba los sitios de unión al antígeno, predicción que posteriormente fue confirmada por difracción de rayos-X. Además Kabat y Wu propusieron que los segmentos de DNA que codifican las regiones hipervariables están separados de aquellos que codifican los aminoácidos armazón, postulando que los segmentos hipervariables se insertarían individualmente entre las regiones armazón para formar un gen de la región variable completo en las células productoras de anticuerpos.

Sin embargo S. Tonegawa y W. Gilbert (20) por secuenciación de los nucleótidos de un gen de la región variable de células embrionarias de ratón encontraron que las secuencias hipervariables estaban ya situadas de una forma continua en este estado de diferenciación resultado incompatible con lo sugerido por Kabat y Wu

ya que suponía que estas secuencias no se encontrarían contiguas en las células germinales aunque posteriormente se insertasen entre las regiones armazon en las células maduras.

Posteriormente Kabat, Wu y Bilofsky (19) modificaron su teoría sugiriendo que en las células embrionarias podrían hallarse secuencias inespecíficas entre los segmentos de nucleótidos que codifican las regiones armazon, los genes de la región variable completa se ensamblarían entonces por eliminación de estas secuencias inespecíficas e inserción de los minigenes hipervariables entre los segmentos armazon.

Sin embargo Tonagawa y Gilbert en células de embrión de ratón de 12 días no encontraron ninguna de estas secuencias y posteriormente tampoco encontró diferencia alguna en los patrones de mapeo genético de los genes de esperma de ratón respecto a los de embrión de 12 días saliendo al paso de la objeción que Kabat manifestó sobre el material embrionario (autenticidad o no de línea germinal) utilizado inicialmente por Tonagawa y Gilbert.(21)

Los estudios genéticos de Tonagawa y sus colegas han mostrado que la región variable de una cadena ligera de ratón está codificada por dos segmentos genéticos separados. Uno de estos codifica los aminoácidos 1 a 97 ó 98 y el otro codifica el resto de los 111 aminoácidos de la región variable. Este pequeño segmento se ha denominado J porque une las regiones constantes y variable de las cadenas de anticuerpo. Observaciones estas que han sido corroboradas por otros autores (Weigert y col.(22)), identificando 11 de estas regiones J cada una de estas codificadas probablemente por un gen diferente. Asimismo las regiones variables de las cadenas pesadas parecen estar compuestas de dos segmentos distintos (23). Esta región coincide con el tercer segmento hipervariable de las cadenas ligeras del ratón, su funcionalidad más atractiva es que pueda estar implicado en la generación de la diversidad de an

ticuerpos.

La contribución específica de los genes de la línea germinal y de la mutación somática como actuantes en la generación de la diversidad de anticuerpos han sido y son uno de los objetos de investigación en el campo de la inmunogenética. Hasta aproximadamente 1974 la evidencia experimental indicaba que había muy pocos genes de anticuerpo en la línea germinal y que la mutación somática explicaba la mayor parte de la diversidad de los anticuerpos - en base sobre todo a los datos de secuencia que se tenían sobre cadenas λ que representan un 5-10% del total de las cadenas ligeras en el ratón.(24). Sin embargo, con respecto al número de genes variables de la cadena κ se han establecido, en base a las similitudes en secuencia de aminoácidos de las cadenas κ , 50 grupos de genes que codificarían todas las cadenas κ (22). A su vez estos grupos pueden subdividirse en otros seis o siete subgrupos cada uno de los cuales puede requerir un gen distinto para la región variable.(25)

Aunque existe un creciente acuerdo sobre la existencia de media docena de genes por cada grupo de cadenas κ aún quedan importantes cuestiones sobre si son suficientes genes para explicar toda o casi toda la diversidad de los anticuerpos o si la mutación somática, que se sabe que tiene lugar, es el primer mecanismo subyacente a la diversidad. Todas las moléculas de anticuerpos están formadas por 2 cadenas ligeras idénticas más dos cadenas pesadas idénticas. Si la combinación es al azar entonces 1000 genes diferentes para las cadenas ligeras más otros 1000 para las pesadas - serían suficientes para producir un millón de moléculas de anticuerpos diferentes, que es citado habitualmente como el número mínimo que un animal individual es capaz de producir (21).

Weigert y sus colaboradores (22) basándose en análisis estadísticos de las secuencias de aminoácidos de cadenas κ conocidas

concluyeron que las proteínas podrían dividirse en 50 grupos, si 6 ó 7 genes se necesitan para codificar los miembros de cada grupo serían alrededor de 350 genes de la región variable para las cadenas K. Esta es una de las estimaciones más altas establecidas hasta la fecha y Weigert piensa que ~~los~~ genes en la línea germinal dan cuenta de alrededor del 10% de la diversidad de anticuerpos y el resto se debería a la aportación de otros mecanismos. Estos otros incluirían la mutación somática y la combinación entre un número de genes J y genes de la región variable. No obstante, algunos investigadores piensan que no todos los grupos de cadenas K han sido identificados (26), u Potter relega la mutación somática a un segundo nivel con respecto al número de genes de la línea germinal. (26,27)

1.2.3. Distribución de los genes de las cadenas polipeptídicas de las inmunoglobulinas.-

1.2.3.1. Genes de las cadenas ligeras.-

La cadena ligera es sintetizada como un precursor más largo que el que secreta la célula plasmática conteniendo en su región NH_2 -terminal un péptido adicional marcadamente hidrofóbico. (28). La marcada hidrofobicidad de esta secuencia extra favorecería la interacción del precursor con membranas celulares de una manera similar a la función del "dominio hidrofóbico" de proteínas unidas a membranas (por ejemplo glicoforina).

I. Schechter y Y. Burstein (28) proponen que el posible papel fisiológico de esta secuencia extra es dirigir la mayor parte de las moléculas precursoras al retículo endoplasmico donde son escindidas, dando una Gln como extremo NH_2 -terminal que se cicla dando lugar a ácido pirrolidon-carboxílico para producir la cadena L madura destinada para ser secretada.

El gen funcional, es una célula plasmática, para una cade

na ligera esta compuesto por una región precursora, seguida de una región de 93 bases de DNA, que no se transcribe, gen de la región variable (V+J), 1250 bases de DNA no codificante y por último el gen de la región constante.(29).

Tonegawa ha denominado a las secuencias de DNA que no se transcriben intrones (por región intragénica o intracistron) por lo que la estructura del gen para la cadena L sería líder (45)-intron(93)-variable(306)-intron(1250)-constante(348).

Tonegawa hipotetiza que la mayor parte de los genes de células superiores están constituidos por DNA informacional intercalado con secuencias silenciosas. El cistron eucariótico es por tanto una unidad de transcripción que contiene regiones alternas que son excluidas del mensaje (intrones) y regiones que se expresan (exones)(12). Recientes trabajos apoyan una estructura genética de este tipo en casos tales como : el "gen" que codifica el RNA ribosomal 28S de la drosophila melanogaster (30,31) genes de las cadenas κ de inmunoglobulinas de ratón (12,14), genes de la gglobi na de conejo y ratón (32, 33), genes de la ovoalbumina de gallina (34) genes del tRNA de levadura.(35).

De esta forma el gen es un mosaico: las secuencias correspondientes para expresar una función se mantienen en una matriz - que puede ser hasta 10 veces más larga que los componentes codificantes.

La figura número 2 esquematiza los modelos hipotéticos para los segmentos de DNA de los genes κ de ratón. Estos segmentos genéticos son reagrupados a nivel de DNA presumiblemente en linfocitos diferenciados. Como con los genes κ , el reagrupamiento de DNA se dirige a unir los segmentos V y J. Hay al menos dos caminos - para unir los segmentos J y C a nivel nucleotídico: a) Un segundo reagrupamiento de DNA sitúa al segmento J_2 más cercano al segmento

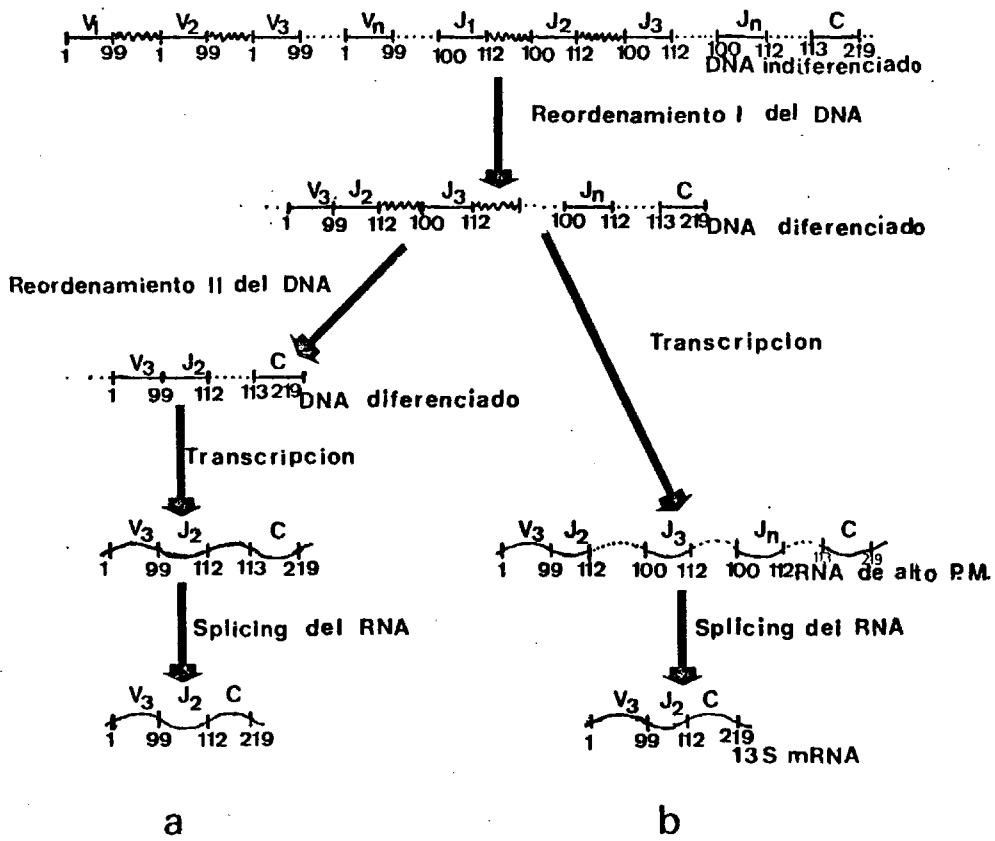


Fig. nº 2.
modelos hipotéticos para los segmentos de DNA de los genes k del ratón

c. Recientemente Honjo y Kataoka (37) han sugerido que dos o más reagrupamientos de DNA pueden ocurrir en los linfocitos durante el cambio en la síntesis de una a otra clase de inmunoglobulina. La unión final de V y C tiene lugar por splicing del RNA mensajero (38). b) Un RNA nuclear de gran tamaño con los segmentos J inespecíficos es procesado por enzimas del splicing del mRNA.

1.2.3.2. Genes de las cadenas pesadas.-

En principio la distribución exónica de la región variable de las cadenas pesadas no tienen por que ser distintas a la que exhibe la región variable de las cadenas ligeras y en este sentido hay datos parciales que confirman esta suposición (39). Recientemente Tonegawa (40) por digestión del DNA de células de mieloma de ratón MOPC 21 con la enzima de restricción Eco RI e hibridación de los fragmentos obtenidos con cDNA preparada a partir del mRNA de la cadena MOPC 21 γ -1 ha demostrado la existencia de cuatro exones que codifican para los dominios C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y para la región goz ne, distribuidos como indica la figura nº 3.

La unión de los genes V y C en el RNA nuclear puede explicar alguno de los aspectos problemáticos de la expresión genética de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. Durante la respuesta inmune hay un cambio en la producción de IgM a IgG que parece ser el resultado de un cambio de la cadena pesada dentro de clones únicos (41). Se ha visto que un paciente con mieloma produce V_H idénticos en secuencia para IgM e IgG (42), otros estudios han mostrado que una célula produce regiones V_H idénticas en asociación con C_μ y C_γ (43). De esta forma, una célula expresa un gen V_H y este mismo gen V puede, a tiempos diferentes, asociarse con C_μ , C_γ y C_δ , y es posible que pueda tener una asociación posterior con C_α ya que se ha visto que una misma secuencia V_H esta presente en la IgG e IgA de un paciente con mieloma IgG-IgA. Rabbits (38), basándose en el procesado de mRNA nuclear heterogeneo ha propuesto

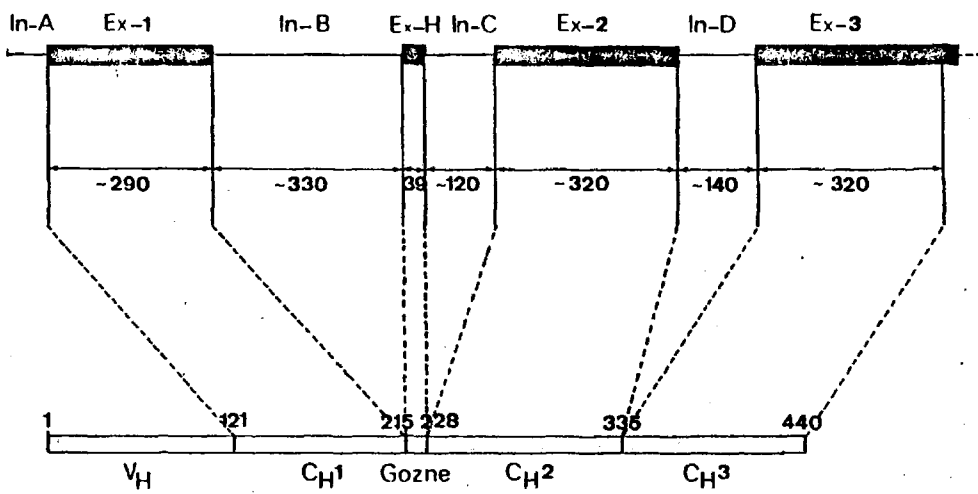


Fig. nº 3.
distribucion de los exones MOPC 21 γ -1

un hipotético esquema para la expresión de las cadenas pesadas de inmunoglobulina que la figura número 4 representa.

Un único gen V_H se selecciona del pool de genes V_H y por un proceso de reagrupamiento del DNA este gen V_H se sitúa en proximidad de un gen C_H . A continuación se produce una primera transcripción de la unidad genética activa de la cadena pesada para producir un precursor RNA(nuclear) que contiene la región V_H y las diferentes clases de genes C_H . La célula ahora puede producir a partir de una especie precursora de RNA nuclear, la misma región V_H asociada con cualquiera de las clases C_H por procesos de looping out de las secuencias intercaladas, y unión de las regiones V_H y C_H seguida de degradación del RNA que no se traduce. Por tanto una única célula utilizando de esta forma un mRNA precursor podría producir simultánea o secuencialmente una, dos o tres especies de mRNA que contienen una misma secuencia V_H con diferentes secuencias C_H .

En la figura nº 4 el orden de los genes C_H es hipotético y para simplificarlo no se han incluido los genes C_H de las subclases ni la distribución exónica dentro de estos.

1.2.4. Síntesis y ensamblaje de las moléculas de cuatro cadenas (H_2L_2).

Las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas son sintetizadas independientemente en los polirribosomas de células de tejidos inmunes y de células de mieloma (44).

Los polirribosomas responsables de la síntesis de las cadenas pesadas y ligeras sedimentan a alrededor de los 300 S y 200 S respectivamente, y por visualización directa de estos mediante microscopía electrónica, los polirribosomas están compuestos de 11 a 18 ribosomas para las cadenas pesadas y de 4 a 5 para las ligeras

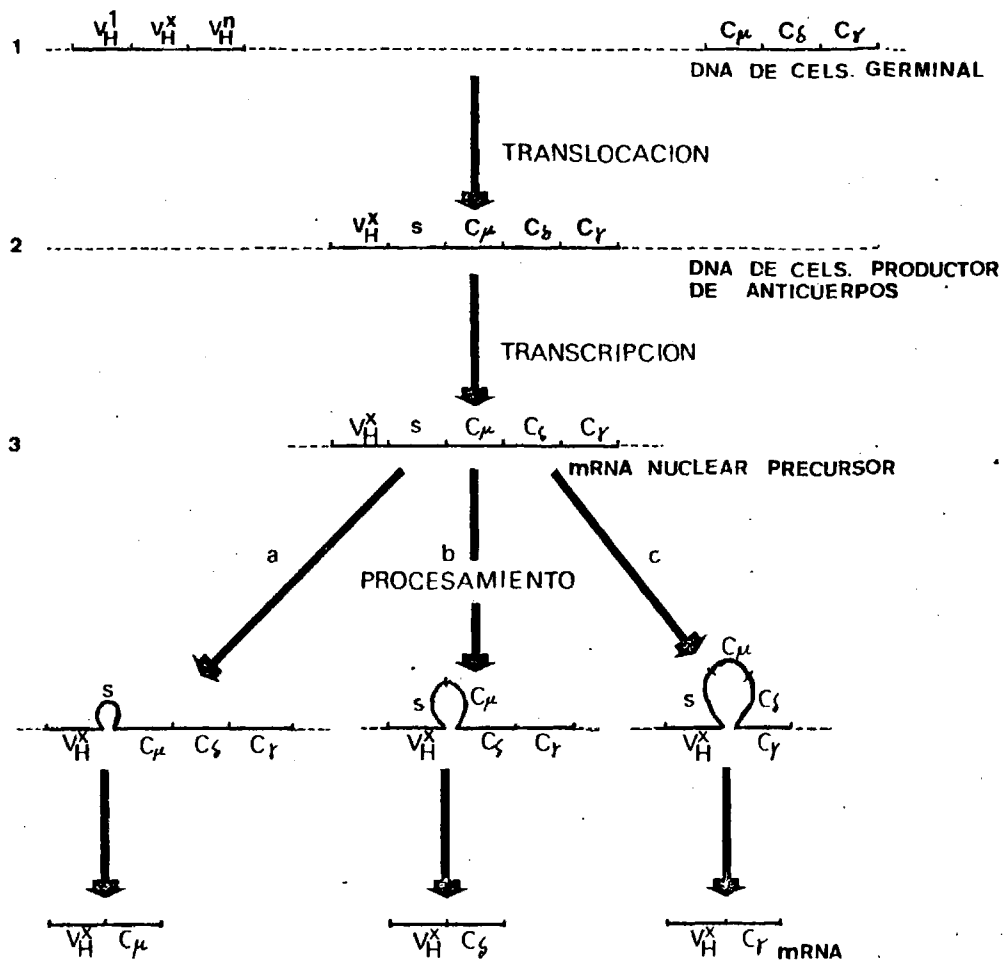


FIG.4. modelo hipotético para la expresión de un gen V_H con múltiples C_H

(45). Experimentos en los que células de mieloma son expuestas a aminoácidos marcados radiactivamente durante periodos cortos de-- muestran un crecimiento secuencial de la cadena polipeptídica des de el extremo N-terminal (46).

Después de la síntesis de las cadenas pesadas y ligeras - tiene lugar el ensamblaje en estructuras de cuatro cadenas H_2L_2 .

En el caso de la IgA e IgM este ensamblaje prosigue por la adición de la cadena J y la formación de estructuras poliméricas. En la mayor parte de los casos el ensamblaje es acompañado o segui do de la adición de hidratos de carbono en varios puntos de la ca dena polipeptídica.

En la mayoría de las especies en que el ensamblaje biosin tético ha sido la estructura de cuatro cadenas se mantiene unida - por puentes disulfuro y uniones no covalentes. Experimentalmente es fácil estudiar el primero (pero no el último) y definir el orde n en la formación de los puentes disulfuro. Este orden varía en las inmunoglobulinas como conjunto pero es característico y const antes para una clase o subclase de inmunoglobulina dada (46). El primer puente disulfuro intermedio formado en el ensamblaje de la estructura H_2L_2 puede ser bien el H_2 ó bien el H-L. La conver sión a la molécula de 4 cadenas tiene lugar bien por la adición de cadenas ligeras a H_2 o por la dimerización de H-L.

En la práctica suspensiones de células son incubadas duran te tiempos relativamente cortos y posteriormente se aíslan las in munoglobulinas intracelulares y las subunidades de inmunoglobuli nas y se caracterizan por electroforesis en gel.

En el ratón la mayor parte de las IgG se forman vía inter mediario H_2 mientras que la IgM se ensambla a partir de las subuni dades H-L. Es interesante tener en cuenta que el patrón de forma-

ción de puentes disulfuro dentro de la célula se correlaciona con su labilidad a condiciones reductoras, (46). Así, en moléculas en las que el ensamblaje es vía H-L los puentes disulfuro H-H son más susceptibles a la reducción que los H-L y viceversa. De esta forma por simple estudio de la susceptibilidad a la reducción de una inmunoglobulina es posible predecir su ruta biosintética.

El orden de las interacciones no covalentes entre las cadenas es más difícil de definir. Sin embargo una faceta de las cadenas H y L de inmunoglobulinas es sus fuertes interacciones no covalentes que hasta incluso pueden dar una estructura funcional H_2L_2 capaz de unirse al antígeno en ausencia de uniones covalentes.

En base a esto, en una mezcla de cadenas pesadas y ligeras dentro de la célula, una predicción razonable sería la formación inmediata de entidades H_2L_2 unidas no covalentemente, acoplándose las cadenas H y L en posiciones favorables a la formación de los puentes disulfuro intercatenarios.

1.2.5. Secreción de Inmunoglobulinas y adición de hidratos de carbono.-

Ciopi y Lennox (47) demostraron que la síntesis de inmunoglobulinas tiene lugar en polisomas asociados con el retículo endoplásmico. La liberación vectorial de las inmunoglobulinas en la cisterna del retículo endoplásmico, también ha sido evidenciada (48). Los datos de fraccionamiento celular, junto con los análisis de hidratos de carbono (49, 50, 51) y de microscopía electrónica seguida de autoradiografía de inmunoglobulina marcada con galactosa ha demostrado el paso de inmunoglobulina desde el retículo endoplásmico rugoso al aparato de Golgi (52). Los valores de vida media del tránsito de las inmunoglobulinas desde el lugar de síntesis al exterior oscilan entre 90 y 150 minutos (49). Aproximadamente dos tercios de este tiempo lo pasa en el retículo endoplásmi

do rugoso y el resto en el aparato de Golgi.

Uno de los principales problemas resueltos es la alta selectividad del mecanismo de secreción. Algunos autores piensan que las proteínas secretoras poseen "secuencias de reconocimiento para el transporte" (53) o que los hidratos de carbono pueden ser la señal de la proteína para su secreción (51). Sin embargo, los estudios de secuencia de aminoácidos no han identificado ninguna secuencia de transporte y muchas proteínas incluyendo las cadenas ligeras de inmunoglobulinas carecen de carbohidrato y sin embargo son secretadas (54). La explicación más simple y probable es que los mRNAs para las proteínas secretoras contienen una secuencia de nucleótidos, que no se traduce, con afinidad para los ribosomas unidos a membranas o subunidades ribosomales.(55)

Los oligosacáridos son unidos en diversos puntos a lo largo de las regiones constantes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. La mayor parte de las uniones son de las que afectan al núcleo (core-type) mediante enlaces N-glicosídicos a una Asn-vía hexosaminas N-acetiladas. La subclase IgA1 y la IgD humana aparentemente son las únicas que contienen también uniones tipo-mucina (O-glicosídico a Ser)(56). La idea más generalizada es que glicosiltransferasas específicas unen la mayoría de los azúcares a las proteínas en una forma preensamblada por transferencia de oligosacárido-dolichol u oligosacárido-retinol en el aparato de Golgi (57,58) y se piensa que la adición de los azúcares terminales tiene lugar a nivel de la membrana plasmática durante su secreción.

Basándose en el examen de las secuencias de aminoácidos de numerosas glicoproteínas Marshall (59) propuso que la secuencia tripeptídica aceptora de tipo nuclear Asn-X-Ser/Thr (donde X puede ser un aminoácido cualquiera) es condición necesaria pero no suficiente para el anclaje de la mayor parte de los oligosacáridos

a proteínas unidos por unión N-glicosídica. Una amplia gamma de factores pueden dar cuenta de las variaciones en el grado y localización de la glicosilación que incluyen la presencia o ausencia de transferasas apropiadas, compartimentalización intracelular o restricciones impuestas por el plegamiento polipeptídico.

Si bien es cierto que las inmunoglobulinas exhiben un alto grado de microheterogeneidad en el contenido de carbohidrato - existen relativamente pocas secuencias básicas. Estas se pueden clasificar como estructuras complejas (clase A) que contienen ácido sialico terminal y fucosas y estructuras más simples (clase B) que contienen un predominio de manosa y hexosaminas. Los oligosacáridos de la clase B se encuentran predominantemente en la región C-terminal (dominios C_{H3} y C_{H4}) de las cadenas pesadas mientras - que las estructuras complejas se encuentran frecuentemente en el dominio C_{H2} .

1.2.6. Inmunoglobulinas poliméricas.-

El aspecto más característico en el ensamblaje de inmunoglobulinas poliméricas es la conversión de la subunidad 7S (H_2L_2) a polímeros justo antes, o simultáneamente a su secreción (46,60).

La IgM 7S intracelular aislada no polimeriza espontáneamente a menos que previamente se haya tratado con agentes reductores lo que sugiere que los residuos de cisteína responsables de la - unión intersubunitaria estén bloqueados en el interior de la célula. La liberación de este bloqueo, quizá con la participación de una enzima que medie el intercambio disulfuro, puede formar la base de un mecanismo de control para la etapa de polimerización final.

Otros acontecimientos que tienen lugar durante la polimerización, justo antes de la secreción de inmunoglobulinas poliméricas

bas son la incorporación de la cadena J a la molécula de inmunoglobulina (61) y la adición de los restos de hidratos de carbono terminales (60).

El hidrato de carbono no desempeña un papel crítico en la polimerización dado que las monoméricas de IgA e IgM, precursores de los polímeros secretados, se pueden polimerizar in vitro en forma de subunidades que carecen de fucosa y son deficientes en galactosa (60). Sin embargo la cadena J desempeña un papel importante en el ensamblaje de las inmunoglobulinas poliméricas.(62)

La polimerización sólo tiene lugar cuando tanto la cadena J como una enzima intercambiadora de disulfuro purificada están presentes. La importancia de la enzima intercambiadora de disulfuro se evidenció por el hecho de que a bajas concentraciones de las subunidades IgM e IgA pueden polimerizar en presencia de esta enzima al adicionar la cadena J. Altos niveles de esta enzima se han encontrado en el aparato de Golgi y en la membrana plasmática mientras que si bien se halla también en el retículo endoplásmico rugoso es inactiva. La cadena J no desempeña un mero papel catalizador en la polimerización ya que todas las cadenas J liberadas de IgM por reducción se reincorporan al polímero re-ensamblado(60).- En base a estos experimentos la cadena J se presenta como un requerimiento estructural esencial para la polimerización de inmunoglobulinas.(60).

Por otro lado teniendo presente que la cadena J se desplaza desde su sitio de síntesis, por la misma ruta que lo hacen las cadenas pesadas y ligeras, es decir a través de elementos membranosos de la célula, un importante factor en el control de la polimerización puede ser la carencia de interacciones no-covalentes significativas entre la cadena J y las subunidades intracelulares - 7S. Este control puede ser debido al hecho de que los residuos de cisteína, responsables de los puentes disulfuro inter-subunitarios,

están bloqueados dentro de la célula lo que sugiere obviamente un papel para las enzimas intercambiadoras de disulfuro.

Una intrigante cuestión es por qué la IgM secretada es uniformemente un pentamero mientras que la IgA es una mezcla heterogénea de dímero y monomero. La única respuesta que se ha dado a este hecho es que en las células secretoras de IgM la síntesis de la cadena J y de las subunidades IgM 7S está equilibrada de tal manera que ninguna se produce en exceso, mientras que en las células secretoras de IgA hay una deficiencia en la síntesis de cadena J, lo que puede producir la secreción de IgA en forma monomérica. (63)

Por otra parte se han realizado experimentos a fin de determinar la participación de interacciones no covalentes entre las subunidades de IgM. Así la reducción parcial y alquilación de IgM contiene material que sedimenta a 19S en condiciones no disociantes y que es disociado por SDS a material oligomérico (probablemente dímeros) y subunidades 7S. Es decir la IgM 7S alquilada puede asociarse con IgM oligomérica a través de fuerzas no covalentes para formar moléculas que sedimentan a 19S, por el contrario las formas monomérica y dimerica de IgA sedimentan separadamente. La conclusión obvia es que en la polimerización tanto de IgA como de IgM el paso inicial es la formación de un dímero con la inclusión de la cadena J. Para la IgM la posterior polimerización es promovida por interacciones no covalentes entre el dímero y subunidades monoméricas. En el sistema de la IgA tales interacciones son presumiblemente infrecuentes por lo que la polimerización posterior no esta favorecida.

1.3. ESTRUCTURA DE INMUNOGLOBULINAS Y FUNCIONES EFECTORAS.-

1.3.1. Aspectos generales.-

Las inmunoglobulinas se han revelado como uno de los efec

tores macromoleculares de funcionalidad más diversa de la naturaleza. Sin embargo, aún teniendo presente la bundante literatura sobre estructura de inmunoglobulinas así como de sus receptores de la superficie celular, virutalmente no se sabe nada acerca de las especificidades de tales interacciones a nivel molecular ni de los mecanismos por los que las inmunoglobulinas median sus funciones efectoras.

Practicamente todas las actividades efectoras se han localizado en las estructuras de la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina, pudiendo estar implicado en las mismas la porción oligosacarido.

En este sentido las inmunoglobulinas sirven como señales específicas para la activación de mecanismos menos específicas que tienen como fin la eliminación de antígenos extraños. Las estructuras Fc han evolucionado asimismo para proveer de un marcado grado de flexibilidad fisiológica en la respuesta inmune. Así varias clases de inmunoglobulinas pueden ser compartimentalizadas en tejidos secretorios, pasar de la madre al feto y neonato, regular su vida media en circulación y sistemas linfáticos. Estas estructuras de la región constante son responsables de las que han sido denominadas "funciones secundarias" de las inmunogkbulinas (64). Dado que sin estas estructuras no habría integración de la actividad de unión al antígeno con procesos biologicamente relevantes, no es suficiente considerar la unión al antígeno y las actividades efectoras en términos de funciones primaria y secundaria.

Si bien es cierto que sólo hay datos limitados sobre las estructuras de la región constante responsables de funciones efectoras es posible definir algunos aspectos de la proteína y oligosacarido que han sido conservados durante la evolución de inmunoglobulinas y que son por tanto importantes. Las porciones de la cadena polipeptídica a las que los oligosacaridos están unidos -

son marcadamente conservativas entre las clases de inmunoglobulinas. (65). Los análisis cristalográficos de rayos-X de las proteínas de mieloma New (66) y M603 (67,68) evidenciaron que algunas estructuras (secundaria y terciaria) de la molécula de inmunoglobulina se mantenían también invariantes. Por ejemplo, los ángulos de plegamientos en las cadenas H y L incluyen invariantes Gly con Pro Ser o Thr por su extremo amino. También se manifiesta como invariante el número relativo de restos hidrofóbicos por molécula (69). Los datos de análisis de secuencia primaria han demostrado asimismo que los enlaces disulfuro intracatenarios, si bien son diferentes para distintas especies, se correlacionan posicionalmente para dar estructuras tridimensionales globales de las cadenas κ y λ así como en las regiones constantes y variables de las cadenas H que son marcadamente similares.

Esta conclusión está además soportada por datos de microscopía electrónica (70) y representa la hipótesis expresada por Edelman y Gall en 1969 (71) de que las moléculas de inmunoglobulina se mantienen en una serie de dominios relativamente independientes cada uno compuesto por una o más de las regiones de homología secuencial. Así para las cadenas ligeras hay dos dominios, uno compuesto por la región variable V y el otro por la región constante C. Como muestra la figura nº 1 la cadena pesada tiene 4 dominios de aproximadamente 110 restos de aminoácidos cada uno. Uno lo forma la región variable V_H mientras que los otros tres lo forman las regiones de homología constante C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} (para la IgG, $C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2}$, $C_{\gamma 3}$). Cada dominio contiene un único puente disulfuro intracatenario y está unido a su dominio contiguo por unos tramos de cadena polipeptídica menos plegada haciendo a la molécula más susceptible a la digestión por proteasas en estas regiones interdominio. Las cadenas pesadas de IgM e IgE poseen un dominio C-terminal adicional lo que supone un potencial adicional de diversificación funcional (62). Estos estudios sugieren dos puntos muy importantes en la estructura y evolución de las moléculas de inmunoglobulina. Pri

mero, las regiones de homología pueden tener estructuras tridimensionales similares cada una constituida por un dominio globular compacto, hipótesis sustentada por datos de cristalografía de rayos-X (66,72). Segundo, la presencia de homología interna sugiere que los genes, tanto de las cadenas H como de las L, evolucionaron por duplicación de un gen ancestral que codificaría para una cadena polipeptídica con el tamaño de una única unidad de homología - (73) implicación que recientemente ha sido corroborada por Tonegawa (40).

Intuitivamente siempre se ha tratado de inferir a los cambios conformacionales en los sitios de unión al antígeno como la base de la transmisión de información mediada por el antígeno desde las porciones Fab a las Fc, que supone un mecanismo alostérico de transmisión de esta información. Sin embargo las alteraciones conformacionales resultantes de la unión al antígeno en inmunoglobulinas no se han podido interpretar inequívocamente. Los datos de dispersión rotatoria óptica y dicroísmo circular de los fragmentos Fab y Fc suponen que estos fragmentos poseen estructuras globulares similares a las que poseen en inmunoglobulinas intactas.(74). Sin embargo los fragmentos pFc' humanos, al contrario que los pFc' de conejo, sufren alteraciones significativas en su estructura secundaria tras su escisión de la IgG intacta(75). Dado que tanto los dominios V_L como los C_L aislados se pueden combinar in vitro con cadenas H intactas se supone que al menos los fragmentos proteolíticos más grandes mantienen sus estructuras nativas tras la digestión enzimática.

Estudios comparativos de viscosidad intrínseca y tiempos de relajación térmica entre IgG y sus fragmentos Fab y Fc son consistentes con la presencia de estructuras globulares similares - (semi-rígidas) unidas por "goznes" flexibles(76). Esta interpretación no es universal ni inequívoca para las inmunoglobulinas ni -

tampoco implica que estas estructuras sean idénticas dentro de una molécula.

Aunque hay evidencia generalizada de que las inmunoglobulinas son flexibles, al menos en su estructura general, recientes estudios indican que sutiles diferencias en flexibilidades internas (dentro y entre los dominios) pueden ser importantes para la expresión de sus actividades efectoras.(77). En este aspecto es interesante resaltar que desde un punto de vista evolutivo se va alcanzando un mayor grado de flexibilidad en la molécula de inmunoglobulina según se va ascendiendo en la escala evolutiva.(78).

1.3.2. Diferenciación funcional de los dominios de la región constante de las inmunoglobulinas.-

1.3.2.1. Funciones de los dominios C_L y C_{H1} .-

Dorrington y Painter (79) han propuesto una de las teorías más lógicas para la significación y funciones biológicas de los dominios C_{H1} y C_L . Estos autores teorizaron que las primeras regiones de homología constantes actúan como "espaciadores" entre el sitio de unión al antígeno y los otros dominios de la región Fc. No obstante la implicación funcional de estos dominios por el momento se desconoce.

1.3.2.2. Funciones de los dominios C_{H2} .-

La activación del sistema del Complemento es una de las funciones efectoras más importantes de las inmunoglobulinas. En el dominio $C_{\gamma 2}$ de la IgG reside la capacidad de activar el Complemento por la vía clásica medida como unión al primer componente de este sistema. Esta actividad tiene restricciones de clase y subclase. Así mientras que por ejemplo las IgG1 y 3 humanas, IgG1 e IgG2a de rata IgG2 de cobayo, IgG1 e IgG2b de ratón exhiben la capacidad de fijar Clq, las IgG2 y 4 humanas, IgG3 e IgG2b de rata, IgG1

γ 3 de cobayo e IgG3 de ratón no manifiestan dicha actividad o -- exhiben una afinidad por el Clq muy baja.(80)

Por otro lado, diversos estudios han mostrado que la región Cγ2 y las estructuras interdominio (con inclusión de los carbohidratos) están implicadas en el control de las velocidades catabólicas de IgG(80). Las vidas medias de los fragmentos Cγ2 y Cγ3 radiactivamente marcados indican claramente que el dominio Cγ2 - tiene la misma vida media que la IgG y que las estructuras de inmunoglobulinas implicadas en la activación del Complemento y adhesión a receptores Fc de macrófagos están probablemente separadas. Es probable que tanto el carbohidrato interdominio como las estructuras Cγ2 estén implicados en el control catabólico de IgG pero el grado de implicación no es conocido.(80)

1.3.2.3. Funciones de dominios C_H3 y C_H4.-

El dominio C_H3 se ha demostrado que está implicado en la unión a los receptores Fc de macrófagos. Diversos investigadores han aislado fragmentos de Fc humano correspondiente a los residuos 342-433 y 407-416. Mientras que estos péptidos inhiben la unión de eritrocitos, recubiertos de IgG, a receptores Fc de monocitos humanos los fragmentos pFc' de la IgG de cobayos no se unen a fagocitos mononucleares humanos.(81). Si bien una especificidad de especie no se descartaría se encuentra mayor confusión por el hecho de que eritrocitos recubiertos con Facb de IgG de conejo se unen a macrófagos alveolares de cobayas.(82). No obstante parece ser que para una óptima unión a los receptores Fc se requiere la cooperación - de las estructuras Cγ2 y Cγ3. Asimismo las pruebas de unión a la proteína A de *Staphylococcus aureus* indican que se unen específicamente los fragmentos Cγ2-Cγ3 pero no el Cγ2 aislado.(83).

1.4. INMUNOGLOBULINAS DEL CONEJO.-

En el conejo se han detectado 4 clases de inmunoglobulinas: G, A, M y E, de las que solo la IgG presenta 2 subclases una de las cuales, el componente menor, está normalmente en cantidades muy pequeñas en el suero. La tabla nº 2 recoge las propiedades físicas más importantes de las moléculas IgM, IgA e IgE del conejo.

La tabla nº 1 recoge los marcadores alotípicos de las inmunoglobulinas de conejo y su asociación con las clases de cadenas H y los tipos de cadena L. Los determinantes alotípicos que se comportan como controlados por genes alélicos están expuestos como un grupo.

Como se evidencia en la tabla nº 1 el polimorfismo genético o alotipia se observa en las cadenas L de conejo de ambos tipos Kappa y Lambda, y en las regiones constantes C_H de la IgG, IgM e IgA. Además un conjunto de diferentes marcadores alotípicos se localiza en las regiones V_H . Los mismos marcadores de la región V_H están presentes en todas las clases de cadenas H estudiadas IgG, IgM, IgA e IgE, lo que viene a indicar que el mismo conjunto de genes V_H es compartido por todas las clases de cadenas pesadas.

1.5. INMUNOGLOBULINA G DE CONEJO.-

1.5.1. Descripción.-

Esta clase de inmunoglobulina representa casi el 90% de las inmunoglobulinas en el suero del conejo normal. Las moléculas de IgG de conejo son capaces de fijar Complemento de cobayo, son las únicas de entre el resto de las clases de inmunoglobulinas, capaces de atravesar la barrera placentaria, y son asimismo capaces de fijarse a la piel de cobayas produciendo anafilaxis cutánea pasiva tras la introducción del antígeno.

La tabla nº 3 recoge las propiedades principales de las IgG de cuatro especies de mamíferos.

TABLA Nº 2. PROPIEDADES DE LAS INMUNOGLOBULINAS DEL CONEJO

<u>INMUNOGLOBULINA</u>	<u>P.M.</u> <u>×10⁵D</u>	<u>CHO</u>	<u>ESTRUCTURA</u>	<u>COEF.SED.</u>	<u>MOV.ELECT.</u>	<u>FL.FISIOL.</u>
IgM	9.0	11	5(H ₂ L ₂) ₂ J; 5 Dominios/μ	19 S	β ₂	suero
IgA	3.7	7	2(H ₂ L ₂) ₂ + J + CS; 4 Doms./α	11 S	β	calostro
IgE ^E	2.0	11.5	H ₂ L ₂ ; 5 Dominios/ε	8 S	γ rápida	suero
IgG	Ver apartado nº 1.5.					

H: cadenas pesadas; L: cadenas ligeras; J: cadena J (15000 D); CS: componente secretorio
70000 D; &: datos deducidos por analogia con la IgE humana; CHO: contenido en % en Hidratos
de carbono.

Tabla 3.—SUBCLASES DE IgG EN CUATRO ESPECIES DE MAMIFEROS

ESPECIES	Subclases de IgG	Esquemas "dibujos" intercalenáticos	Concentración estimada en el suero de adultos normales (mg/dl)	Vida media en suero (días)	Elación de complemento
CONEJO	IgG		10-15	5.5-8	+
	Ig G1 (Componente menor)				
COBAYO	Ig G1 Ig G2		0.3-1 5-30	7 5	- +
	RATON	Ig G1		0.3-4	25
Ig G2a				51	+
Ig G2b			0.8-5	28	+
CABALLO	Ig G3		0.1-0.2	4	-
	Ig G4 Ig Gb Ig Gc Ig G(T) (75 y 105) Ig M				+
			13-16	19-25	+
			3-6		-
			<0.1	-	

La vida media de la IgG del conejo en circulación es aproximadamente de 6 días.

Esta inmunoglobulina posee un coeficiente de sedimentación de 7S, un peso molecular de 150000-160000 Dalton. Porter en 1958 (84) demostró que la digestión de esta molécula con papaina produce tres fragmentos, dos Fab y un Fc, con propiedades diferentes. El Fab posee capacidad de unión al antígeno (ab por antigen-binding), tiene un peso molecular de aproximadamente 45000 Dalton, es univalente y carece de la capacidad de precipitar antígenos macromoleculares o aglutinar antígenos particulados pero en exceso puede bloquear la aglutinación o precipitación de antígenos por anticuerpos bivalentes. Este fragmento comprende la cadena L completa y la mitad N-terminal de una cadena H, designada como fragmento Fd unidas por fuerzas no covalentes y por un puente disulfuro. Por el contrario el fragmento Fc (c por su posibilidad de cristalizarse) es la región efectora para el Complemento, presenta una gran homogeneidad y comprende las mitades C-terminales de las dos cadenas pesadas que abarcan los dominios C_{H2} y C_{H3} y la región gozne.

La susceptibilidad de una región particular en el medio de la cadena H, a la ruptura enzimática por papaina, pepsina y otras enzimas, hizo pensar que esta región tendría que estar poco protegida y se la designó como región gozne o bisagra, ya que esta región permite la flexibilidad de los dos fragmentos univalentes, Fab, en el espacio uno en relación con el otro, entendiéndose que el punto de apoyo está situado en esta zona. Esta flexibilidad facilita la unión bivalente de un único anticuerpo a un antígeno particulado o alternativamente la unión de dos antígenos particulados, de la misma especificidad, con el anticuerpo.

Cada cadena L está unida a la H por un puente disulfuro y por fuertes uniones no covalentes. En la molécula nativa las cadenas H están unidas una con otra a través de un enlace disulfuro y

uniones no covalentes en el C_H3 de la porción Fc de la molécula..

El tamaño de la cadena L en vertebrados a través de la escala filogenética es bastante (22000-23000 Dalton). Además hay fuertes homologías en las secuencias de aminoácidos de las cadenas L, aplicable asimismo a las cadenas H. Igualmente homologías definidas son observadas cuando se comparan las secuencias de las cadenas H y L. Lo que sugiere que haya gen ancestral común para todas las inmunoglobulinas.(85)

Es evidente que la cadena L, puede ser entendida como compuesta por dos regiones, de aproximadamente el mismo tamaño, son semejanzas estructurales entre las dos mitades siendo la principal de estas los puentes disulfuro intracatenarios que están localizados aproximadamente entre las Cys 20 y 85 y entre las Cys 135 y 195 dando lugar a la existencia de dos asas o bucles compuestos cada uno por 60-65 aminoácidos y de los cuales uno se encuentra en la región variable y el otro en la constante. Una quinta Cys forma un puente disulfuro con otra Cys de la cadena H. La mitad N-terminal de la cadena se conoce como la región variable V_L y la mitad C-terminal como C_L (C de constante). Los términos usados para denominar estas regiones son los de "dominio o unidad de homología". La cadena H de la IgG de conejo está constituida por cuatro dominios de aproximadamente 115 aminoácidos cada uno.

El locus de controla los determinantes antigénicos de la región C_H de la IgG del conejo (86,87). El locus es designado de en base que un sólo gen controla al segmento C_H de la cadena pesada. Se han identificado dos genes alélicos d^{11} y d^{12} . Las cadenas pesadas de alotipo d^{11} poseen una Met en la región gozne en la posición 225, adyacente a la hemicistina que forma el enlace disulfuro intercatenario H-H. Las moléculas de alotipo d^{12} poseen Thr en el lugar de Met en esta posición. Los marcadores alotípicos en las regiones V_H y C_H de una única molécula de IgG están determinados

por genes situados en un mismo cromosoma pero separados.

Dubiski en 1969 (86) demostró la existencia del locus e - como controlador de varios determinantes alotípicos los e14 y - e15. Por otro lado Hamers y Hamers-Casterman han demostrado la existencia de nuevos determinantes alotípicos en algunas, no todas las moléculas IgG de conejo con determinantes al en la región V_H . Estos son el A8 y A10 localizados en el segmento Fc, cuya relación con los grupos d y e no ha sido aún establecida.

1.5.2. Rotura enzimática por papaina y pepsina.-

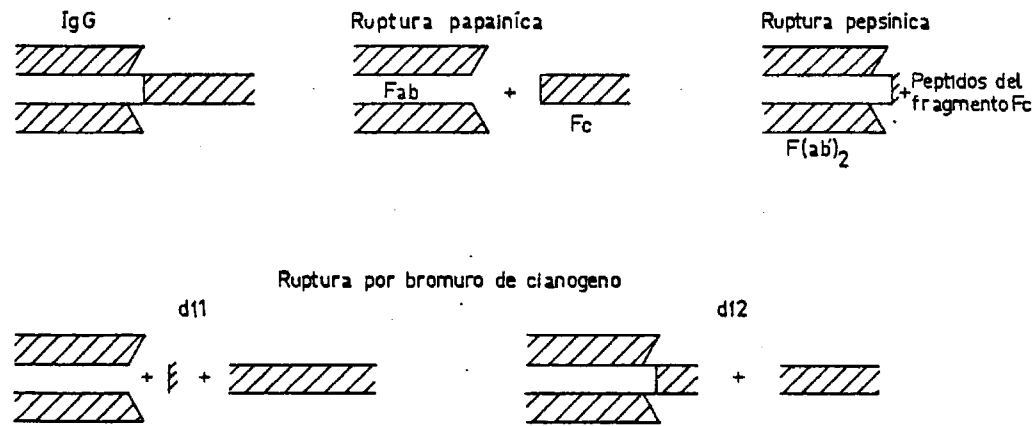
Empezando con el trabajo de Parfentjev en 1936(88) muchos investigadores han tratado a las inmunoglobulinas con enzimas y - estudiado las propiedades de los principales fragmentos producidos. A finales de la década de los 50 Porter (84,89) realizó unos trabajos que supusieron un importante avance en inmunoquímica, así como una base para estudios de estructura de macromoléculas.

La Fig, nº 5 nos muestra los fragmentos principales obtenidos por la digestión de IgG por pepsina, papaina y BrCN.

El tratamiento a 37°C de la IgG de conejo a pH neutro con papaina cristalizada en relación 0.1-1% en peso y en presencia de agentes reductores, producía la ruptura de la molécula en tres fragmentos de aproximadamente el mismo peso molecular 45000-50000 Dalton (84,89). Dos de los fragmentos se designaron como Fab y el tercero como Fc. Anteriormente descritos.

La pepsina produce asimismo, grandes fragmentos, que conservan la capacidad de unión al antígeno (90). Esta proteólisis - se lleva a cabo a pH ligeramente ácido 4.0-4.5, dado que a pH superiores la enzima se inactiva espontáneamente, y a pH más bajos el mantenimiento de la estructura de la inmunoglobulina comienza

FIG. 5...
RUPTURA DE LA IgG DE CONEJO POR PAPAINA, PEPSINA (45 pH),
 O BROMURO DE CIANOGENO (EN SOLUCION DE HCL)



á perderse, exponiendo numerosas secuencias de la cadena polipeptídica susceptibles a la digestión por la enzima. La digestión se lleva a cabo durante 18-24 horas a 37°C.

Aunque la pepsina, al igual que la papaina rompe la inmunoglobulina por la región gozne, esta produce un fragmento bivalente con preferencia sobre el monovalente, porque rompe por un péptido situado a la derecha del puente disulfuro inter H-H, más próximo a la extremidad C-terminal que el que es atacado por acción de la papaina. Este fragmento se designó como $F(ab)_2$ y tiene un peso molecular aproximado de 96000 Dalton y un coeficiente de sedimentación de 4.6S. Siendo bivalente, es tan efectivo como la IgG intacta en la precipitación o aglutinación del antígeno.(90, 91).

En contraste con la IgG humana un único puente disulfuro inter H-H mantiene unidos los dos fragmentos Fab'(92,93).

El fragmento Fc es degradado por la pepsina, en péptidos heterogeneos cuyos tamaños dependen de las condiciones y duración de la digestión. Uno de estos fragmentos, de peso molecular 27000 Dalton, no está unido por enlaces covalentes, y se ajusta muy aproximadamente a los dominios C_H3 de la molécula de inmunoglobulina(94) y se le conoce como el fragmento pFc'.

Si dos fragmentos de Fab' de diferentes moléculas de IgG se unen químicamente para darnos $F(ab)_2$ híbrido, este es funcionalmente monovalente, sin embargo frente a una mezcla de los dos antígenos que produjeron las dos especies de IgG, se comporta como bivalente en el sentido de que posee sitios combinantes frente a las dos clases de antígenos.(95)

1.5.3. Proteólisis limitada de la IgG por otras enzimas y agentes químicos.-

Otras enzimas, distintas de la papaina y pepsina, rompen la IgG produciendo fragmentos de interés, más o menos similares a los producidos con papaina y/o pepsina.

Así, la ficina produce fragmentos idénticos, por varios criterios, a los producidos por la papaina,

Givol, por digestión triptica produjo fragmentos en cierto modo similares a los producidos por la papaina, si previamente la IgG estaba suavemente reducida y aminoetilada.(96)

Las catepsinas D y E de conejo, obtenidas del pulmón y médula ósea respectivamente, rompen la IgG en fragmentos muy aproximadamente iguales al fragmento $F(ab)_2$ producido por la pepsina. (97).

Connell y Porter (98) tras el tratamiento de la IgG del conejo con plasmina humana o de conejo a pH neutro obtuvieron un fragmento que suponía toda la IgG excepto los dos dominios C_{H3} , - cuando previamente la molécula de inmunoglobulina estuvo expuesta a pH 2.5 durante una hora. La ruptura tiene lugar entre la Lys - 326 y la Ala 327. El fragmento obtenido, denominado Fab_c , retiene la capacidad para formar precipitados específicos y fija Complemento.

El tratamiento de la IgG de conejo con papaina, a muy bajas concentraciones y corto tiempo de incubación, produce con bajo rendimiento, otro fragmento que resulta de la ruptura por la región gozne de una de las dos cadenas H y que supone un segmento - completo de Fab y el Fc un fragmento similar derivado de la IgG1 humana se ha denominado Fab_c (99,100).

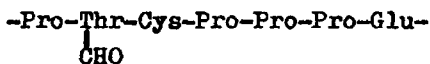
Aunque las cadenas H de conejo poseen cuatro o cinco Met, la ruptura por el bromuro de cianógeno tiene lugar fácilmente por

La Met localizada en la región C-terminal próxima a la región gozne, produciendo un fragmento designado $F(ab)_2$ que es ligeramente mayor al $F(ab)_2$, en el que los dos fragmentos Fab' están unidos por el puente disulfuro que une las dos cadenas H. Las moléculas con alotipo dl1 poseen una Met adicional en la posición 215, junto en el N-terminal del puente disulfuro inter H-H, y en condiciones suaves el BrCN rompe también por esta posición dando lugar a un fragmento monovalente 3.5S además del 5S producido en las moléculas de alotipo dl2 en estas mismas condiciones. (101,102)

1.5.4. Contenido en hidratos de carbono de la cadena pesada de la IgG del conejo.--

El principal oligosacarido presente en todas o casi todas las moléculas de la IgG de conejo está unido a una Asn de la porción Fc, en la posición 297, posición que se corresponde con la de unión de un oligosacarido similar en la IgG1 humana. El oligosacarido comprende 5 glucosaminas, probablemente acetiladas, 2 galactosas, 5 manosas y aproximadamente una fucosa y un resto de ácido siálico.(103)

Un segundo hidratos de carbono presente aproximadamente en el 40% de las cadenas del conejo está unido covalentemente a una Thr de la región gozne en la posición 225.(104)



Esta Thr está asociada al alotipo dl2, y en moléculas de alotipo dl1 está sustituida por una Met. Este oligosacárido está constituido por una galactosamina, probablemente su N-acetil derivado, que se une a la Thr, una galactosa, y 2 restos de ácido siálico.

Fanger y Smyth (104) relataron la interesante observación de que una molécula de IgG es asimétrica con respecto a este hi-

hidratos de carbono que sólo se une a una cadena H.

Aproximadamente el 15% de las cadenas H de la IgG de conejo normal poseen un tercer hidrato de carbono que es pequeño y contiene glucosamina, cuya localización no está perfectamente delimitada, si bien se sabe que está situado en la región V_H .(105)

1.6. PAPEL DE LOS PUENTES DISULFURO EN LA ESTRUCTURA DE PROTEINAS.

Genericamente las proteínas se pueden clasificar en a) - aquellas que poseen puentes disulfuro (-S-S-), b) aquellas que poseen grupos sulfhidrilo (-SH), c) otras, menos numerosas, tienen a la vez ambos grupos y d) otras que no contienen azufre: glucagón, histonas, colágeno, fibroína de la seda.(106)

En el seno de una proteína el papel de los grupos S-S y -SH difiere considerablemente. Así los grupos -SH establecen uniones de baja energía, bien como puentes de hidrogeno, si existen grupos aceptores en posición adecuada o bien como uniones hidrofóbicas debidas al caracter apolar del -SH en la forma protonada. Los grupos -S⁻ exhiben una alta reactividad química con tendencia a formar uniones covalentes. Los grupos -S-S- son estables y relativamente poco reactivos, contribuyen a la geometría espacial de la molécula restringiendo las posibilidades de repliegue de la cadena polipeptídica dando además una gran rigidez a la estructura terciaria al mismo tiempo que le confiere una estabilidad adicional. La importancia estructural de los puentes disulfuro es bien reconocida hoy día, aunque su papel no se ha precisado más que para dos proteínas, la insulina y la ribonucleasa. En la mayor parte de las proteínas su función es todavía discutida.

Los grupos -S-S- y los -SH pueden dar reacciones de intercambio produciendo modificaciones conformacionales más o menos importantes.

1.6.1. Longitudes y ángulos de enlace de los puentes disulfuro y de los grupos tioles.-

La tabla nº 3 recoge algunas características de los enlaces del azufre comparados con los del oxígeno. Y la tabla nº 4 los ángulos de enlace del azufre con algunos átomos.

Los orbitales de valencia del azufre no son puros px y - py sino que son híbridos, el ángulo X-S-X' no es de 90°. La hibridación de los orbitales de unión 3p del azufre con sus 3s está favorecida en enlaces entre azufre y carbono, especialmente con orbitales sp₂ del carbono. La gran diferencia de ángulos entre el C-S-H y el C-S-C comparados con el C-O-H (109°) y C-O-C (110°) muestra que en el caso del oxígeno no hay aumento de hibridación al sustituir el enlace O-H, en cambio sí la hay en el azufre. Esto se podría explicar porque el S es mucho más nucleófilo que el O₂. Las mismas consideraciones muestran por qué los disulfuros son tan estables, debido a que la longitud del enlace S-S en los disulfuros es muy similar a la del enlace S-C en los sulfuros, así como los ángulos de enlace S-S-C y C-S-C.

Los disulfuros difieren de los sulfuros en que tienen una restricción en la rotación libre de los átomos vecinos al S-S con una barrera de aproximadamente 10-20 Kcal.(107). Una posible explicación es que el enlace disulfuro en su estado fundamental puede presentar un cierto carácter de doble enlace resultante de la interacción de los electrones de orbitales p de un átomo de azufre con los orbitales del átomo adyacente. También podría deberse a la repulsión de dos pares adyacentes de electrones p. (108). Debido a esta restricción hay un ángulo preferido de los dos ejes S-C de un disulfuro simple de 90° (ángulo diedrico) ver figura nº 6. La restricción no es suficiente para permitir la separación en isómeros cis-trans aunque estos se han obtenido en el caso de trisulfuro.(107). Los análisis de difracción de rayos

Tabla nº4. CARACTERISTICAS DE LOS ENLACES DE AZUFRE
COMPARADOS CON LOS DEL OXIGENO

Parámetro	Enlace	X=Azufre	X=Oxigeno
Longitud de enlace (A)	X-H	1.33	0.96
	X-X	1.8-1.9	-
	X-C	1.82	1.43
Energía de disociación (Kcal/mol)	X-H	89	100
	X-X	73	40-45
	X-C	73	47
Electronegatividad (Li=1)	X	2.6	3.5

Tabla nº 5. ALGUNOS ANGULOS DE ENLACE CON EL AZUFRE

Compuesto	Enlace	Angulo de enlace
Sulfuro de hidrógeno	H-S-H	92°20'
Tiol alifático	H-S-C	100°
Sulfuro alifático	C-S-C	105°
Tiol aromático	H-S-C	109°
Disulfuro	S-S-C	103°- 107°
Trisulfuro	S-S-S	105°

X muestran también que hay una forma de enlace S-S seleccionada por encima de las otras en cristales de cistina y algunas proteínas.(109)

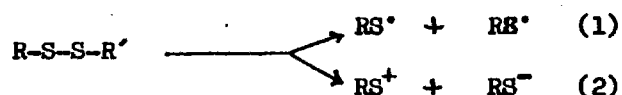
La presencia de puentes disulfuro impondrá, por tanto, - restricciones en la geometría de la molécula. Si se considera como fija la unión C-S horizontal, la posición permitida de los otros átomos de C y S estará reducida a trazar un cono por rotación de la unión C-S fija. Por tanto, la presencia de puentes S-S impone torsiones importantes a la cadena polipeptídica.

Según Fieser (110). la unión S-S en proteínas está apoyada por la formación de enlaces de Hidrógeno. De esta forma, los átomos no pueden ya girar y quedan fijos en una posición determinada. Fieser admite la existencia de estos enlaces de hidrogeno para explicar la diferencia de poder rotatorio entre la Cys y la Homocys. Este hecho es importante para interpretar las variaciones de poder rotatorio en el curso de la desnaturalización de - proteínas que contienen puentes S-S susceptibles de romperse por cualquier agente desnaturizante.

1.6.2. Reactividad química de los puentes disulfuros.-

La mayoría de los agentes que reaccionan con los puentes disulfuro producen la escisión de estos. Por oxidación completa se produce ácido sulfónico y por reducción completa, tioles.

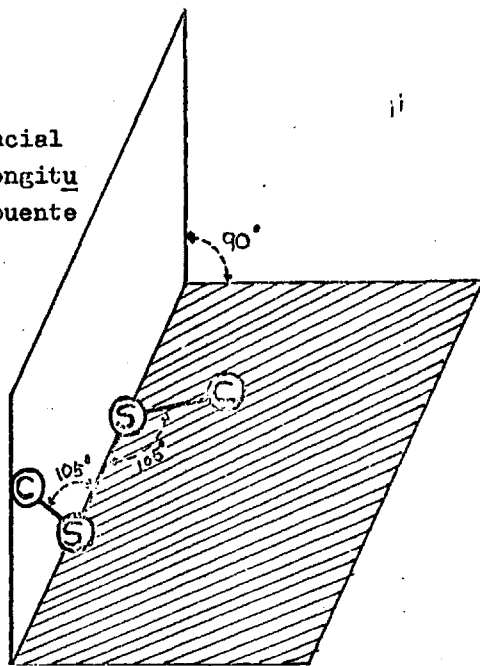
Esta ruptura puede ser homolítica (1) o heterolítica(2)



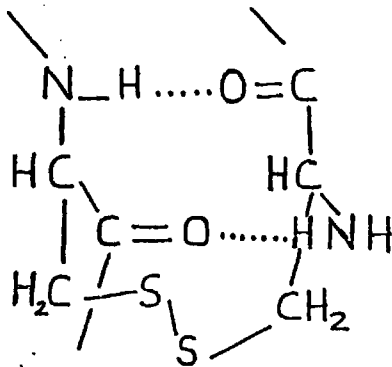
A su vez la heterolítica puede resultar de un ataque por agentes electrófilos (3) o nucleófilos (4).(111):

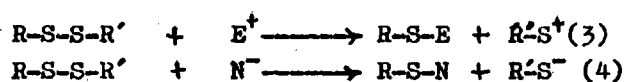
Fig. nº 6.

a) Representación espacial de los ángulos y longitudes de enlace del puente disulfuro



b) Estabilización de la unión S-S por enlaces de Hidrógeno.



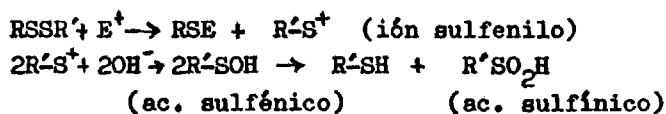


1.6.2.1. Ruptura homolítica.-

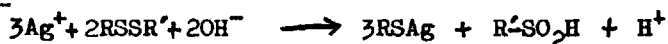
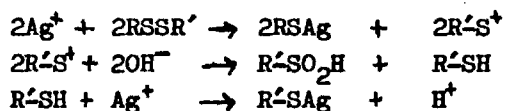
Solo se producen radicales libres por irradiación. La ruptura es más fácil en solución acuosa debido al ataque por el H[•] formado por la fotólisis inicial del agua, $\text{R-S-S-R}' + \text{H}^{\bullet} \longrightarrow \text{RSH} + \text{R}'\text{S}^{\bullet}$. Debido a la formación de radicales libres los disulfuros pueden catalizar gran número de reacciones de radicales libres por irradiación. De particular interés es la adición a dobles enlaces, así los disulfuros aromáticos se adicionan a olefinas por irradiación, cosa que no ocurra con disulfuros alifáticos.(112)

1.6.2.2. Ruptura electrófila.▼

El ataque sobre disulfuros produce inicialmente el ión sulfenilo R-S que en soluciones neutras o alcalinas se combina con iones hidroxilo libres para formar el ácido sulfénico que es inestable y da lugar a ácido sulfinico y tioles.



Los iones metálicos tales como el Hg_2^{2+} y el Ag⁺ escinden el puente disulfuro según este mecanismo de escisión(113):

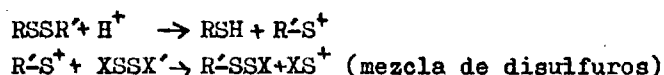


La velocidad de ruptura electrofílica por estos iones me

tiólicas muestra una gran dependencia según el disulfuro:

Homocistina } GSSG } Cistina } Cistamina

La ruptura con iones H⁺ ocurre sólo en medios fuertemente ácidos, donde debido a la escasez de OH⁻, el R-S⁺ puede permanecer como ión estable. Así en HCl 9N tenemos (114):



1.6.2.3. Ruptura nucleófila.-

Los agentes nucleófilos reaccionan con los disulfuros - por desplazamiento de una unión tiol RS⁻



La S-nucleófila de Y⁻ sigue el siguiente orden (115): hidruros } arsenito y fosfina } tiol alcalino } tioglicolato } p-nitrogenol } tiomefato } tiocianato. No obstante en proteínas pueden intervenir efectos culombicos dependientes del pH sobre grupos cargados próximos al disulfuro, efectos estéricos de sustituyentes sobre el átomo de carbono que soporta el puente disulfuro, pudiendo alterarse el orden expuesto.

La tabla número 6 recoge las reacciones mas importantes de los puentes disulfuro.

1.6.2.4. Reducción de los puentes disulfuros.-

La reducción de los puentes disulfuro por compuestos tiólicos de bajo peso molecular es con mucho el procedimiento más selectivo para la ruptura de los puentes disulfuro.

El 2-mercaptoetanol ha sido uno de los agentes más utilizados para este fin (116). Los grupos tiólicos producidos en la

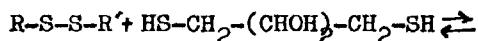
TABLA N°6... REACCIONES DE INTERES DE LOS DISULFUROS

REACCION	AGENTE REACTIVO	PRODUCTO	REFERENCIA
Oxidación	HCOOH	2 R-SO ₃ H	Hire, 1967 (116)
Extensión del puente S-S	Hg ²⁺	$2 (R-SH_2^+) \rightleftharpoons R-S-Hg-S-R + H_2^{2+}$	David y col. 1974 (117)
Intercambio de disulfuros	R-S-S-R	Prot-S-S-R + R-S-S-Prot'	Smithies y col. 1965 (118)
Mezcla de disulfuros	$\begin{array}{c} \text{P} \\ \parallel \\ \text{S}-\text{P}-\text{O}^- \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	Prot'-S-S-P-O ⁻ + S-Prot	Neumann y col. 1967 (119)
Producción de Lantionina	CN ⁻	$\begin{array}{l} \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}^- + \text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{CN} \\ \downarrow \text{OH}^- \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{CN} + \text{CH}_2=\text{C}^- + \text{SCN}^- \end{array}$	Cestsimpoles y Wood 1964 (120)
Reacción con sulfito	SO ₃ ²⁻	Prot-S-SO ₃ ⁻ + Prot-S ⁻	Azari 1966 (121)
Hidrólisis alcalina	OH ⁻	$\begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{C}^-\text{O}^-\text{C}=\text{CH}_2 \\ \text{S} + \text{HC}^+\text{CH}_2\text{S}^- \leftarrow \text{HC}^+\text{CH}_2\text{SS}^- \end{array}$	Danely, 1966 (122)

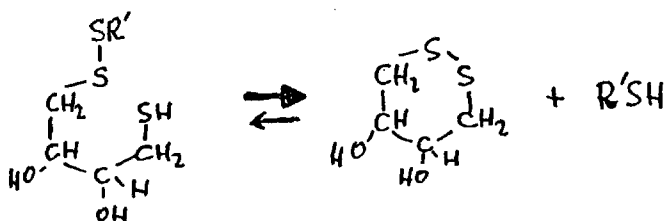
molécula de proteína rápidamente se reoxidan en el aire para volver a formar los puentes disulfuro. La alquilación, por iodoacético o iodoacetamida, de los grupos -SH formados es uno de los procedimientos más utilizados para prevenir la reoxidación de los puentes reducidos dado que la S-carboximetilcisteína formada es estable a la hidrólisis ácida, pudiendo detectarse por análisis de aminoácidos. No obstante la carboximetilación puede darse además en los grupos tioeter, imidazol, -OH fenólicos, y aminos.

Las S-carboximetilaciones de cisteína se llevan a cabo en un rango de pH comprendido entre 7 y 8.5. A este pH los grupos -tiólicos reaccionan mucho más deprisa que el resto de los grupos nucleófilos en proteína, en el rango 7-10 de pH los grupos amino se alquilan por iodoacetamida aunque su mayor modificación se produce por encima de 8.5, los residuos de histidina reaccionan preferentemente a pH 6, y la metionina se modifica por halosacetatos a pH ácidos 2-3. Es decir si bien es cierto que a pH 7-8.5 las -carboximetilaciones de otros grupos están muy disminuidas no por ello se deben descartar. (123)

Asimismo, tanto el ditiotreitól (DTT) como el ditioneritritol (DTE), los isómeros treo y eritro del 2,3-dihidroxi-1,4-ditioibutano, producen la reducción completa de los puentes disulfuro - en varios minutos a pH 8 (124) según el siguiente proceso.



El disulfuro producido en la reacción (a) evoluciona para formar el disulfuro cíclico estericamente favorecido, reacción - (b)



Otros agentes como las trialquilfosfinas (tris-hidroximetil-fosfina y tris-carboxietil-fosfina), borohidruro sódico, diborano son capaces asimismo de producir la reducción del puente disulfuro si bien una forma menos selectiva que los ditioles anteriormente considerados. En este sentido Cecil y Weitzman (125) obtuvieron por electroreducción la reducción completa de los enlaces disulfuro de la insulina, ribonucleasa, quimotripsina, tripsina, y albumina bovina.

1.6.3. Papel de los puentes disulfuro en inmunoglobulinas.-

Los puentes disulfuro desempeñan un papel estructural de terminante en las proteínas nativas. Las condiciones estéricas del enlace S-S imponen restricciones importantes a la cadena polipeptídica en el establecimiento de la estructura terciaria, confiriendo una gran rigidez. El carácter covalente del enlace S-S supone una contribución importante a la estabilidad de la estructura macromolecular.

Del estudio de los puentes disulfuro en la insulina y ribonucleasa se ha derivado la clasificación de estos puentes en - "intracatenarios" como es el caso de los existentes en la ribonucleasa, e "intercadenarios" como se da en la insulina.

Todas las inmunoglobulinas poseen ambos tipos de puentes. La importancia de los enlaces disulfuro inter e intracatenarios en la estructura y función de las inmunoglobulinas ha sido objeto de investigación durante casi dos décadas. Como resultado de muchos estudios parece evidente que la mayor parte de las actividades efectoras de las inmunoglobulinas son inhibidas por la reducción de los puentes disulfuro. Así, la capacidad de fijación de Complemento se pierde tras la reducción suave de los puentes (126 127), no obstante en lo que respecta a esta actividad efectora hay trabajos que indican que tras la reducción del Fc de la IgG -

humana no sólo no se pierde esta actividad sino que aumenta (128), la unión al receptor Fc de la placenta no se afecta por reducción de la IgG pero el fragmento Fc suavemente reducido por mercaptoetanol no produce dicha unión. (129) Estudios de unión de la IgE humana a mastocitos muestran que la reducción de 4 ó 5 de los puentes disulfuro más lábiles depleciones sus propiedades citotrópicas (130), y resultados más recientes (131) sugieren que la unión de IgG humana a los receptores Fc de neutrofilos humanos requiere asimismo Fc no reducido. Similarmente, la reducción suave y posterior alquilación de 1 ó 2 puentes disulfuro de anticuerpos IgG de conejo y muridos produce un rápido aclaramiento de las macromoléculas de circulación(80).

En general, la pérdida de las funciones efectoras de las inmunoglobulinas tras la reducción de los puentes disulfuro se piensa que está relacionada con un incremento en la flexibilidad estructural de los dominios de la región constante. Isenman y col. (127) sugieren que la reducción de los disulfuros incrementa la flexibilidad segmental de los dominios de la IgG lo que determinaría que las porciones Fab bloqueasen más fácilmente el sitio de unión al Clq. En este mismo estudio se mostró que la porción Fc de la IgG4 humana (subclase que no fija Complemento) une Clq tanto como el Fc de la IgG1, lo que sugiere que el Fab de la IgG4 - bloquee la unión de Clq, en la molécula completa, por impedimento estérico entre las regiones Fab y Fc. Por otro lado Takatsu y col (130) evaluaron la afinidad de la IgE reducida hacia células blanco y sugirieron que las conformaciones del Fab pueden influenciar en la conformación de los sitios de unión localizados en la región Fc.

Recientemente Romans y col. (132) han sugerido un incremento de la flexibilidad interna dentro de los dominios Fc de anticuerpos no aglutinantes dirigidos contra antígenos de la superficie de eritrocitos que, tras la reducción se comportan como a-

glutininas. Este cambio se interpretó como debido al aumento de la separación de los sitios combinantes (distancia de los extremos de la forma -Y) que permite de esta forma la unión entre células adyacentes. La importancia de la rigidez intradominio ha sido sugerida también por Chan y Cathou (133) analizando los perfiles de depolarización de la fluorescencia de la IgG reducida y no reducida.

La susceptibilidad diferencial de los puentes disulfuro de la IgA e IgM, la extremada labilidad de los disulfuros de la IgE e IgD, y el polimorfismo observado con los puentes intercatenarios (p. ej. la IgG1 humana tiene 2 mientras que la IgG3 11) sugieren papeles biológicos para tales puentes. Sin embargo, aún no hay datos suficientes para formar firmes conclusiones. En general los enlaces disulfuro parecen desempeñar un papel integral pero indirecto en la estabilización de estructuras de inmunoglobulina implicadas en actividades efectoras así como en la estabilización de los sitios combinantes del antígeno. (134,80)

1.7. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.-

En la sangre de los vertebrados existen diversos sistemas de activación necesarios para la supervivencia de los mismos. Estos sistemas, clasificados en 1969 por Mc Farlane (135) como "sistemas plasmáticos activados en cascada", entre los que además del Complemento están incluidos los sistemas de coagulación y fibrinolisis, generadores de kininas y el de la renina-angiotensina, dependen todos ellos, al menos en parte, de la activación secuencial de una serie de zimógenos proteolíticos.

El Complemento es el más complejo de todos ellos y es de interés por diversas razones. Primero, como ya se evidenció hace 80 años (136), el sistema del Complemento es responsable de la destrucción y eliminación de sustancias extrañas al organismo principalmente bacterias y virus. Esto ocurre habitualmente tras

la interacción de los anticuerpos con las sustancias u organismos extraños, y el Complemento actúa, así como el mecanismo efector en la defensa inmune contra la infección. El Complemento puede ser activado por polisacáridos complejos (137) tales como los presentes en las paredes de levaduras y bacterias, antes incluso de reacciones con los anticuerpos, por lo que puede constituir una defensa inmediata contra la infección antes del desarrollo de la inmunidad (138).

Segundo, receptores para proteínas del Complemento activadas, tales como el componente C3 del mismo (C3b) están presentes en la membrana de macrófagos, linfocitos y algunas otras células como las polinucleares (139,140), existiendo evidencia, aunque incompleta, de que los receptores para C3 en el linfocito pueden desempeñar un papel importante en la interacción de las diferentes clases de linfocitos o sus células precursoras (141). La interacción entre linfocitos B y T es necesaria para la expresión de la respuesta inmune y es posible que el complemento pueda desempeñar un papel central en la respuesta inmune además de actuar como principal mecanismo efector.

Tercero, se ha encontrado que varias proteínas del Complemento están codificadas por genes que se hallan en el locus del "principal complejo de histocompatibilidad" tanto en el hombre como en el ratón (142). El significado biológico de estos hallazgos, no está claro, pero se ha sugerido (143) un posible papel como proteínas de superficie a algunas de las proteínas del Complemento, como todas las otras proteínas codificadas por este complejo genético.

El Sistema del Complemento incluye alrededor de 20 proteínas séricas, la mayor parte de las cuales forman parte de la secuencia de activación, estando incluidas asimismo las proteínas de control que actúan inhibiendo diferentes pares o inactivando

Tabla n° 7 .- Propiedades fisico-químicas de los componentes del sistema del complemento.

VIA CLASICA	PESO MOLECULAR	MOVILD. ELECTRF.	CONCTR. SERICA	FRAGMENTOS DE ESCISION
			g/ml	
C1q	390 000	α_2	190	
C1r	188 000	β	*	
C1s	110 000	α_2	120	
C4	209 000	β_1	430	C4a, C4b, C4c, C4d
C2	117 000	β_2	30	C2a, C2b
C3	210 000	β_1	1300	C3a, C3b, C3c, C3d
C5	206 000	β_1	75	C5a, C5b
C6	95 000	β_2	60	
C7	120 000	β_2	*	
C8	163 000	α_1	*	
C9	79 000	α	160	
VIA ALTERNATIVA				
B	100 000	β_2	240	Ba, Bb
D	23 500	α	1-5	
P (properdina)	223 000	α_2	25	
PROTEINAS DE CONTROL				
C1-INH	105 000	α_2	180	
C3b-INA	100 000	β_2	25	
β_1 H	150 000	β_1	450	

* no se conoce

Tabla n° 8.- Actividades biologicas del sistema del complemento.

COMPONENTE O FRAGMENTO	FUNCION BIOLOGICA
C1	Incrementa la asociacion de complejos Ag-Ac
C14,C1423	Neutralizacion virica
C4b	Inmunoaderencia y aumento de la fagocitosis
C3a	Liberacion de histamina Incremento de la permeabilidad capilar Contraccion de musculo liso Liberacion de enzimas lisosomales
C3e	Induccion de leucopenia y leucocitosis
C3b	Activacion de la via alternativa del complemento Inmunoaderencia via receptores sobre linfocitos y celulas fagociticas Aumento de la opsonizacion Aumenta la induccion de la formacion de anticuerpos Incrementa la citotoxicidad celular dependiente de anti-cuerpo Induce la liberacion de leucocitos de la medula osea
C3d	Inmunoaderencia via receptores sobre macrofagos y linfocitos
C5a	Liberacion de histamina Contraccion de musculo liso Incremento de la permeabilidad capilar Quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrofagos
C5b	Opsonizacion de hongos
C6	Promueve la coagulacion sanguinea
C567	Quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares, y monocitos Inician la lisis de celulas proximas no sensibilizadas
C1-6	Inactivacion de endotoxinas
C1-8	Producen una lenta ruptura de la membrana
C1-9	Producen una rapida ruptura de la membrana Lisis de micoplasmas, protozoos, bacterias, virus, celulas infectadas por virus, celulas tumorales

algunos de los componentes.

La importancia biológica del Sistema se puede, por otra parte centrar en el hecho de que probablemente se halle en los invertebrados conservándose a lo largo de la evolución (144) en tal medida que algunos componentes son intercambiables entre especies tan "distantes" como ranas y cobayos.(145).

La complejidad del Sistema puede ser debida tanto a los múltiples papeles desempeñados por algunos de sus componentes -- (ver tabla nº 8) como al hecho de que pueda ser activado rápidamente cuando se precise pero nunca accidentalmente.

El sistema del Complemento puede ser dividido en cuatro unidades funcionales, dos vías para su activación (vía clásica y vía alternativa), un mecanismo de amplificación para aumentar en eficiencia de las vías de activación y una ruta efectora común -- por la que las secuencias de activación son dirigidas y de la que se derivan las actividades biológicas.

Las proteínas de la vía clásica se simbolizan por la letra C y un número que designa el componente del complemento (C1, C2, C4, etc). El estado activado del componente se indica con una barra sobre el número (p. ej. C1̄). Los fragmentos excindidos por una letra minúscula junto al símbolo del componente (p. ej. C3a, y C3b) y si el fragmento es inactivo además se le pone una i (p. ej. C3bi). Provisionalmente la vía alternativa se simboliza con letras en vez de con números manteniendo las otras convenciones utilizadas para los componentes de la vía clásica.

1.7.1. Vía clásica.-

La tabla nº 7 recoge algunas de las características físico-químicas de los componentes de la vía clásica. Esta vía esta

constituida por 5 proteínas, los tres suscomponentes del C1, -- Clq,Clr y Cls que pueden formar un complejo trimolecular en presencia de iones calcio (146), C4 y C2. La iniciación de esta ruta tiene lugar como consecuencia de la unión del Clq a complejos antígeno-anticuerpo o agregados inespecíficos de inmunoglobulina - IgG2 que contengan IgM o IgG1-IgG3 o IgG2 (147). Asimismo, la unión y activación del C1 puede llevarse a cabo por la proteína c-reactiva acomplejada con polisacáridos tipo C de neumococos - (148) y otros complejos poliamión-policación (149).

La activación del C1 precisa del complejo C1 intacto dependiente de calcio, la interacción de al menos dos sitios de unión a Clq y es dependiente asimismo del tiempo y la temperatura.

Se ha sugerido que la unión de Clq produce un cambio estérico en la proenzima (Clr) que permite su propia activación autocatalítica. El Clr convierte Cls a Cl̄s tras la ruptura de un enlace peptídico presente en una región con un puente disulfuro intracatenario, lo que explica el porque no se libere ningún fragmento (150). El Cls aislado puede asimismo ser activado a Cl̄s - tras el tratamiento proteolítico con tripsina o plasmina (151).- El sitio activo del Cls se ha caracterizado como una serin-esterasa en base a su actividad esterolítica susceptibilidad a la inhibición irreversible por diisopropil fluorofosfato (DFP) e inhibición competitiva por ésteres de aminoácidos sintéticos.

El Cl̄s escinde al C4 generando C4a que es un péptido de bajo molecular y C4b que continua la secuencia de reacción del Complemento. El C4b puede desencadenar diversas funciones: a) se puede unir irreversiblemente a inmunocomplejos y membranas celulares a través del sitio de unión producido que de otra forma de caería a la fase fluida como C4i, b) unión a un receptor inmuno adherente de una variedad de células a través de un sitio estable sobre el C4b (152), c) interacción con Cl̄ lo que permite una más

eficiente ruptura del C2 (153), d) unión al C2 activado para formar la C3-convertasa de la vía clásica, C4b2a, e) en el estado de asociación C4b-C2a, interacción con C3b para formar C4b C2a C3b que es la C5-convertasa de la vía clásica. La ruptura de C2 por C1 en dos fragmentos C2a y C2b, y la asociación del fragmento mayor C2a con el C4b, en presencia de iones magnesio, conduce a la formación de la C3-convertasa de la vía clásica. Esta enzima sufre un decaimiento dependiente de la temperatura con una vida media a 37°C de 5 a 10 minutos debido a la liberación del fragmento unido C2a. El C4b residual es capaz de volver a formar una nueva C4b C2a convertasa mediante la ruptura de C2 adicional por C1s.- (154)

La acción de la C3 convertasa sobre C3 determina la liberación de un péptido de bajo peso molecular el C3a con actividad de anafilatoxina y de C3b parte del cual se queda unido al complejo C4b2a formando el complejo equimolecular C4b2a3b con actividad de C5-convertasa.(155)

La ruptura del C5 en C5a, un péptido de bajo peso molecular con actividad asimismo de anafilatoxina, y C5b que permanece unido a la superficie activadora supone el último paso enzimático en la activación del complemento tanto por la vía clásica como por la alternativa.

El evento final, común a ambas vías, supone la formación del complejo C5b6789 aparentemente por un proceso de autoensamblaje (156), en cuyo proceso de formación parte del mismo se inserta dentro de la membrana celular (157,158) causando de esta forma las lesiones en la membrana puestas de manifiesto por estudios de microscopía electrónica.(159)

De las cuatro proteasas de la vía clásica, C1r, C1s, C42 y C423, las 2 primeras son claramente serin-esterasas, y las -

Otras 2 en que el sitio catalítico se piensa esta situado en el C2 puede también ser de este tipo. Sin embargo resulta extraño - que estas sean relativamente resistentes a DFP y más aún que el sitio activo de estas esté ubicado en la cadena de 70000 Dalton mientras que en las otras proteasas del tipo serin-esterasas se hallen en las cadenas de 20000-30000 Dalton(160). Todas estas - proteasas de la vía clásica cuya actividad ha sido estudiada en solución probablemente in vivo se hallan unidas al anticuerpo o superficie celular. Esto parece ser un aspecto esencial ya que - tanto el plasma como otros fluidos fisiológicos contienen altas - concentraciones de inhibidores proteolíticos y la activación tie ne que depender del exceso local de proteasas sobre inhibidores (143).

Un papel clave en la significación biológica del sistema del Complemento puede ser adscrito a las etapas de activación - del C3 y C5. Los polipeptidos C3a y C5a liberados inducen procesos inflamatorios debido a sus actividades anafilatoxica, quimio factiza y movilizante de leucocitos, causan dilatación de los va sos capilares, liberación de fluidos edematosos y acumulo local de células polimorfonucleares y mononucleares fagociticas. Por - otro lado el C3b unido a la membrana de ciertas partículas puede ser reconocido por ciertas células que portan receptores para -- C3b (granulocitos y fagocitos mononucleares) pudiendo dar lugar a una opsonización. Las reacciones biológicas generadas por C3a C5a y C3b pueden determinar la eliminación de células invasoras por lo que su acción sería benéfica para el organismo, sin embar go también pueden conducir a serios daños tisulares inmunopatolo gicos(161).

Cada paso de activación de la secuencia del Complemento puede ser interrumpido por mecanismos de inhibición dependiendo en gran medida de las condiciones bajo las que la activación del mismo se haya iniciado. Así el C1 activado por inmunocomplejos o

espontáneamente (en edema angioneurótico hereditario) es inhibido por la acción del C1-inhibidor que actúa asimismo sobre kalikreína, factor Hageman activado, y plasmina (162,163). Una carencia del mismo no sólo determina una activación parcial del Complemento sino también de los sistemas de coagulación sanguínea y de las kininas. Asimismo hay evidencia de que algunas enzimas proteolíticas como la plasmina activan al C1 lo que muestra una estrecha interrelación entre el sistema del Complemento y otros sistemas de proteínas plasmáticas.

1.7.2. Vía alternativa.-

La vía alternativa del Complemento, puesta de manifiesto hace más de 20 años por Pillemer y asociados (137,164) incluye un grupo de proteínas plasmáticas que son capaces de formar las C3 y C5 convertasas. La expresión de esta ruta es dependiente de un mecanismo feed-back positivo por el que el C3b, fragmento principal de la escisión del C3, interacción con los factores B y D para generar una C3 convertasa adicional. Como consecuencia de la escisión del C3 se producen las C3 y C5 convertasas de la vía clásica como de la alternativa, igualmente adherencia de C3b a células que porten receptores específicos para este fragmento y la generación de C3 convertasa adicional (dependiente de C3b). (154)

La tabla nº 7 recoge asimismo algunas de las propiedades físico-químicas de los componentes de la vía alternativa.

Muchas sustancias son capaces de activar esta ruta. Estas incluyen polisacáridos como el zimosan (137), endotoxinas (165) dextranos sulfatados (166), eritrocitos de conejo (167), estronas de eritrocitos humanos (168). La activación puede darse asimismo por ciertas clases de inmunoglobulinas, agregados de $F(ab)_2$ de la IgG1 de cobayos (169) al igual que el $F(ab)_2$ de la IgG de conejo (170), agregados de IgA de mieloma humana (171) así como an

anticuerpos humanos anti-sarampión de la clase IgG son capaces de activar el complemento por la vía alternativa tras la unión del anticuerpo a las células infectadas por el virus del sarampión. (172).

Hasta 1978 los aspectos esenciales de los conceptos previamente publicados, referentes a esta vía, eran los siguientes. Primero, la enzima inicial de esta ruta es una C3-convertasa de baja actividad que requiere para su formación C3, factor B (C3-proactivador) factor D (C3-proactivador-convertasa) y Mg^{2+} , pero no properdina. Segundo, la función de la enzima inicial es depositar C3b sobre la superficie activadora donde actúa como subunidad de la C3-convertasa unida (C3b,Bb). Tercero, al incrementar el número de moléculas de C3b unidas, la C3-convertasa unida adquiere la actividad de escindir al C5. Cuarto, la properdina nativa entra en la ruta en la secuencia final y es activada tras la unión a la C3/C5 convertasa unida. La properdina incrementa la actividad enzimática aparente al disminuir la velocidad de decaimiento espontáneo de la enzima. (173,175).

Diversos hallazgos durante los dos años anteriores a la fecha citada contribuyeron a una mejor comprensión de la dinámica molecular de esta ruta. Así Whley y Ruddy (176) identificaron otra proteína de IH como un componente que produce el desensamblaje activo de la C3-convertasa, demostrando además que la β IH acelera la acción del C3b-Inactivador sobre el C3b, al exponer las secuencias aminoácidos de la cadena α del C3 susceptibles a la acción proteolítica del C3b-INA. Más aún Pangburn y col. en 1977 (177) evidenciaron que la acción del C3b-inactivador sobre el C3b en la fase fluída requería de una forma absoluta la presencia de β IH. Por otro lado Fearon y Austen (178) observaron que tanto el C3b como la C3-convertasa depositada sobre la superficie de activadores están relativamente protegidas de la destrucción por proteínas reguladoras. Posteriormente (179,180) se demostró que la

protección del C3b unido es debida a una limitación de la β 1H para unirse a C3b, además de que la restricción del control puede ser generada por modificaciones químicas definidas de un no-activador que como consecuencia de estas se constituye en activador. Estos hallazgos ayudaron a explicar la capacidad conocida de los activadores de amplificar la ruta en presencia de proteínas controladoras (reguladoras).

Se han propuesto múltiples mecanismos para describir los eventos moleculares iniciales de la ruta que precede la deposición de C3b y su amplificación. Lachmann y Halbwachs (1975) (181) propusieron que una generación continua, de bajo nivel, de C3b en el suero es responsable de la deposición de C3b sobre los activadores, Fearon y Austen (1975)(182) sugirieron papel para la properdina activada P en la iniciación y otro (183) propusieron que distintas estructuras de superficie de los activadores son reconocidas por los componentes de la enzima inicial. La función de reconocimiento se asignó a una proteína parcialmente purificada - "factor iniciador" (IF)(174). Entonces la identidad de la β 1H como proteína de control no se conocía. Sin embargo ahora está claro que cualquier teoría para la iniciación de la ruta alternativa ha de tener en cuenta las funciones de las proteínas reguladoras.

Recientemente Schreiber y col. (184) han demostrado que la funcionalidad de la vía alternativa del suero puede ser reproducida por 6 proteínas aisladas (C3, factor B, factor D, β 1H, C3b-INA y Properdina, en sus respectivas concentraciones séricas). La activación de la ruta en la mezcla de las proteínas aisladas es similar a la producida por el suero tanto cualitativa como cuantitativamente. Sólo 5 de estas proteínas son esenciales para la iniciación y amplificación de la ruta, dado que los eventos de estas fases pueden tener lugar en ausencia de properdina. De estas 5 proteínas, tres (C3, factor B y factor D) se requieren para

la generación de la enzima inicial y de la enzima amplificante de la ruta, las otras dos proteínas (β 1H y C3bINA) son reguladores de la C3-convertasa y actúan suprimiendo la formación de la C3-convertasa en la fase fluida y bloqueando la formación de la enzima sobre la superficie de los activadores.

Estos resultados descartaron virtualmente la existencia de un factor iniciador (IF) como un componente de la ruta alternativa que estos mismos autores previamente habían propuesto. Estos autores dicen que esa proteína "parcialmente purificada" IF probablemente es idéntica al C3bINA. El requerimiento de un factor iniciador IF en el sistema de la properdina provino del hallazgo de una proteína sérica hasta entonces no identificada que se halla en circulación en pacientes con glomerulonefritis hipocomplementemias crónicas (185). Esta proteína, denominada factor nefrítico (C3-Nef), en presencia de los apropiados cofactores séricos generaba una C3-convertasa dependiente de Mg^{2+} que, una vez formada actuaba sobre C3 en presencia de EDTA (185). Uno de los cofactores, una pseudoglobulina labil al calor, posteriormente - fué identificado con el factor B (186), los otros eran C3 nativo y el factor D (187). El C3-Nef es una glicoproteína con un punto isoelectrico comprendido entre 8.75 y 8.95, con un peso molecular de 150.000 Dalton y actualmente se sabe que es una inmunoglobulina de la clase IgG con capacidad anticuerpo frente al factor B - activado (Bb)(188) y de esta forma estabiliza a la convertasa de la acción desensamblante del β 1H.

Recientemente se ha apartado evidencia de que este factor estabiliza asimismo a la C3 convertasa de la vía clásica.(189).

La adición de un antisuero anti-factor nefrítico a un suero humano normal producía la liberación de un factor que era esencial para la activación del sistema de la properdina por zymosan inulina y eritrocitos de conejo (173,167). Este factor denominado

IF sería homólogo al C3-Nef de pacientes con glomerulonefritis - hipocomplementémica crónica.

Schreiber y col, (184) proponen, además, un modelo que da cuenta de la dinámica molecular subyacente a la activación del sistema del Complemento por la vía alternativa (Fig nº 7). La activación de la ruta puede ser entendida como constituida por dos etapas: una de iniciación y otra de amplificación. La iniciación es inespecífica, tanto que no requiere la presencia de inmunoglobulina ni de ningún factor de reconocimiento de estructuras similares a anticuerpos. Por otro lado esta parece desarrollarse en dos pasos, el primero supone la unión al azar del C3b, a través de su sitio de unión labil, a un activador y un segundo que supone una interacción discriminatoria del C3b unido con las estructuras de superficie que le rodean. Los eventos al azar son el resultado de la acción de la C3-convertasa inicial que es una enzima de la fase soluble. Se supone que el C3 nativo y el factor B forman un complejo reversible dependiente de Mg^{2+} que si es activado por el factor D, produce la enzima que escinde el C3, la C3Bb que es la C3-convertasa de la fase fluida. La magnitud de la deposición del C3b resultante de la acción de esta enzima sobre C3 es baja debido a la pequeña cantidad de enzima producida en un tiempo dado y a la baja eficiencia de unión que es característica de la deposición de C3b en la fase soluble. La interacción discriminatoria tiene lugar tras la unión de C3b. Cuando se une a una sustancia no activadora el C3b es capaz de unir $\beta 1H$ y resulta inactivado por los efectos combinados del C3bINA y $\beta 1H$. Cuando se une a un activador el control es restringido porque la unión de $\beta 1H$ a C3b esta disminuida o anulada. Como consecuencia de la fase discriminatoria de la iniciación tiene lugar la formación de la C3-convertasa sobre el activador y comienza la amplificación a través de la C3-convertasa de la fase sólida fijada. El C3b depositado sobre la superficie activadora (p.ej. zymosan) sirve como sitio de anclaje al factor B, que tras la activación

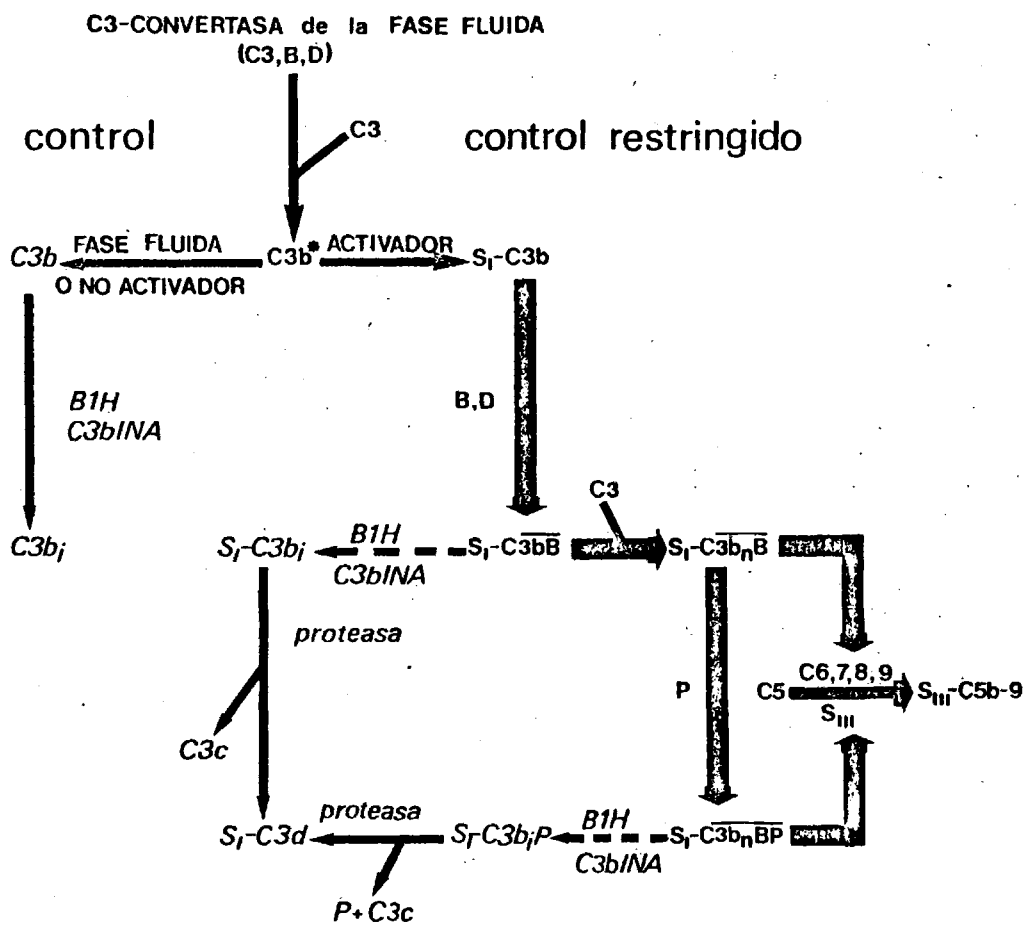


Fig. nº 7.

dinámica molecular de la vía alternativa del Complemento. (representación esquemática)

proteolítica por el factor D, se une más firmemente al C3b dando lugar a la C3-convertasa de la fase sólida. La primera parte de la formación de esta enzima es asimismo dependiente de Mg^{2+} . La interacción proteína-proteína entre el C3b y el factor B expone en este un enlace que es reconocido por el factor D liberando un péptido de 30000 Dalton de peso molecular el Ba y deja firmemente fijado el Bb de 63000 Dalton al C3b unido a la superficie activadora dando lugar así a la C3-convertasa de la fase sólida. No obstante esta convertasa tiene una vida media muy corta (2 minutos a $37^{\circ}C$ en presencia de tampones con Mg^{2+} o EDTA)(190). La acción de la properdina activada o del factor nefrítico sobre esta convertasa aumenta la actividad enzimática aparente de la misma al disminuir el decaimiento espontáneo de la enzima. Esta enzima a diferencia de su homóloga de la vía clásica exhibe cierta capacidad para escindir al C5. No obstante la C5-convertasa propiamente dicha se forma como consecuencia de la deposición de más moléculas de C3b sobre el complejo anteriormente formado provenientes de la acción de la C3 convertasa sobre C3. Properdina estabiliza asimismo a esta enzima de una forma análoga a como lo hacía sobre la C3 convertasa(191). La capacidad del C3b para distinguir entre activadores y no activadores constituye una nueva función de C3b y confiere un potencial discriminatorio sobre la ruta.

1.8. RELACIONES ENTRE EL FRAGMENTO $F(ab)_2$ DE LA IgG DE CONEJO Y EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.-

El fragmento $F(ab)_2$ obtenido como se indica en el apartado 1.5.2. supone una porción de la molécula de inmunoglobulina - que en forma aislada del resto de la molécula proporciona una información estimable de cara al conocimiento intrínseco de la versatilidad de funciones de la molécula completa.

En este fragmento que contiene dos sitios de unión para el antígeno (90) residen las actividades de precipitina, aglutini

na y neutralizante. Otras propiedades biológicas de la molécula completa, como son la fijación en la piel, transferencia placentaria y actividad citofílica, se pierden tras el tratamiento de la IgG con pepsina ya que el fragmento Fc es digerido en pequeños péptidos.

En un principio se pensó que el fragmento Fc era necesario para manifestar otra actividad biológica altamente importante. La inducción de la fijación del Complemento por IgG, aunque el fragmento $F(ab)_2$ parecía retener algunas propiedades de fijación del Complemento. Observaciones estas que se establecieron cuando aún no había trabajos concluyentes de activación del Complemento por la vía alternativa y que posteriormente sirvieron para apoyar su existencia.

En cuanto a la capacidad de fijación del Complemento por este fragmento, los trabajos aparecidos hasta 1971 manifiestan una gran controversia. Así varios autores Taranta y Franklin 1961, Ishiaka y Sugahara 1962, Ovary y Taranta 1963, (192194) no hallaron actividad anticomplementaria alguna en agregados antígeno-- $F(ab)_2$, mientras que otros como, Schur y Becker 1963, Chan, Jaquet y Cebra 1964, Jaquet y Cebra 1965, Isliker, Jacot-Guillarmond, Waldesbühl, Von Fellenberg y Cerottini 1968, (195;198) sí detectaron dicha actividad. La fijación máxima de Complemento por agregados antígeno- $F(ab)_2$ observada variaba entre un 30 y un 50% del total de Complemento añadido, casi generalmente de cobayos.

Reid en 1971 (170) publicó un trabajo que prácticamente supuso el fin de la controversia hasta entonces planteada evidenciando la capacidad de este fragmento para fijar el Complemento, demostrando que el fallo de las experiencias anteriores radicaba en las condiciones de trabajo no apropiadas y además demostró que el $F(ab)_2$ no unía C1 lo que corroboraba las experiencias que Isliker llevó a cabo en 1968 según las que el sitio de unión de la -

IgG al C1 se hallaba en la región Fc.(198)

Asimismo se encontró diferencia apreciable en cuanto a la fijación del Complemento por los inmunocomplejos de $F(ab')_2$ si la formación de los mismos se producía durante el periodo de fijación del Complemento respecto a la fijación que tenía lugar si los complejos estaban previamente formados (Schur y Becker, y Reid)(195,170). Entre 30 y 100 veces resultaron ser más eficientes los inmunocomplejos previamente formados en cuanto a la capacidad de estos de fijar Complemento. Resultados similares se obtuvieron con agregados del $F(ab')_2$ de la IgG1 de cobayos antígeno como mostraron Sandberg y col. (169). Se sabe que los inmunocomplejos separados en el punto de equivalencia necesitan un considerable tiempo de formación para dar una precipitación máxima de todos los complejos antígeno-anticuerpos formados, y es generalmente aceptado que los complejos antígeno-anticuerpo son más estables con el tiempo, según Reid (170) una explicación de la diferencia de eficiencias en la fijación del Complemento entre los dos tipos de agregados quizá pueda ser el que las moléculas de $F(ab')_2$ en los complejos antígeno-anticuerpo sufren un ligero cambio conformacional durante la agregación después de su reacción inicial, presumiblemente rápida, con el antígeno y que este cambio conformacional incrementa la fijación de los últimos componentes.

Posteriormente Jackson y Grant en 1976 (199) llevaron a cabo unas experiencias en las que midieron la capacidad de unos anticuerpos IgG y/o $F(ab')_2$ de conejo frente a células P-815 tumorales para lisar estas células utilizando Complementos de distintas especies. Con $F(ab')_2$ en presencia de EGTA (complejante del ión Ca^{2+} , necesario para activar la vía clásica), los Complementos de carnero y conejo eran activados de forma diferente por la vía clásica o por la vía alternativa, sin embargo los Complementos de rata y cobaya resultaron activados sólo por la vía clásica. Conclusión que estaba en desacuerdo con lo mostrado por

Reid en 1971 y otros anteriormente. Por otro lado, dado que los resultados obtenidos eran marcadamente dependientes de la fuente del Complemento, estos autores sugirieron que para que los datos puedan extrapolarse a los sistemas "in vivo", es preciso que tanto el anticuerpo como el Complemento proceden de la misma especie.

Finalmente Fujita y col. en 1977 (200) confirmaron la capacidad del $F(ab')_2$ de la IgG del conejo como inmunoprecipitado con la ovoalbumina para fijar Complemento humano por la vía alternativa además de investigar sobre los mecanismos de esta activación evidenciando la participación de los factores C3-proactivador (B) y C3-proactivadorconvertasa (D) en esta vía, la dependencia del tiempo de incubación de este inmunocomplejo con los factores séricos precisos para la activación de esta vía, así como la corroboración de observaciones previas de otros investigadores (Schur y Becker 1963, Sandberg y col. 1971, Reid 1971, Ishizaka y col. 1972, Konno y col. 1976 (195,169,170,201,202) de que la cantidad de Complemento fijada por inmunoglobulinas y sus fragmentos a través de la vía alternativa nunca excede el 50% del Complemento total presente.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.-

La activación del sistema del Complemento forma parte de las propiedades de las inmunoglobulinas relacionadas directamente con la defensa inmunológica del organismo. Esta activación puede ocurrir, al menos, por dos mecanismos bioquímicos diferentes denominados vía clásica y vía alternativa en las cuales los factores iniciales del sistema y los mecanismos efectores son diferentes, aunque ambas coinciden a partir del componente C3.

La capacidad de activación del Complemento por una u otra vía presenta una cierta especificidad de clase o subclase, aunque esta no es ni mucho menos estricta.

Los sitios efectores de la molécula de inmunoglobulina - para la vía clásica y la vía alternativa si son diferentes, al menos en la gran mayoría de los casos.

La región responsable de la unión a C1q y de la activación de la vía clásica reside en el dominio globular designado como C_H2(IgG), dentro de la región Fc de la molécula de anticuerpo. Por el contrario, el sitio efector para la vía alternativa reside en la región Fab de la molécula, probablemente en el dominio C_H1.

En nuestro laboratorio se están llevando a cabo una serie de estudios que tienen por objeto dilucidar los factores estructurales de la molécula de inmunoglobulina que determinan la capacidad de activación del Complemento por anticuerpos. Hasta el presente se han obtenido algunos resultados que se entroncan directamente en una línea de experimentación orientada a obtener la estructura y las relaciones estructura-función del sitio de activación para la vía clásica. Los requisitos estructurales de las inmunoglobulinas para la activación de la vía alternativa están casi absolutamente inexplorados. Por otra parte la funcionalidad biológica de la porción Fab, diferente de la unión al antígeno es desconocida. Actualmente, las diferentes actividades biológi-

cas de la molécula del anticuerpo pueden ser asignadas a una u otra de las regiones globulares (dominios) en que la molécula es organizada, pero el dominio C_{H1} es la única porción de la molécula, cuya funcionalidad permanece oscura.

Por estas razones hemos decidido abordar el estudio de la vía alternativa del Complemento desde el punto de vista de los requisitos de estructura molecular precisos. Esta línea permitirá explorar uno de los aspectos más oscuros de la función de los anticuerpos aprovechando la experiencia creciente de los estudios que paralelamente se están efectuando sobre la vía clásica.

El estudio se llevó a cabo sobre IgG de conejo porque constituye un sistema experimental más simple y apropiado que las inmunoglobulinas humanas debido principalmente a tres razones:

- a) Menor número de subclases de IgG que en caso de la IgG humana.
- b) Gran parte del pool de IgG de conejo puede activar el complemento por la vía alternativa solamente.
- c) En las dos subclases de IgG de conejo el sitio de activación para la vía alternativa del complemento reside en la región $F(ab')_2$

La aproximación experimental y la estrategia metodológica suponen la utilización de la modificación química específica y controlada, estableciéndose correlaciones entre la extensión de la modificación, la capacidad de activación de la vía alternativa y los posibles cambios conformacionales inducidos por las modificaciones químicas con repercusión funcional.

Con esta línea de conjunto el trabajo se desarrolló según la siguiente estrategia experimental:

- 1) Aislamiento del fragmento $F(ab')_2$ de la IgG de conejo.

Para ello se precisan del aislamiento de la IgG del suero de conejo por cromatografía de intercambio iónico en diptil-aminoetil-celulosa (DEAE-celulosa) y posterior digestión proteolítica de la inmunoglobulina con pepsina seguida de una cromatografía de exclusión molecular del digerido por Sephadex G-200 o Ultrogel AcA-44.

2) Caracterización físico-química del fragmento $F(ab')_2$.

Esta supone a) Estimación de su peso molecular por filtración en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. b) Determinación del radio molecular del $F(ab')_2$ por filtración en gel. c) Determinación de su movilidad electroforética en agar. d) Determinación de su punto isoelectrico por electroenfoque. e) Obtención de su espectro de absorción. f) Obtención de su espectro de dicroísmo circular. g) Determinación de su coeficiente de extinción. h) Análisis de aminoácidos. i) Determinación del número de puentes disulfuro.

3) Modificación química de los puentes disulfuro.

Se pretende con ello estudiar la posible implicación de los enlaces disulfuro inter-y/o intra-catenarios del $F(ab')_2$ en la activación de la vía alternativa. El efecto de la reducción y alquilación de los enlaces intercatenarios puede informar acerca de los requisitos de estructura cuaternaria en la región reactiva. El mismo estudio sobre los enlaces intracatenarios puede informar acerca de la importancia de la regiones constantes o variables en la región efectora y posiblemente acerca de los requisitos de estructura terciaria.

La metódica consiste en reducir y alquilar controladamente el $F(ab')_2$, cuantificar los enlaces modificados por cuantificación de grupos -SH con $1-^{14}C$ -yodoacetamida y, eventualmente, lo

localizar en la molécula la posición de los enlaces rotos.

4) Correlación entre la modificación química y los efectos estructurales.

Ello supone el empleo del dicroísmo circular para detectar posibles cambios conformacionales en el $F(ab')_2$ con modificaciones químicas funcionalmente significativas, en un intento de perfilar los requisitos conformacionales de la activación de la vía alternativa.

5) Valoración de la actividad anticomplementaria.

Este punto constituye el eje del trabajo. Se trata de establecer una técnica que permita valorar, con suficiente sensibilidad y relativa sencillez, la capacidad de activación de la vía alternativa por complejos antígeno- $F(ab')_2$ ó Fab intactos o modificados.

Con este trabajo se pretende hacer una aproximación conceptual nueva a las relaciones entre la estructura y la función de la inmunoglobulina.

La finalidad de este trabajo es doble: por una parte investigar los requerimientos estructurales de las inmunoglobulinas para activar la vía alternativa y buscar un posible dominador común con otros efectores y, por otra parte, adentrarnos en el estudio de la funcionalidad biológica de la región Fab independiente de la unión al antígeno.

3. MATERIALES Y METODOS.-

3.1. OBTENCION DEL SUERO DE CONEJO NORMAL.-

Se obtuvo de conejos raza New Zealand procedentes del animalario de la Fundación Jimenez Díaz. La sangre de estos conejos se extrae de la vena marginal de la oreja y posteriormente se deja retraer el coágulo de la misma durante 3-4 horas a temperatura ambiente. A continuación se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 3000 rpm (2280g) durante 15 minutos, se desprecia el sedimento y el líquido sobrenadante es el suero.

3.2. OBTENCION DE LA IgG DE CONEJO.-

Se procede según una modificación al método de Peterson y Sober 1962(203).

El suero obtenido según el apartado anterior bien se enriquece en su fracción gamma por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2M de concentración final con posterior redisolución del mismo y diálisis exhaustiva frente a un tampon Na_2HPO_4 0.01M pH 7.6, o bien se dializa directamente frente a este mismo tampon.

Este suero dializado se cromatografía por una resina de cambio iónico, DEAE-celulosa- (diethyl-aminoetil-celulosa) DE-11 Whatman, en columnas de 2.6 x 30 cm ó 4 x 40 cm siendo el eluyente el mismo tampon de la diálisis

Del eluido se recogen las fracciones que a 280nm exhiben una absorbancia adecuada, superior a 0.2 y se concentran por ultrafiltración a través de bolsas de celofan visking 8/32 (2.4nm de diametro de poro) a presión negativa.

Una vez concentrada la IgG se centrifuga a 5000 rpm (3800 g) durante 15 minutos para eliminar agregados insolubles.

Obtenida la IgG se verifica su grado de pureza por técnicas inmunológicas y físicas

La identificación y determinación de su pureza inmunológica se llevó a cabo por: A) inmunodifusión doble bidimensional en agar (Agar Noble Difco al 1% en NaCl 0.15M, según una modificación al método de Ouchterlony (204), frente a antisueros, anti-proteínas totales de conejo, de asnos, proporcionados por Behring-werke y anti-gamma-globulina de conejo, de cabra, proporcionados por la misma casa o bien al antisuero obtenido por nosotros como se detalla en el apartado 3.5. Las preparaciones puras dan una sola banda en ambos casos.

B) Inmunolectroforesis.

Modificando el método Scheidegger (205) se realizó en placas de 75 x 40 x 2mm de gel de agar (Agar Noble Difco al 1.25% - en tampón de veronal (ácido 5.5.-diethylbarbiturico/5.5.-diethylbarbiturico sódico) de fuerza iónica 0.03 y pH 8.6). La muestra se introdujo en orificios de 1mm de diámetro practicados en el gel mediante una pipeta Pasteur calibrada, equidistantes del eje longitudinal de la placa 6mm y la electroforesis se llevó a cabo en el tampón mencionado, aplicando una caída de tensión de 5volt/cm durante 70 minutos.

Tras la electroforesis se practicó en el eje longitudinal de la placa una trinchera de 2mm de ancho, se rellenó con el antisuero específico, según el análisis y se dejó en reposo en cámara húmeda, observándose el desarrollo de las bandas de precipitación a las 24 y 48h.

Las preparaciones puras son aquellas que muestran una banda de precipitación desde la zona alfa hasta la gamma, zona de movilidad electroforética de la IgG.

Las preparaciones con más de una banda de precipitación se consideraron impuras.

La pureza física la determinamos por: A) filtración en gel de Sephadex G-200 superfino o G-200, en columnas de Pharmacia 2.6 x 40cm son eluidas con solución salina de NaCl 0.5M tamponada a pH 7.2 con fosfato disódico/fosfato monopotasio a concentración final de 0.01M y que contiene ázida sódica al 0.05% (SSF)

B) Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se aplicó según el método descrito por Davis (1964)(206) para geles al 7.5%

Se aplicaron 10 micro-l de muestra a concentración de 25 micro-g/10micro-l disueltos en el tampón superior de la electroforesis TRIS/Gly pH 8.9, utilizando azul de bromofenol como marcador. Se corrieron a 1.5 mA por tubo, mientras el marcador estaba en el gel de concentración y a 4mA por tubo, una vez que alcanzó el gel de resolución durante 1 hora 30 minutos. Se tiñeron los geles con amido Schwartz 0.1% en ac. acético al 7% durante al menos cuatro horas y se destiñeron con cambios sucesivos de ácido acético al 7%.

En este tipo de proteínas y debido a su heterogeneidad molecular no se obtiene una banda nítida sino una banda difusa. La existencia de más de una banda indica que la proteína no está pura.

La concentración de la proteína se determina por una micromodificación del método Folin-Ciocalteu (207).

3.3. OBTENCION DEL FRAGMENTO F(ab')₂--

Una vez obtenida la IgG pura se dializa frente a tampón AcH/Ac 0.1M, pH 4.6. A continuación se digieren 75mg de esta IgG con pepsina en relación 1:100 enzima: sustrato durante 24 horas a 37° según el método de Nisonoff(90)

La reacción se detiene por adición de TRIS sólido hasta llevar la disolución a pH 8. Este digerido se filtra por el gel de Sephadex G200 o Ultrogel Aca44 en columnas de Pharmacia de 2.6 x 100 cm eluidas con SSF. Se recogieron fracciones de 3 ml y se leyeron a 280 nm en un espectrofotometro Unicam Sp 1800.

El primer pico del eluido contiene $F(ab')_2$ que se concentra por ultrafiltración en bolsas de celofan visking 8/32. Este pico se analiza su grado de pureza por técnicas inmunoquímicas: inmunodifusión doble bidimensional en agar e inmunolectroforesis y físicas: filtración en gel de Sephadex G-200 superfino y electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las fracciones que resultan impuras se vuelven a filtrar por Ultrogel Aca44.

Obtenido el $F(ab')_2$ puro se procede a su caracterización física.

La concentración de esta proteína se determinó en principio por el método del Folin-Ciocalteu y posteriormente por la absorvancia de la solución que le contenía en base a su coeficiente de extinción $E_{cm}^{0.1\%}$ una vez obtenido este dato.

3.4. CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DEL FRAGMENTO $F(ab')_2$ DE LA IgG DE CONEJO.4

3.4.1. Movilidad electroforética en el gel de agar.-

Se determinó por medio de electroforesis en agar comparan

dola con la movilidad exhibida por otras proteínas de movilidad conocida: conjunto de proteínas séricas del conejo, e IgG del conejo.

3.4.2. Estimación de su peso molecular.-

3.4.2.1. Estimación por filtración en gel de Sephadex G-200 superfino.-

Se llevó a cabo según el método de Andrews 1969(208) en una columna de Pharmacia de 2.6 x 45cm siendo el eluyente la solución salina mencionada, SSF, y eluida con flujo invertido. Recogiendo fracciones de 3 ml. Obteniendo cada patrón al menos 3 veces con intervalo de más de una semana entre cada dos determinaciones.

Se estimó por comparación de su comportamiento en filtración a través de este gel y el de otras proteínas de comportamiento conocido. Las proteínas patrón utilizadas fueron: IgM, para la determinación del volumen de exclusión de la columna (V_o), ovalbumina (43500 Dalton) albumina bovina (67000 Dalton), quimotripsinogeno del pancreas de ternera (25000 Dalton), mioglobina de cachalote (17.800 Dalton), citocromo-C del corazón de caballo (13.400 Dalton), IgG humana (150.000 Dalton), IgA humana (160000) el fragmento Fc de la IgG humana (52000 Dalton), y el aminoácido tirosina para la determinación del volumen interno (V_i) En cada caso se determinó el volumen de elución por absorción de los eluidos a 280nm excepto en dos casos de la mioglobina y citocromo-C que se realizó a 410 nm.

Se expresó el comportamiento de estas proteínas en esta columna y este gel como su volumen de elución (V_e) y como V_e/V_o se relacionó con el logaritmo decimal de su peso molecular.

3.4.2.2. Estimación por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.-

Se siguió la técnica de Weber u Osborn (209) utilizando geles al 7.5% y 10% en NaH_2PO_4 0.1M pH 7.2 que contenían dodecil sulfatosódico (SDS) al 0.2%. Se estimó por la comparación de la movilidad del fragmento $\text{F(ab}')_2$ y de este reducido con la movilidad de las siguientes proteínas patrón, fosforilasa de E. coli (100000 Dalton), ovoalbumina, albumina bovina, quimotripsinogeno, lisozima de la clara del huevo (14000 Dalton), cadenas H y L de IgG de conejo (51000 y 23500 Dalton), Fc gamma humano, aldolasa de músculo de conejo (40000 Dalton) y pepsina de la mucosa estomacal de cerdo (35000 Dalton).

Las muestras se disolvieron en HCOO al 5% a concentración de 1mg/ml y 50 microl. de esta solución se desecaron y se les adicionaron 100 microl. de una solución que contenía 0.5ml de tampón fosfato, 50 microl. de SDS al 10% 2 ml de urea al 12% y 2.4 ml de H_2O y para las muestras que se redujeron se adicionó a la solución anterior 50 microl. de 2-mercaptoetanol 14.3M y se calentó a 100° durante 5 minutos.

Se corrieron 50 microl. de estas soluciones a los que se adicionó 10 microl. de azul de bromofenol al 0.01% que se utilizó como marcador. Se corrió la electroforesis durante 5-6 horas a 8mA/tubo.

Los geles se tiñeron durante 15 horas con azul Coomassie al 0.5% en alcohol isopropílico al 25% y ácido acético al 10%. Se destiñeron los geles con una solución acuosa de alcohol isopropílico al 25% y acético al 10%.

Y la movilidad electroforética se determinó aplicando a cada muestra la siguiente expresión:

$$\text{Movilidad} = \frac{D_1}{L_1} \times \frac{L_2}{D_2} \quad \text{siendo:}$$

- D_1 : distancia migrada por la proteína.
 L_1 : longitud del gel después de la decoloración.
 D_2 : distancia recorrida por el marcador.
 L_2 : longitud del gel antes de la tinción.

3.4.3. Cálculo del radio molecular.-

Para calcular el radio molecular del $F(ab')_2$ de la IgG de conejo se utilizó el procedimiento de Ackers (1964)(210). Se realizaron las siguientes determinaciones:

a) Determinación de K_D

$$K_D = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_e/Bd - V_o}$$

- donde: V_e = volumen de elución de cada proteína
 V_o = volumen de exclusión de la columna.
 V_t = volumen total del lecho del gel.
 B = ml del lecho del gel/g. de gel seco.
 d = densidad del gel mg/ml.

(B y d son los dos valores característicos dados por la casa comercial para cada tipo de Sephadex).

Se calcula K_D para todas las proteínas cromatografiadas.

- b) Determinación de a/r , siendo a = radio molecular de cada proteína y r = radio de poro efectivo de la columna. Este cálculo se realiza para todas las proteínas cromatografiadas, por interpolación de los valores obtenidos para K_D en la tabla K_D frente a a/r de Ackers (1964).
- c) Determinación de r . Determinado a/r para cada proteína y conocido a se halla el valor de r . El radio de poro efectivo que se toma para la columna utilizada es el promedio de los diferentes r obtenidos a partir de las proteínas patrones que en

la representación de V_e/V_o frente al log PM sitúan al $F(ab')_2$ en una posición media : (IgA, IgG, Albumina bovina y Fc).

- d) Una vez conocido K_D para el $F(ab')_2$ se halla a/r por interpolación en la tabla de Ackers. De este valor y el radio de poro efectivo r de la columna utilizada se deduce el valor del radio molecular a del $F(ab')_2$ de la IgG del conejo.

3.4.4. Cálculo del coeficiente de difusión del $F(ab')_2$.

Una vez determinado el radio molecular del fragmento su coeficiente de difusión se calcula según la siguiente expresión:

$$D_{20,w} = \frac{RT}{N_0 \eta r} \times \frac{1}{a}$$

siendo:

$$R = 8.31 \times 10^7 \text{ ergios (g mol)}^{-1} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1}$$

$$T = 293 \text{ } ^\circ\text{K}$$

$$N = 6.02 \times 10^{23} \text{ (g mol)}^{-1}$$

$$\eta = 1 \text{ cp} = 10^{-2} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$a = \text{radio molecular en cm}$$

3.4.5. Espectroscopia de Absorción.

El espectro de absorción del $F(ab')_2$ se realizó entre 200 y 340 nm en un espectrofotometro de doble haz Unicam SP-1800 equipado con un registro gráfico Unicam AR-25.

Para efectuar el espectro la proteína fué dializada previamente frente a una disolución de Tris/HCl 10 mM a pH 7.8, con teniendo además NaCl 0.15 M y EDTA 2 mM, centrifugada 20 minutos a 3800 g y diluida posteriormente con dicho diluyente hasta la concentración adecuada para la medición.

En la región correspondiente al UV próximo (240-340 nm) las concentraciones utilizadas fueron de 1 mg/ml, utilizandose

como blanco la disolución de Tris/HCl.

3.4.6. Dicroísmo circular.-

El espectro de dicroísmo circular (CD) del F(ab')₂ se realizó entre 210 y 320 nm en un espectropolarímetro Cary-60 con aditamento para dicroísmo circular, a 25°C en células de 1 cm de paso óptico.

Para efectuar el espectro la proteína fué dializada contra el diluyente Tris/HCl citado en el apartado anterior, centrifugada a 3800 g durante 20 minutos y diluida posteriormente en el citado diluyente hasta la concentración adecuada. El diluyente - utilizado en la preparación de la muestra fué previamente filtrado a través de un filtro Millipore de 0.45 micras así como la disolución de la proteína, con el fin de evitar rigurosamente la presencia de partículas en la muestra que pudieran originar efectos incontrolables de depolarización y dispersión de luz.

Las concentraciones de proteína utilizadas fueron 100 g/ml para la obtención del espectro de CD en el UV lejano (210-240nm) y de 1mg/ml en el UV próximo (250-320nm).

Se utilizó como blanco una alícuota de Tris/HCL procedente del líquido utilizado en el último cambio de la diálisis de la muestra de proteína.

Los espectros vinieron dados en grados de elipticidad θ . La representación gráfica de los mismos se llevó a cabo expresando los datos en elipticidad molar ($[\theta]$) utilizando para la conversión de datos la siguiente expresión:

$$[\theta] = \frac{\theta \times M \times 100}{d \times c}$$

donde M = es el peso molecular del F(ab')₂ (97000 Dalton)
d = paso óptico de la célula en cm d = 1cm
c = concentración de la proteína en g/l.

El factor de corrección de Lorentz $3/n^2 + 2$, (donde n es el índice de refracción), utilizado generalmente para compensar el efecto del disolvente sobre la fuerza rotacional de las transiciones ópticamente activas, no fue considerado en las estimaciones de $[\theta]$ puesto que la obtención del espectro de CD de esta muestra, y las sucesivas a estudiar, se efectuaron en el mismo disolvente y en idénticas condiciones y porque la finalidad del estudio es la comparación de los espectros de distintas muestras y no la determinación de la magnitud absoluta de las bandas de elipticidad.

Puesto que los espectros de CD de las inmunoglobulinas y de sus fragmentos se caracterizan porque exhiben una elipticidad muy débil, fue preciso trabajar en condiciones de alta sensibilidad del espectro polarímetro: 0.04 (1 cm = 0.0016 grados de θ) en el UV lejano y escala 0.02 (1 cm = 0.0008 grados de θ) en el UV próximo. Por esta razón los espectros presentaron una relación señal/ruido considerablemente pequeña. Para obviar en lo posible la indeterminación que esto implica, el barrido espectral se efectuó cada vez por triplicado en la misma región del registro gráfico y se consideró como definitivo la línea que, en cada punto de registro, atraviesa la zona más intensamente dibujada.

3.4.7. Análisis de aminoácidos.-

Se procedió según la metodología expuesta por Gavilanes (211)

Muestras de 1 mg de F(ab')₂ previamente dializadas frente a H₂O destilada se llevaron a sequedad en viales de hidrólisis y

TABLA 9. CARACTERISTICAS DE LOS TAMPONES DE CITRATO DE LITIO

	TAMPON DILUCION DE LA MUESTRA	1º TAMPON	2º TAMPON	3º TAMPON	4º TAMPON	5º TAMPON
PH	2,20±0,01	2,88±0,01	3,60±0,01	4,17±0,01	5,28±0,01	6,50-0,01
CONCENTR. DE LITIO(N)	0,150	0,244	0,356	0,668	0,664	1,93
CITRATO DE LITIO (g)	14,10	15,04	33,50	23,00	23,00	23,00
CLORURO DE LITIO (g)	—	3,60	—	18,00	17,00	36,00
TIODIGLICOL (ml)	10,00	2,50	2,50	2,50	2,50	—
HCl CONCEN. (ml)	10,00	11,20	20,60	9,80	2,90	0,150
FENOL LIQUIDO	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VOLUMEN FINAL (l)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

a continuación se les adicionó 1 ml de HCL azeotropo tridestilado 6N conteniendo 0.1% de fenol, se agitó hasta disolver la proteína, se llevaron a vacío los viales y las hidrolisis se mantuvieron a 110°C durante 24, 48, 72 y 96 horas en sus respectivas viales. Transcurridos estos tiempos se enfriaron a temperatura ambiente las muestras, se abrieron los viales, se llevaron a sequedad las muestras, se lavaron al menos cuatro veces con agua destilada agitando y llevando a sequedad cada una de ellas, y a continuación se procedió a disolverlas en el disolvente del autoanalizador que contenía: citrato de litio pH 2.2-0.1 con 1% de tiodiglicol y 0.1% de fenol proporcionados por Pierce Chemical Company. Y se aplicaron 30 microl de muestra al autoanalizador - Durrum D500, según programa previamente calibrado, utilizando un total de cinco tampones de citrato de litio en secuencia según se detalla en la tabla nº 9.

A partir de los datos del análisis se determina la composición de aminoácidos en % molar, exceptuando de este cálculo Thr Ser, Ile, Val, Trp y Cys.

3.4.7.1. Contenido en Treonina.-

Se determina a cada tiempo de hidrolisis, el % molar de Thr respecto a todos los aminoácidos invariables respecto al tiempo de hidrolisis. La media de los valores así obtenidos da el % molar de Thr. Una vez obtenido el porcentaje de Thr a cada tiempo de hidrolisis se procede a la representación de dicho porcentaje en función del tiempo. El valor obtenido gráficamente por extrapolación a tiempo cero da el contenido en Thr del $F(ab')_2$.

3.4.7.2. Contenido en Serina.-

Se determina de forma análoga que en el caso de la treonina.

3.4.7.3. Contenido en Valina.-

Se calcula en el hidrolizado del último tiempo de hidrólisis, el % molar de Val respecto a todos los aminoácidos invariables respecto al tiempo de hidrólisis. El contenido Val viene dado por la media de los valores obtenidos en los tres hidrolizados a 96 horas.

3.4.7.4. Contenido Isoleucina.-

Se determina en forma análoga a la descrita para Val.

3.4.7.5. Contenido en Triptofano.-

Se determina espectrofotométricamente utilizando dos métodos:

A) Método de Goodwin y Morton (1946)(212), se prepara una solución del $F(ab')_2$ en NaOH 0.1N que a 290nm exhiba una densidad óptica comprendida entre 0.2 y 0.5. Se lee esta solución a 280nm y a 294.4nm. El contenido en Trp de la proteína se obtiene de la expresión:

$$M_{Tyr}/M_{Trp} = 0.592D_{294.4} - 0.263D_{280} / 0.263D_{280} - 0.170D_{294.4}$$

siendo M_{Tyr} y M_{Trp} los moles de Tyr y Trp por mol de proteína. - Esta determinación se efectuó por triplicado.

B) Método de Edelhoeh (1967)(213). Se preparan diluciones de 0.3 mg/ml del $F(ab')_2$ en un tampón fosfato sódico 0.02M que contiene cloruro de guanidinio 6M, a pH 6.5. Se lee la densidad óptica de la disolución a 280 y 288nm utilizando como referencia al tampón de disolución. Los moles de Trp se obtienen de la ecuación:

$$M_{Trp} = D_{288}/3103 - D_{280}/10318$$

3.4.7.6. Contenido en Cisteínas.-

Se detalla en el apartado 3.4.10.

3.4.8. Determinación del coeficiente de extinción.-

El coeficiente de extinción del $F(ab')_2$ se determinó a 278 y 290 nm por triplicado en base a medidas de peso seco de proteína.

Se realizó por dos procedimientos distintos.

En el primero se procedió de la siguiente manera: Una solución de $F(ab')_2$ en H_2O destilada a una concentración de $1mg/ml$ determinada por el método del Folin-Ciocalteu, se pasa a través de un filtro Millipore de 0.45micras.

Se realizaron diversas diluciones de esta solución, con objeto de que la absorción de la solución estuviese comprendida entre 0.1 y 0.5.

La absorción de estas disoluciones se determina a 278,280 y 290 nm en un espectrofotometro Unicam Sp-1800 utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Alicuotas de 3 ml de la primera solución se pipetearon en viales previamente tarados, introduciendoles seguidamente en una estufa de secado a $90^{\circ}C$ durante 15 horas. Al cabo de este tiempo se eleva la temperatura de la estufa a $108^{\circ}C$ hasta alcanzar pesada constante.

La pesada neta de la muestra seca permite el cálculo del coeficiente de extinción de la proteína según la expresión:

$$A = l \times c \times E_{1\text{ cm}}^{0.1\%} \quad \text{donde :}$$

A = Absorción de la muestra a las diferentes longitudes de onda.

l = paso óptico de la cubeta en cm.

c = concentración de la muestra en mg/ml, y

$E_{1\text{ cm}}^{0.1\%}$ = coeficiente de extinción de una solución 0.1% (p/v) a las diferentes longitudes de onda.

El segundo de los procedimientos se llevó a cabo en base a la composición de aminoácidos (Wetlaufer, 1962)(214). Se calculó el coeficiente de extinción molar a 280nm de acuerdo con la expresión:

$$e = n^{\circ}\text{Tyr} \times e_{\text{Tyr}} \quad n^{\circ}\text{Trp} \times e_{\text{Trp}} \quad n^{\circ}\text{Cistina} \times e_{\text{Cistinas}}$$

donde: $e_{\text{Tyr}} = 1340$

$e_{\text{Trp}} = 5550$

$e_{\text{Cistina}} = 150$

3.4.9. Punto Isoelectrico.-

La determinación se llevó a cabo por electroenfoque en gradiente de sacarosa 46.6%-0.0% (p/v) en una columna LKB-S100-1. Se utilizó primeramente una Ampholina de rango de pH 3.5-10, posteriormente se utilizó otra Ampholina de rango de pH: 5-7. El procedimiento es el recomendado por la casa comercial y es el siguiente:

a) Llenado de la columna y aplicación de la muestra:

En principio se introduce la solución densa del electrodo 25 ml, compuesta por 0.2 ml de H_2SO_4 concentrado, 12g de sacarosa y hasta 25 ml de H_2O . Después se introduce un gradiente lineal de sacarosa 46.6%-0.0% formado por: solución densa: 28g de sacarosa, 4,5 ml de Ampholina (intervalo de pH 3.5-10) al 40% y 37.5 ml de agua destilada. Concentración final de sacarosa 46.6%. Solu

ción ligera: 1.5ml de Ampholina y 58.5 ml de agua destilada. La concentración de Ampholina en el gradiente ya formado es del 2%.

El gradiente se introduce en la columna por medio de una bomba peristáltica a flujo constante. Cuando se formaron las 3/4 partes de gradiente en la columna se le aplicó la proteína, aproximadamente 10 mg en SSF. Por último se introduce la solución ligera de electrodo que contiene etanolamina (0.2 ml, 16,5 M) en 10 ml de agua destilada.

b) Focalización isoelectrica y vaciado de la columna:

El proceso se realiza a un voltaje de 300 V durante las primeras 15 horas y posteriormente se eleva el voltaje a 700 V hasta completar un total de 72 horas, y a una temperatura de 4°C. Finalizado el electroenfoque se extrae en primer lugar la solución densa de electrodo, posteriormente se eluye la columna succionando con bomba peristáltica. El contenido de la columna se recoge en un colector de fracciones a 2 ml por fracción. Se leen a 280 nm las fracciones en un espectrofotometro, se mide el pH de cada una de ellas a 4°C y, por último, se realizan inmunodifusiones de cada una de las fracciones colectadas frente a un antisueero anti-IgG de conejo.

3.4.10. Determinación cuantitativa de grupos sulfhidrilo.-

La determinación cuantitativa de grupos sulfhidrilo en el F(ab')₂ reducido exhaustivamente se llevó a cabo según el método de Haber y Anfinsen (215).

Basicamente el método consiste en tratar la proteína reducida exhaustivamente con 1-¹⁴C-yodoacetamida de baja actividad específica en condiciones en que la modificación de otros grupos funcionales de la molécula es mínima. El número de grupos sulfhidrilo de la proteína se deduce comparando la radioactividad espe-

cífica de la 1-¹⁴C-yodoacetamida con la radioactividad específica de la proteína carboximetilada.

El procedimiento seguido fué el siguiente:

3.4.10.1. Contaje de 1 microcurio de 1-¹⁴C-yodoacetamida.-

1 microCi de 1-¹⁴C-yodoacetamida fué sometido a las condiciones más similares posibles a las experimentales de marcaje de la proteína con objeto de determinar el número de cuentas por minuto (c.p.m) o designación por minuto (d.p.m) se obtienen en condiciones experimentales concretas, teniendo en cuenta los diversos factores que influyen en la extinción. Por ello 250 microCi de 1-¹⁴C-yodoacetamida de actividad específica 57mCi/mmol se disolvieron en 1 ml de una disolución de $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ "fria" 160mM que contenía Tris 10mM, NaCl 0.15M, EDTA 0.2mM y cloruro de guanidinio 6M a pH 7.8. De esta solución se tomaron 10 μl . llevándolos hasta 1 ml en el mismo y a continuación se pipetearon 10 alicuotas de 10 μl (cada una (0.025 μCi de actividad total) a sendos viales de contaje y se les llevó a 1 ml en el mismo tampón en presencia de 1 mg de $\text{F(ab}')_2$.

El contaje se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido (Unilux II, Nuclear Chicago Co). Al ml de solución radiactiva de cada vial se les adicionó 6 ml de NCS (solubilizador de tejidos, disolución 0.6N en tolueno, Amershan/Searle), se agitó hasta miscibilidad total y se añadieron 13ml de líquido de centelleo, compuesto de una disolución de 2.5-difeniloxazol (PPO) de 4g/l y de 2.2-p-fenilembis-5-/feniloxazol (POPOP) de 0.05g/l.

Se tomó como cpm de 1 microCi la media de los diez contajes.

3.4.10.2. Marcaje de la proteína y medida de la radioactividad in

corporada.-

Dos muestras con 2 mg del $F(ab')_2$ de la IgG de conejo se disolvieron cada una en 0.5 ml de disolución, Tris 10 mM conteniendo NaCl 0.15M, EDTA 2mM y cloruro de guanidinio 6M, pH 7.8. A estas soluciones se les adicionó 0.5 ml de ditioeritritol en el mismo tampón a concentración final de 10mM, y 20 mM, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y atmosfera de nitrogeno.

Todas las soluciones fueron burbujeadas previamente con nitrógeno.

Paralelamente dos muestras con 2 mg del $F(ab')_2$ de la IgG de conejo se disolvieron en 1 ml del mismo tampón pero sin ditiocitritol y se incubaron en las mismas condiciones. Estas constituyen los controles de incorporación de radiactividad inespecífica.

A continuación a cada una de las muestras reducidas y - controles se les adicionó 1 ml de $I^{14}CH_2CONH_2$ a 40 y 80mM de concentración final respectivamente en el mismo tampón de la reducción y con una actividad específica de 100 microCi/mmol, y se incubó a temperatura ambiente en obscuridad y atmosfera de nitrogeno durante 20 minutos. Esto se realizó por triplicado.

Tras la incubación todas las muestras de proteína se incluyeron en sendos sacos de dialisis y se dializaron contra un - tampón fosfato 0.01M con NaCl 0.15M, pH 7.2 hasta ausencia de radiactividad en el líquido de dialisis y posteriormente frente a otro que contenía urea 3M y ácido acético 0.1M pH 4.5 para redisolver los precipitados que aparecían en las bolsas de las muestras previamente reducidas.

Tras la dialisis, cada una de las disoluciones proteicas así como los respectivos sacos de dialisis troceados se incluyeron en sendos viales, tras esto se extraian los 2 ml de cada una de las muestras y se determinaba exactamente la concentración de cada una de ellos y 1 ml de las mismas se introdujeron en sendos viales, a continuación se añadieron a cada uno de ellos 6 ml de NCS, se agitaron hasta solubilización total y a continuación se añadió a cada vial 13ml de líquido de centelleo. Los viales, totalmente desprovistos de turbidez se introdujeron en el contador y se dejaron equilibrar a la temperatura de contaje durante 20 minutos. El contaje de cada vial se hizo por duplicado durante 2 minutos. Como blanco se incluyó 1 ml de líquido de dialisis del último cambio en idénticas condiciones.

3.4.10.3. Cálculos.-

La determinación cuantitativa del número de grupos sulfhidrilo por molécula de proteína se basa en el hecho de que la radioactividad incorporada en la proteína tratada con el $IC^{14}H_2CONH_2$ es directamente proporcional al número de grupos sulfhidrilo reactivos y por tanto una comparación de la actividad específica de la proteína marcada con la actividad específica de la $IC^{14}H_2CONH_2$ proporciona la relación molar de grupos sulfhidrilo a proteína, que equivale al número de grupos -SH por molécula. Por tanto:

$$\frac{\text{Act. Especifici Prote. marcada}}{\text{Act. Especifici. de } IC^{14}H_2CONH_2} = \frac{\text{Molaridad de grpp. -SH}}{\text{Molaridad de proteína}}$$

La actividad específica se expresó en microCi/mmol. El número de microCi se halló en cada caso tomando como d.p.m. de 1 microCi el valor experimental medido a tal efecto y como d.p.m. de la muestra, el valor medio obtenido de las dos determinaciones efectuadas en cada caso.

Como peso molecular del $F(ab')_2$ de conejo se tomó el valor de 97000 Dalton.

3.5. OBTENCIÓN DE ANTISUERO DE COBAYO FRENTE A IgG DE CONEJO.-

Una disolución de IgG en solución salina NaCl 0.15M tapada con fosfato 0.01M, pH 7.2 a una concentración de 1 mg/ml se calienta a 69.5°C durante 1 hora con objeto de inducir la formación de agregados con lo cual aumenta su inmunogenicidad. A continuación esta solución se puede almacenar a -20°C hasta su uso.

Se inyecta por vía intramuscular a los cobayos 20 de proteína en 0.5 ml. Estos 0.5 ml están compuestos de 0.23 ml de la solución salina, 0.25 ml de adyuvante completo de Freund y el resto de la proteína en la solución salina. El adyuvante de Freund está formado por un aceite mineral, y un agente estabilizador que contiene además una suspensión de microbacterias muertas que aumentan el poder inmunogénico de las proteínas inyectadas. (ACF) Antes de inyectar estas disoluciones son emulsionadas prolongadamente con jeringas a este fin.

La pauta seguida fue inyectar esta dosis durante 6 semanas una vez por semana.

Ocho días después de la última inyección se sangran los cobayos y se extrae el suero.

El suero obtenido (antisuero) se diluye 1:3 en solución salina y se precipita con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a concentración final de 2M. Se deja a 4°C durante una hora. Se centrifuga 15 minutos a 6000 rpm, se elimina el sobrenadante se disuelve en la menor cantidad posible de la solución salina y se dializa frente a solución salina hasta eliminar el sulfato. Se concentra hasta un volumen adecuado y se centrifuga a 6000 rpm durante 15 minutos. Se prueba

su potencia frente a IgG y sus fragmentos $F(ab')_2$ y pFc' mediante inmunodifusión doble bidimensional e inmunolectroforesis.(I.E.F)

3.6. OBTENCION DE $F(ab')_2$ ANTI ALBUMINA HUMANA.-

Para obtener $F(ab')_2$ de la IgG de conejo con especificidad de anticuerpo frente a la albúmina humana se procedió como sigue:

A conejos de la raza New Zealand del animalario de la F.J.D. se les inyectó por la vía intramuscular 100 μ g albúmina humana en 0.5ml conteniendo adyuvante completo de Freund en la misma proporción que se detalla en el apartado 3.5.

La pauta seguida fué inyectar esta dosis durante 6 semanas una vez por semana.

Posteriormente, 10 días después de la última inyección se obtienen muestras de sangre de los conejos como en 3.1 y los conejos cuyo suero daba banda de precipitación por inmunodifusión doble bidimensional frente a una dilución apropiada de albúmina humana, se seguían inmunizando aplicando las dosis citada una vez por mes obteniéndoles sangre 10 días después de cada inyección.

Una vez obtenido el suero se obtiene la fracción IgG del mismo como se detalla en el apartado 3.2. y de esta el $F(ab')_2$ como en 3.3.

3.7. OBTENCION DE FRAGMENTOS DE IgG DE CONEJO ANTI-ERITROCITO DE CARNERO.-

La obtención del $F(ab')_2$ de la IgG de conejo con especificidad de anticuerpo frente a hematies del carnero se realizó de la siguiente manera:

A conejos de la raza New Zealand procedentes del animalario de la F.J.D. se les inyectó por vía intravenosa 1 ml de eritrocitos de carnero al 5% en la misma solución salina que se detalla en el apartado 3.5 que previamente habían sido lavados al menos 3 veces en la misma solución.

La pauta seguida fué inyectar esta dosis cada 48 horas - durante las dos primeras semanas, dejar 2 semanas sin inmunizar inyectar la dosis durante 4 semanas una vez por semana y a los 10 días de esta última inyección obtener sangre de los conejos así tratados y ver su título de aglutinación frente a hematies de carnero.

El título de aglutinación se obtuvo incubando 1 ml de hematies de carnero al 2% en solución salina con diversas diluciones de suero obtenido de cada conejo. Aquellos conejos cuyo suero daba un título de aglutinación superior a 1/5000, se les siguió inmunizando una vez por mes y obteniendo el suero.

El $F(ab')_2$ se obtiene de una manera analoga a como se detalla en los apartados 3.1 y 3.2 .

El Fab'-aE y Fab'-aE-reducido se obtuvieron como en 3.8 .

El Fab-aE se obtuvo aplicando el método descrito por Porter en 1959 (89) con algunas modificaciones . En función del material de partida, IgG-aE o $F(ab')_2$ -aE, se llevó a cabo su obtención procediendo según las siguientes dos rutas:

a) Por digestión papáinica de IgG-aE en un tampon de fosfatos 0.1 M pH 7 conteniendo además EDTA 2 mM durante 4 horas, pasando posteriormente el digerido por un inmuno-absorbente que tenía acoplado a la matriz de Sepharosa una IgG con actividad anticuerpo anti porción pFc' de la IgG de conejo. De esta forma el fragmento Fc resultante de la digestión se quedaba retenido a la sepha

rosa y el Fab eluia con el tampón de elución. Posteriormente las fracciones eluidas se ensayaban con anticuerpos anti pFc' de conejo y anti IgG de conejo por inmunodifusión doble bidimensional.

b) Por digestión papáinica del F(ab')₂-aE en las mismas condiciones que a) posteriormente el digerido se pasa a través de una columna de Sephadex G150 o Ultrogel AcA44. Colectándose y concentrando el pico que eluye con un volumen de elución equivalente al de proteínas de alrededor de 5000 Dalton.

3.8. MODIFICACION QUIMICA (CARBOXIMETILACION) DEL FRAGMENTO F(ab)₂

En este apartado se pretendió estudiar el efecto de la reducción y alquilación selectiva de los puentes disulfuro evitando la rotura de los intracatenarios y la modificación química de los grupos de cadena lateral.

La reducción y alquilación selectiva de los puentes disulfuro intercatenarios se llevó a cabo con algunas modificaciones al método descrito por Gall y otros (216) que son las mismas que las descritas por Lopez de Castro y col.(128). Estas condiciones son análogas a las expuestas en el apartado 3.4.10, salvo que ahora no se emplearon agentes desnaturalizantes y que las concentraciones de reductor DTE utilizadas estuvieron comprendidas en el rango que va desde 0.01mM a 10mM. La concentración del alquilante yodo-acetamida, fue de un exceso 4 veces molar para cada concentración de reductor.

Se emplearon tres procedimientos diferentes para cuantificar y asignar los grupos modificados a cada una de las concentraciones de reductor.

3.8.1. Técnicas Isotópicas.-

Por carboximetilación radiactiva con $IC^{14}H_2CONH_2$ de los

grupos S-S previamente reducidos se obtiene como se indica en el apartado 3.4.10.3, el número total de grupos que a cada concentración de reductor se modifican.

3.8.2. Filtración en gel.-

A cada concentración de reductor, las muestras una vez -alquiladas (sin radiactividad) se filtraron por un gel de Ultrogel AcA44 en columnas de Pharmacia 2.6 x 75cm eluidas con SSF -previamente calibrada.

3.8.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida -SDS.-

Asimismo a cada concentración de reductor 100 g de la -proteína modificada se corrieron en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS con geles al 7.5% y 10%.

3.9. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA.-

Al objeto de estudiar los posibles cambios en la estructura espacial de la molécula de anticuerpo que subyacen a las variaciones en la actividad anticomplementaria inducidas por la modificación química específica se realizaron los espectros de dicroísmo circular, tanto del fragmento $F(ab')_2$ a AH y $F(ab')_2$ a EC. Asimismo de los fragmentos modificados por carboximetilación selectiva y que posteriormente se utilizaron en pruebas de actividad biológica se obtuvieron los espectros correspondientes.

Los espectros se obtuvieron entre 200 y 320 nm en un dicroógrafo Jobin Yvon, Mack III, provisto con lámpara de Xenon de 250 w, a una velocidad de barrido de 0.5 nm/seg. Las soluciones de proteína estudiadas fueron previamente centrifugadas a 3800g y filtradas por millipore de 0.45 micras, y estaban disueltas en un medio que contenía fosfatos 0.004M, NaCl 0.85%, EGTA 10mM y -

MgCl₂ 4.5mM a pH 7.21, la temperatura a la que se obtuvieron los espectros fue de 20°C, y las concentraciones de proteína utilizadas fueron de 0.1-0.3 mg/ml para el UV lejano y 0.8-1.0 mg/ml para el próximo. Los resultados, valores medios de tres determinaciones, se expresaron en términos de (θ) elipticidad media por residuo en unidades de grado x cm²/decimol. El peso medio por residuo se tomó 110 Dalton.

3.10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA DEL F(ab')₂ NATIVO Y MODIFICADO POR LA VIA ALTERNATIVA.-

Se realizó por dos técnicas diferentes.

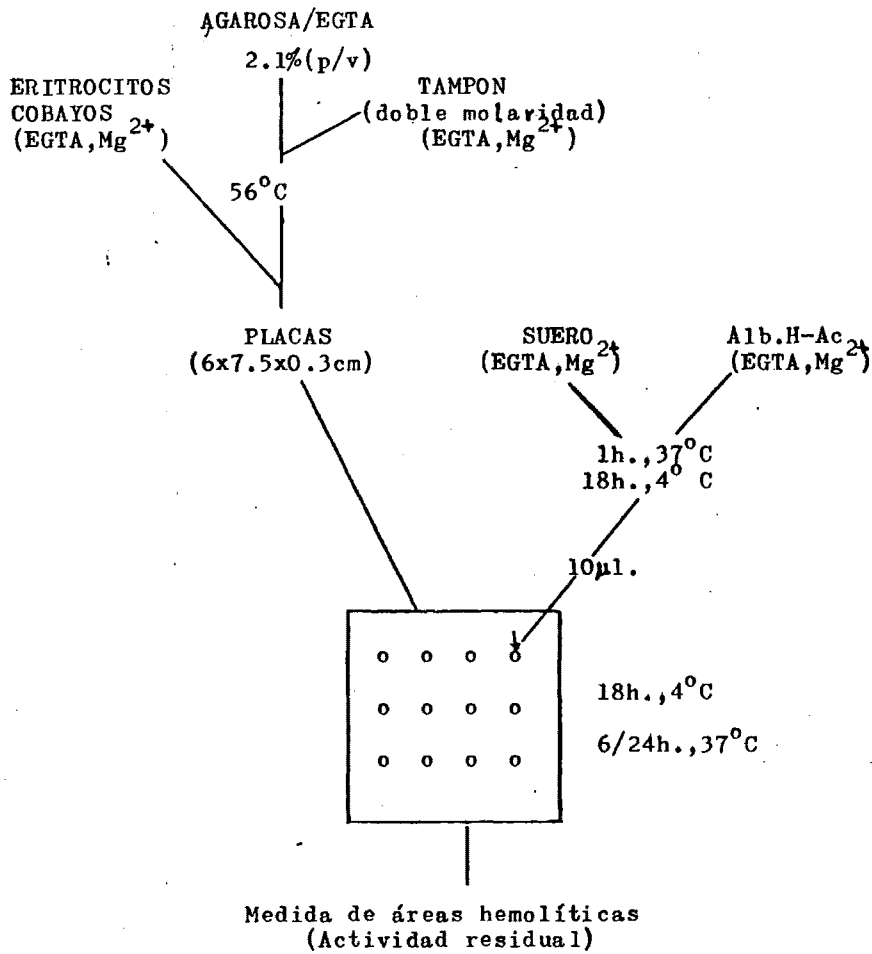
3.10.1. Ensayo hemolítico en placa.-

Se procedió según el método descrito por Martín y Lachman (217) con algunas modificaciones. Este ensayo precisa de la fabricación previa de unas placas de agarosa al 2.1% en presencia de eritrocitos de cobayos o de carnero en EGTA y MgCl₂, a las que se adiciona, en orificios practicados a este fin 10 μl. de diversas diluciones de suero humano, de cobayos o de conejo en un tampón que contiene fosfato 0.004M, NaCl 0.85%, EGTA 10 mM y MgCl₂ 4.5 mM a pH 7.21 (PBSa) previamente incubados 1 hora a 37°C y 18 horas a 4°C. Asimismo se les adiciona sueros que han sido previamente incubados con complejos de albúmina humana-Ac (donde Ac puede ser IgGantiAH, F(ab')₂antiAH, FabántiAH o FabántiAH red), en condiciones bloqueantes para la activación de la vía clásica. Las placas rellenas se mantienen 18 horas a 4°C y posteriormente se pasan a 37°C durante 24 horas. A continuación se leen las áreas hemolíticas obteniéndose una relación lineal entre el logaritmo de la concentración del suero y su área hemolítica.

En este sistema la agarosa y el Mg²⁺ actúan como activadores de la vía alternativa del Complemento.

Fig. nº 8 ENSAYO HEMOLITICO EN PLACA

(VIA ALTERNATIVA)



Obtenemos de esta forma una medida: de la hemólisis residual. La disminución del área de hemólisis en los casos de los sueros incubados con complejos inmunes nos da una medida de la capacidad de estos complejos para consumir complejos por la vía alternativa.

La gráfica número 8 supone un esquema del procedimiento seguido.

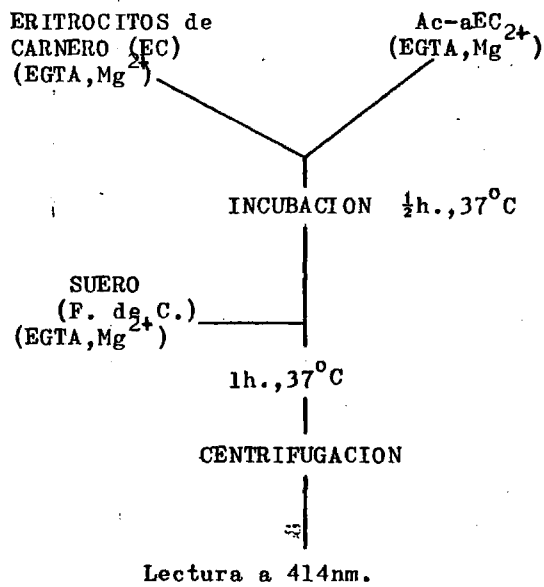
3.10.2. Ensayo hemolítico en fase soluble,-

Basicamente este ensayo consiste en la formación de complejos eritrocitos de carnero (EC)-Ac (donde Ac puede ser IgG anti EC, $F(ab')_2$ anti EC, Fab anti EC, Fab anti EC red o Fab anti EC en presencia de EGT₂ incubandolos 1/2 a 37°C, a los que se adicionaba suero de cobayo conejo o humano como fuente de Complemento incubando se 1 hora a 37°C en condiciones restrictivas para la vía clásica. Posteriormente se centrifuga a 1500 rpm y se leen los sobrenadantes a 414 nm en un espectrofotometro.

El 100% de lisis se obtenía adicionando H₂O en vez de suero a los complejos EC-Ac o a EC sin activar con anticuerpo hasta el volumen final utilizado en cada experimento. Los controles 0% de lisis se obtuvieron cuando se incubaban los EC con suero, fuente de Complemento sin ser activados por anticuerpo específico o bien por adición del suero al conjunto de EC IgG $F(ab')_2$ sin actividad de anticuerpos conocida o con actividad de anticuerpo específico pero no anti eritrocito de carnero. La gráfica nº 9 - representa un esquema del procedimiento seguido.

En este ensayo se utilizaron diversas cantidades de anticuerpo frente a una cantidad fija de eritrocitos y para cada una de estas diferentes diluciones de suero (fuente de Complemento)

Fig. nº 9. ENSAYO HEMOLITICO EN FASE SOLUBLE (VIA ALTERNATIVA).



3.10.2.1. Estudios cinéticos.-

A una cantidad constante de Complemento se adicionó complejos EC-F(ab')₂-aE, EC-FabáE, EC-FabáEred, Ec-FabaE previamente formados como se describe en 3.10.1. estableciéndose las cinéticas comparativas de hemólisis en un espectrofotometro Cary-219 a 37°C y a 414nm.

3.10.2.2. Variación de la actividad anticuerpo específico.

Se procedió al marcaje del F(ab')₂-aE con ¹²⁵I por el método de la cloramina-T expuesto por Hunter y Greenwool (218) y Climan y Taylor (219).

A 100 g de proteína F(ab')₂ contenida en 100 µl de solución salina se añaden 50 µl de ¹²⁵I(1mCi) en un tampón fosfato - 0.5M, pH 7.5 e inmediatamente 100 µl de cloramina T (sal sodica de N-monocloro-p-toluenosulfonamida) a una concentración de 1mg/ml en H₂O. Transcurrido 1 minuto se adicionan 100 µl de metabisulfito sodico (a 1mg/ml en H₂O). Después de 3 minutos se añaden 0.5 ml de solución salina y se dializa frente a un volumen de 1 litro de solución salina fría. A continuación se añade bien 1ml de F(ab')₂-aE (1mg/ml) o bien ml de Albúmina bovina (1mg/ml) y se continua en dialisis a 4°C hasta obtener fondo en los líquidos - de dialisis.

De este F(ab')₂-aE-¹²⁵I se obtuvo el FabáE-¹²⁵I por reducción con DTE 2mM y posterior alquilación con ICH₂CONH₂ 8mM.

Estos fragmentos fueron incubados con eritrocitos de carnero al 0.75% de concentración final durante 1 hora a 37°C.

Estos eritrocitos previamente fueron lavados en la misma solución que se detalla en 3.10.1. que contiene además suero de

conejo al 1/500.

Posteriormente los incubados fueron centrifugados a 1500 rpm y 4°C obteniéndose alicuotas de 1 ml de los sobrenadantes la vados 2 veces en las mismas condiciones. Al sedimento final se le adicionó 2 ml de H₂O recogiendo 1 ml del lisado y midiendo la radiactividad de todas las alicuotas obtenidas.

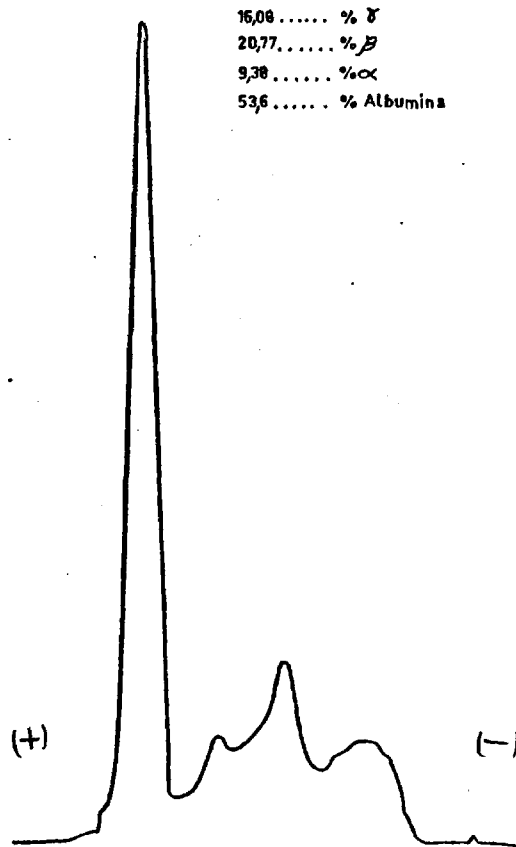
Asimismo un F(ab')₂-aAH-¹²⁵I marcado paralelamente al -- F(ab')₂-aE-¹²⁵I se utilizó como control de la incorporación de -- radiactividad inespecífica a la superficie de los hematíes.

4. RESULTADOS.-

4. RESULTADOS.-

4.1. OBTENCION DEL SUERO DE CONEJO NORMAL.-

La fig. 10 muestra el perfil densitométrico de una electroforesis en acetato de celulosa del suero de conejo normal obtenido. A continuación se procedió al aislamiento de la fracción más catódica (la γ).



4.2. OBTENCION DE LA IgG.-

La fig. 11 muestra el perfil del eluido de la cromatografía en DEAE-celulosa DE-11 del suero de conejo normal.

La zona comprendida entre las flechas es la que se colecta, concentra y se realizan las pruebas de pureza.

4.2.1. Control de pureza.-

El eluido así obtenido es IgG pura en base a los siguientes criterios de pureza:

4.2.1.1. Inmunoelectroforesis.-

La foto nº 1 es una inmunoelectroforesis del eluido pocillo inferior, frente a antisuero total de conejo obtenido en asnos (Bheringwerke-AG) comparada con el desarrollo de un suero de conejo normal, pocillo superior. Se evidencia una única banda en la zona gamma del espectro inmunoelectroforético característica de la IgG.

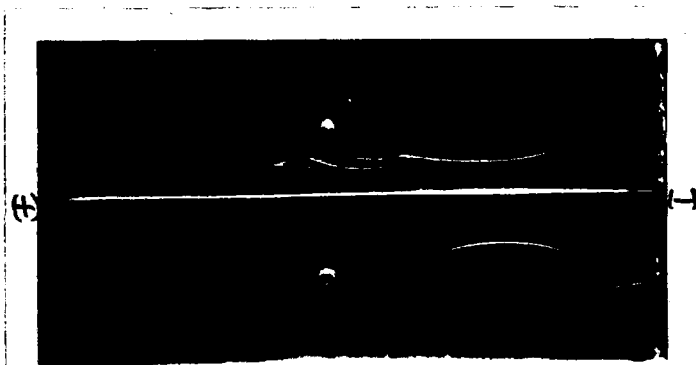


Foto nº 1.

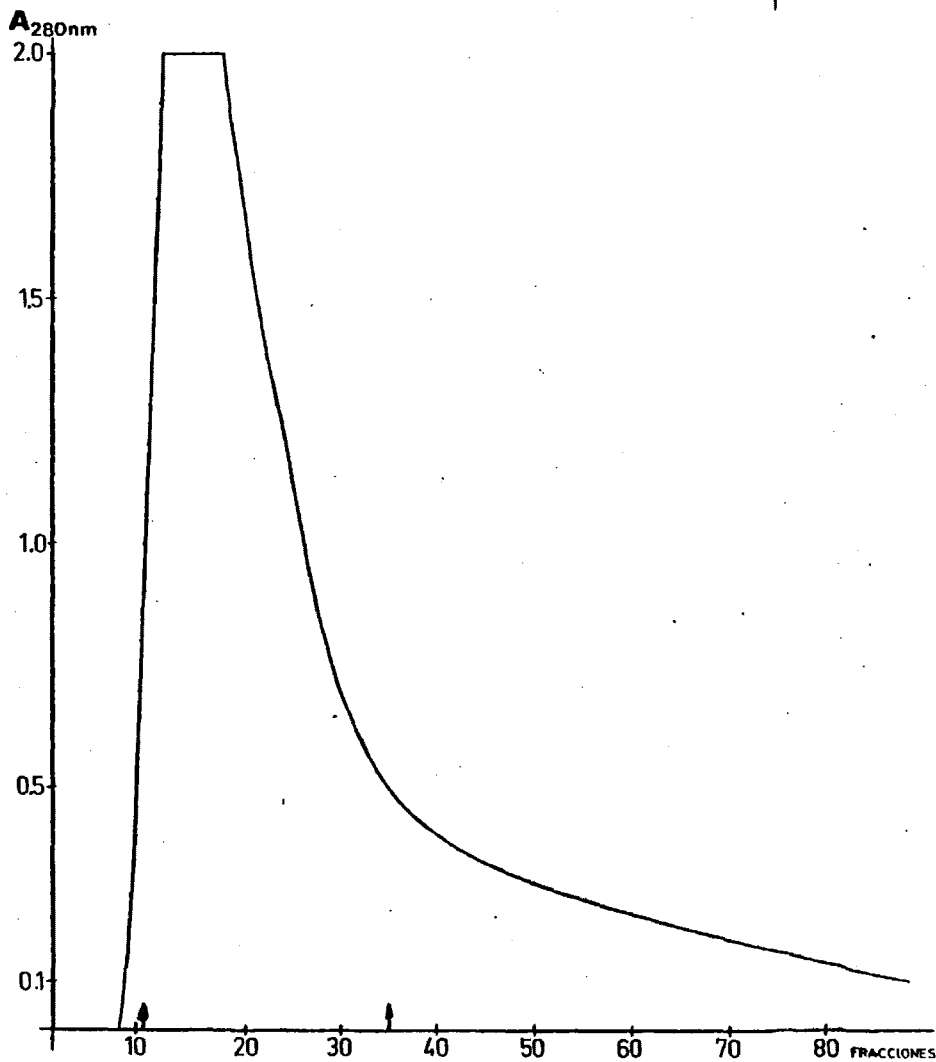


Fig. nº 11.-- Eluido cromatografía de un suero de conejo a través de una resina de DEAE-celulosa DE-11.

4.2.1.2. Inmunodifusión.-

La foto nº 2 es una inmunodifusión doble bidimensional de seis preparaciones diferentes de IgG frente a un antisuero, anti proteínas totales de conejo obtenido en asnos.

Se observa una única banda de precipitación que dá identidad con las adyacentes, lo que sugiere la presencia de una sola especie protéica.

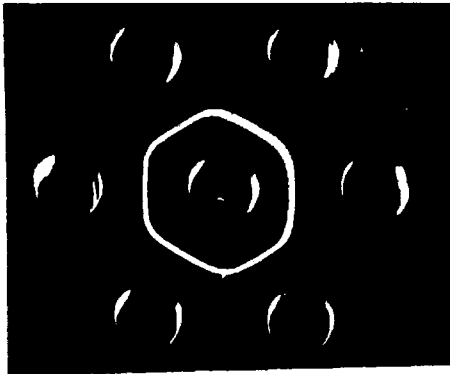


Foto nº 2.

4.2.1.3. Filtración en gel.-

La fig. nº 12 representa el eluido de la IgG obtenida, - por filtración en gel de Sephadex G-200 en una columna de Pharmacia K26/45 con flujo invertido. La inexistencia de otros picos, la simetría del obtenido y el V_0 del máximo del pico obtenido nos indican que se trata de una única especie molecular de PM alrededor de 150.000 Dalton.

4.2.1.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida.-

La foto nº 3 es una electroforesis en gel de poliacrilamida de IgG con geles a 7.5% según se detalla en materiales y métodos.

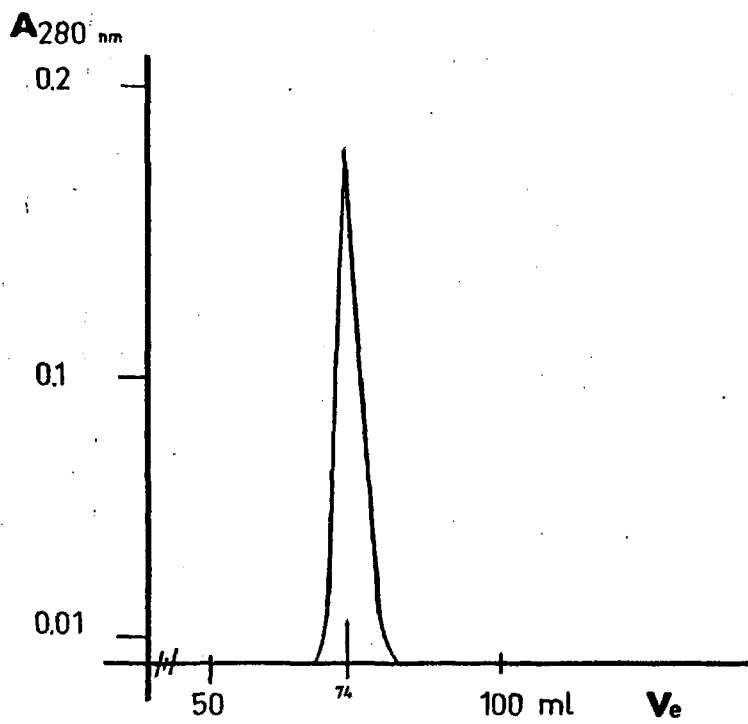


Fig. nº 12.- Eluido de la IgG obtenida a través de una columna de Sephadex G-200.



Foto nº 3.

4.3. OBTENCION DEL FRAGMENTO $F(ab')_2$.

La foto nº 4 es una inmunolectroforesis del digerido -- pepsínico de IgG (pocillo superior) frente a un antisuero anti-- gamma-globulina de conejo, comparado con la IgG de conejo. Las -- dos bandas del digerido con movilidad más anódica corresponden al $F(ab')_2$ y pFc; el dominio C_H2 es digerido en pequeños fragmentos



Foto nº 4.

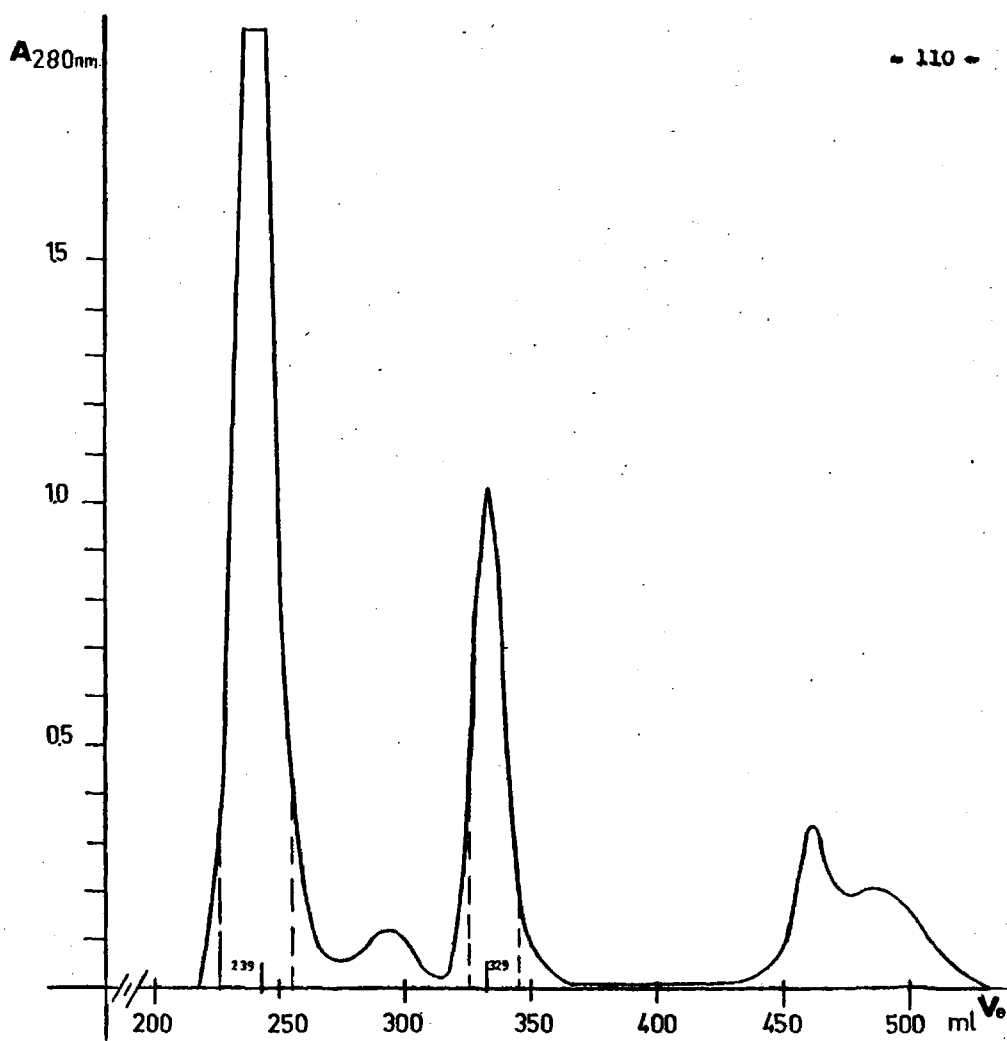


Fig. nº 13.- Perfil de elucion del digerido pepsínico de IgG de conejo a través de Ultrogel AcA44.

La fig. 13 representa el perfil de elucción (del digerido pepsínico de IgG) a través de Ultrogel AcA44 en una columna de Pharmacia K26/100.

Colectamos, centrifugamos y analizamos la pureza de las fracciones comprendidas entre las del primer pico.

4.3.1. Control de pureza.-

La porción colectada contiene $F(ab')_2$ puro en base a los siguientes criterios de pureza.

4.3.1.1. Inmunolectroforesis.-

La foto nº 5 es una I.E.F/ de $F(ab')_2$ pocillos medio e inferior, frente a un antisuero anti-gamma-globulina de conejo obtenida en cobayos, comparada con IgG, pocillo superior. Las bandas correspondientes al $F(ab')_2$, una en cada caso, son más anódicas, con una movilidad en la zona $\beta_2-\gamma_1$ y evidencian la existencia de una única especie molecular.

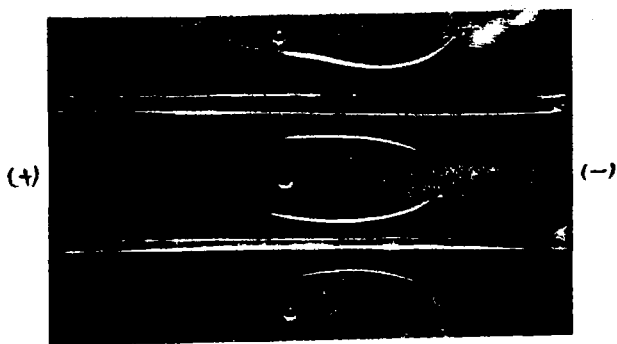


Foto nº 5.



4.3.1.2. Inmunodifusión.-

La foto nº 6 es una inmunodifusión de $F(ab')_2$, pocillo superior derecho, e IgG pocillo superior izquierdo, frente a un antisuero anti-gamma-globulina de conejo obtenido en cabras. (Los pocillos inferiores no contienen preparaciones). Se observa una única banda de precipitación en cada caso además de una identidad parcial, la banda de precipitación de la IgG se prolonga más allá de la intersección de la del $F(ab')_2$.



Foto nº 6.

La foto nº 7 es una inmunodifusión de $F(ab')_2$, pocillo inferior izquierdo, IgG, pocillo superior izquierdo, y pFc' pocillos superior e inferior derechos, frente a anti-gamma-globulina obtenida en cobayos. Las bandas del $F(ab')_2$ dan identidad cruzada con la IgG y no identidad (cruce) con la banda del pFc', mientras que esta última dá por el otro lado identidad parcial con la IgG.

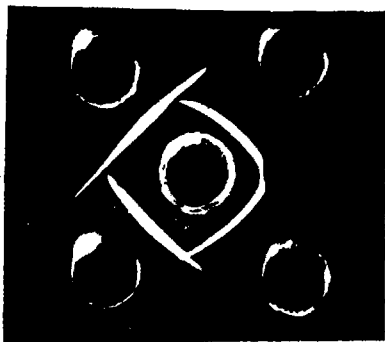


Foto nº 7

4.3.1.3. Filtración en gel.-

La fig. 14 representa el eluido del $F(ab')_2$ por filtración en gel de Sephadex G-200 en una columna de Pharmacia K26/45 con flujo invertido. La inexistencia de otros picos, la simetría del pico obtenido y su V_e son indicativos de hallarnos frente a una única especie protéica de PM aproximado de 50000 Dalton.

4.3.1.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida. (EGPA).-

La foto nº 8 es una EGPA de una $F(ab')_2$ con geles al 7.5% según se detalla en materiales y métodos.

La foto nº 9 es , asimismo un EGPA de una IgG y de un $F(ab')_2$ con el mismo tipo de geles y procedimiento de desarrollo. Lo que evidencia que el $F(ab')_2$ migra más hacia el cátodo - que la IgG.

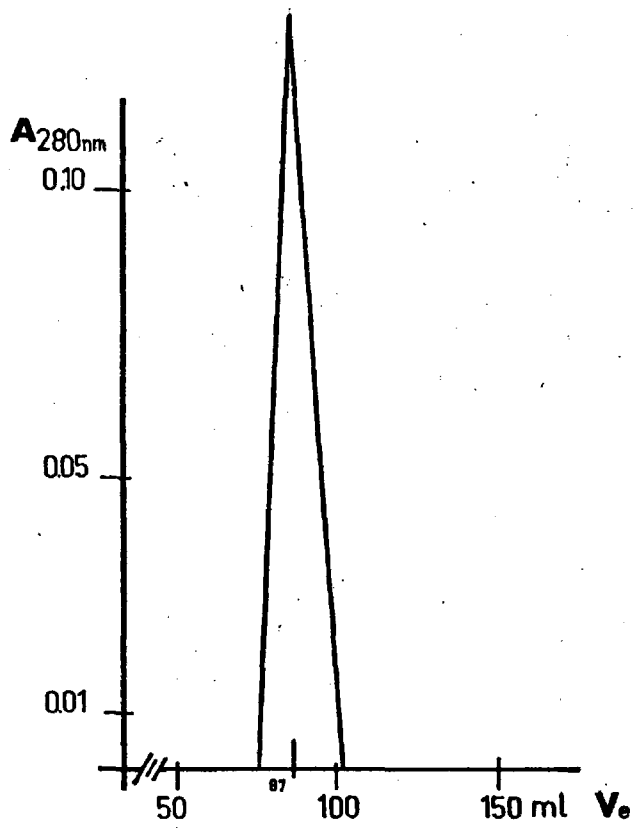


Fig. nº 14.- Eluido del $F(ab')_2$ obtenido a través de Sephadex G-200.



Foto nº 8



Foto nº 9

4.4. CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DEL $F(ab')_2$.-

4.4.1. Movilidad Electroforética en gel de agar.-

La foto nº 10 refleja el comportamiento de este fragmento
En el pocillo superior se depositó un suero de conejo normal, en
el central IgG y en el inferior $F(ab')_2$.

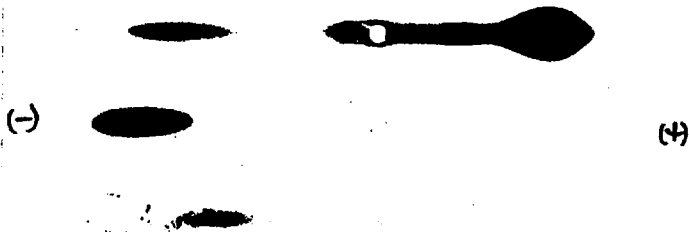


Foto nº 10

Como se puede observar el $F(ab')_2$ exhibe una movilidad más anódica
que la IgG

4.4.2. Estimación de su peso molecular.-

4.4.2.1. Filtración en gel.-

La fig 15 recoge el comportamiento en filtración en gel, a través de una columna K26/45 de Sephadex G-200 expresado como su volumen de elución, del $F(ab')_2$ comparado con el de otras proteínas patrón, en representación frente al Log. del peso molecular.

La fig. 16 recoge este mismo comportamiento, expresado como V_e/V_0 , en representación frente al Log. del peso molecular.

Se observa una buena linealidad de acuerdo con el método utilizado y el peso molecular aproximado obtenido por este procedimiento para el $F(ab')_2$ de la IgG de conejo fue de 98000 Dalton.

4.4.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, (EGPA-SDS).-

Las fig. 17 y 18 recogen el comportamiento en EGPA-SDS, expresado como su movilidad relativa, del $F(ab')_2$ comparado con el de otras proteínas patrón, en representación frente al log. del peso molecular, según se detalla materiales y métodos.

La fig. 18 forma parte de un trabajo más amplio que no se incluye en el que aquí se presenta.

El peso molecular aproximado obtenido para el $F(ab')_2$ de la IgG de conejo por este procedimiento fue de 96000 Dalton.

4.4.3. Cálculo del radio molecular.-

La tabla nº 10 recoge los valores de las constantes $V_e, K_D, a/r$ y r , de la columna que se utilizó, para cada una de las pro-

Fig. nº 15.- Representación de los V_e de diferentes proteínas obtenidas por filtración en gel de Sephadex en columnas (45 x 2,6cm) frente al log. de sus pesos moleculares.

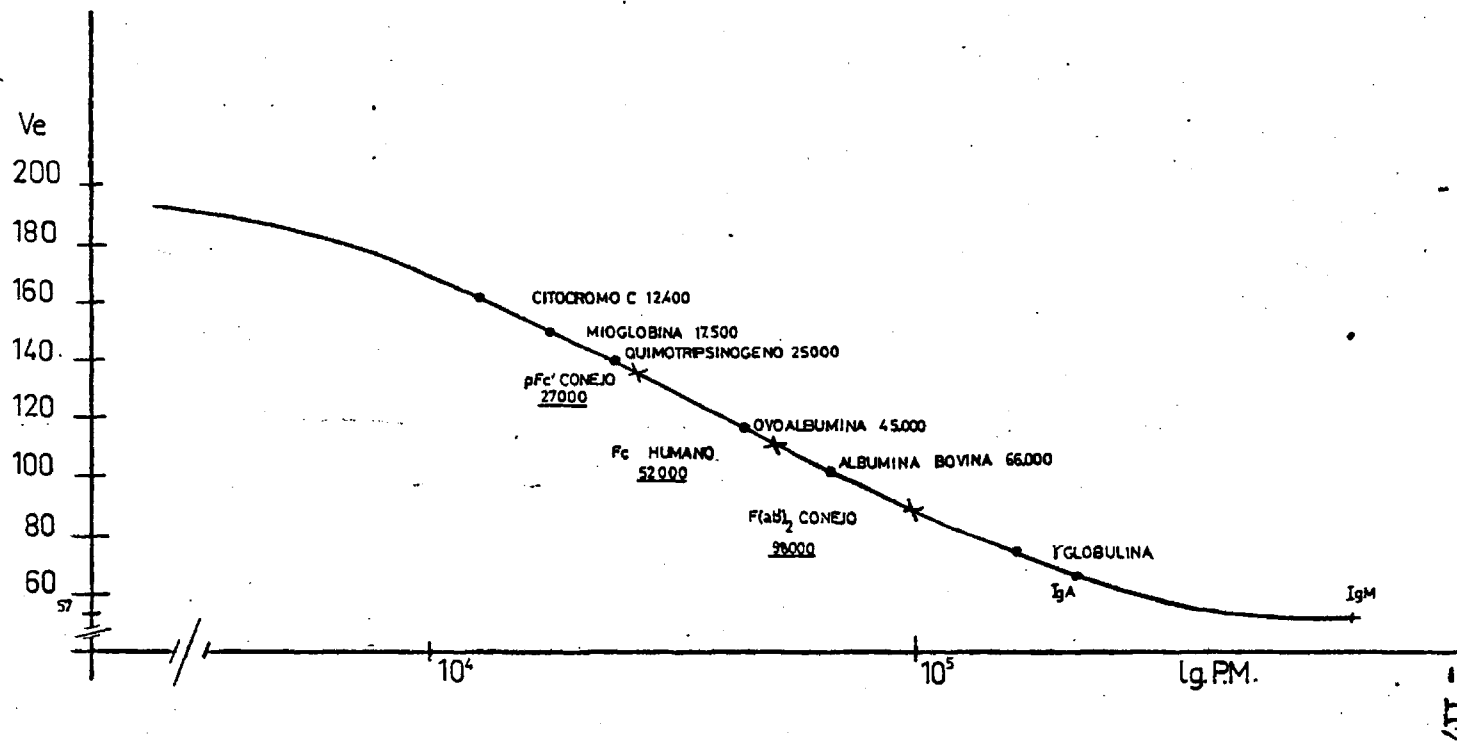
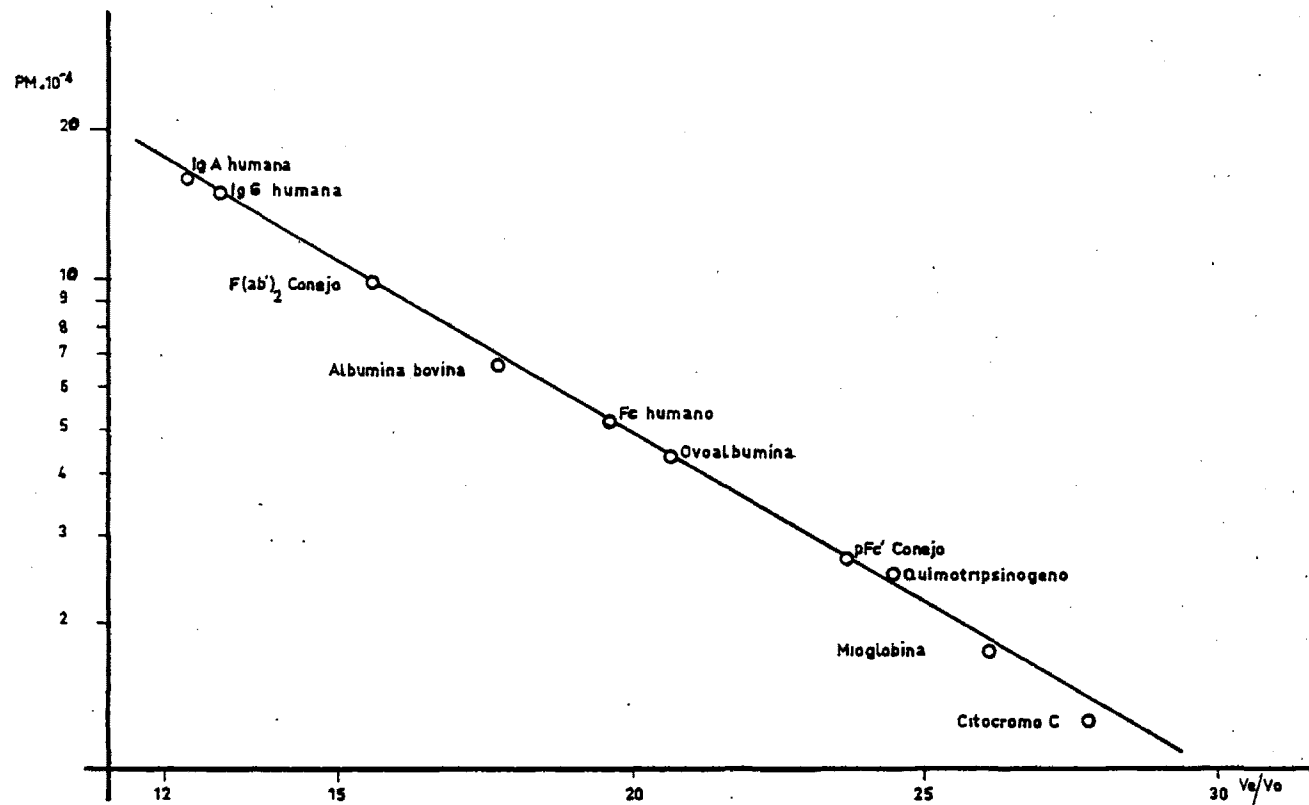


Fig. nº 16.- Representación gráfica de V_e/V_o de diferentes proteínas en columnas K26/45 a través de Sephadex G-200 frente al log. de sus pesos moleculares.



EGPA-SDS 10 %

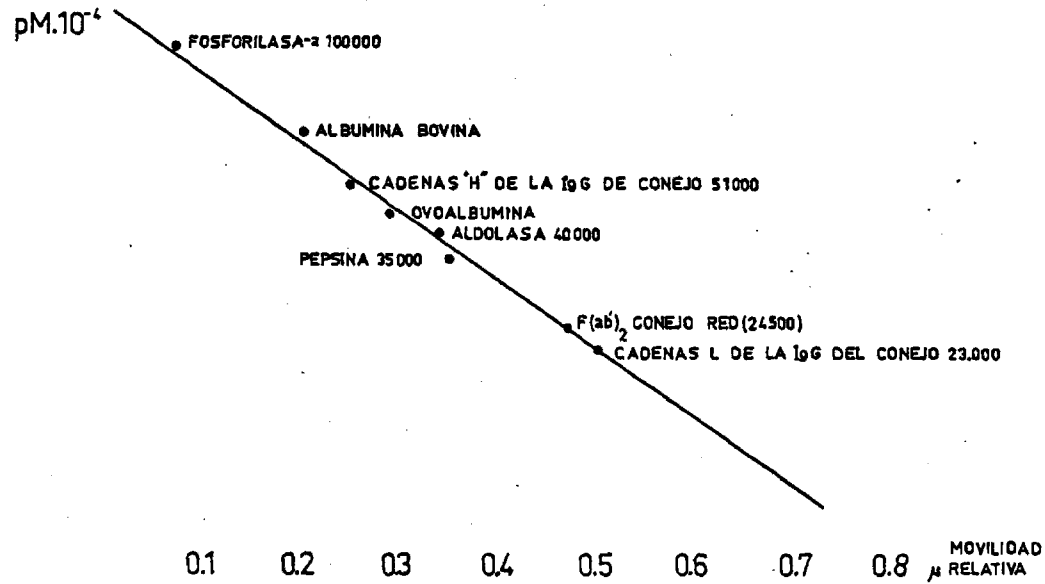


Fig. nº 17.- Representación en escala semi-logarítmica de los complejos proteína -SDS expresado como sus movilidades relativas respecto al marcador (azul de - bromofenol) en geles de poliacrilamida al 10% frente a sus pesos moleculares.

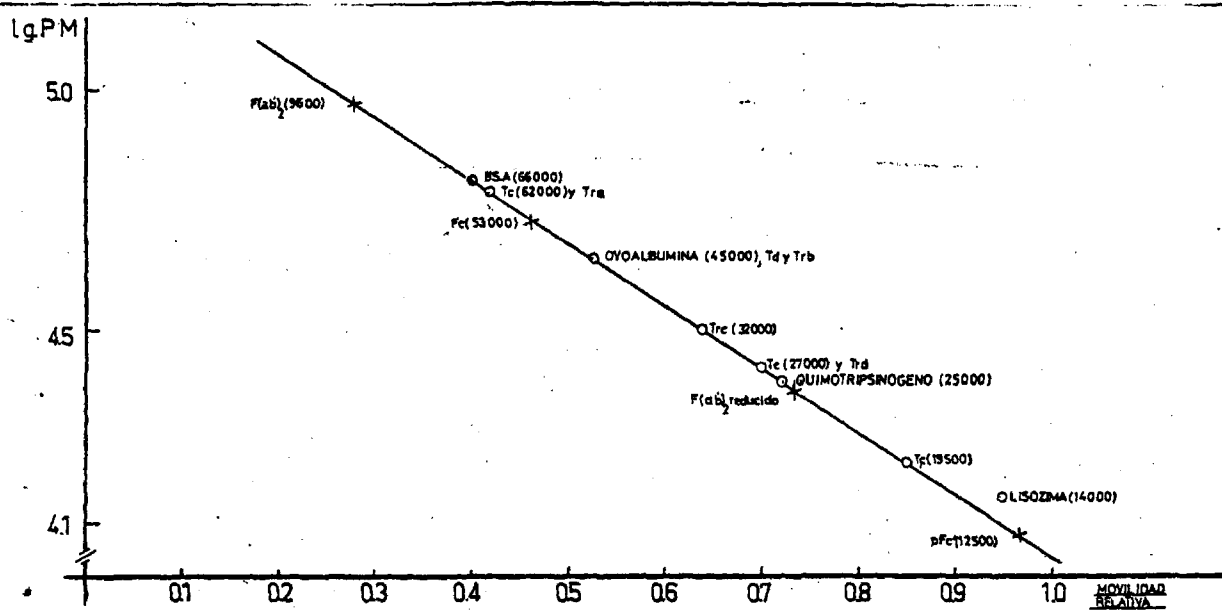


Fig. nº 18.- Comportamiento de los complejos proteína-SDS, expresado como sus movilidades relativas respecto al marcador (azul bromofenol), en geles de poliacrilamida al 7.5%, frente al log. de sus pesos moleculares.

teinas patrón utilizadas y para el $F(ab')_2$ de la IgG de conejo.

La determinación del valor de K_D para cada proteína eluida se obtuvo aplicando la expresión citada en el apartado 3.4.3. donde $V_t = 206$ ml, $V_0 = 57$ ml, $B = 23$ ml/g, y $d = 1.65$ g/ml.

Asimismo la tabla nº 10 recoge los valores de los radios moleculares, a , de cada una de las proteínas patrón así como el del $F(ab')_2$.

El radio de poro efectivo de la columna para el $F(ab')_2$ según se apuntó en el apartado 3.4.3. es la media de los correspondientes al Fc humano, albumina bovina, IgG e IgA resultando ser 152.8 \AA .

El radio molecular a obtenido para el $F(ab')_2$ de la IgG de conejo fue de 43.97 \AA .

4.4.4. Cálculo del coeficiente de difusión.-

La tabla nº 10 recoge asimismo el valor del coeficiente de difusión para el $F(ab')_2$ obtenido según se detalla en el apartado 3.4.4. resultando un valor de $4,87 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$.

4.4.5. Espectroscopia de Absorción.-

La fig nº 19 representa el espectro de absorción del $F(ab')_2$ en el ultravioleta próximo a la concentración que se detalla en el apartado 3.4.5., observándose un máximo característico al alrededor de los 280 nm y dos "hombros" sobre los 286 y 293nm

4.4.6. Dicroísmo circular.-

Las fig nº 20 y 21 exhiben el perfil de los espectros de

PROTEINAS	V_e (ml)	K_D	a/r	$a(\text{Å})$	$r(\text{Å})$	D
<i>Citocromo - C</i>	159	0,7152	0,0769	18,8	244,47	
<i>Mioglobina</i>	149	0,6451	0,0988	19	192,31	
<i>Quimotripsinogeno</i>	139	0,5750	0,1224	21	171,5	
<i>Ovoalbumina</i>	118	0,4277	0,1792	27,49	153,4	
<i>Fc humano</i>	112	0,3857	0,19795	30,34	153,3	
<i>Albumina bovina</i>	101	0,3085	0,2366	36,35	153,6	
<i>IgG humana</i>	74	0,1192	0,379	57,96	152,9	
<i>IgA humana</i>	71	0,09817	0,4047	61,27	151,39	
<i>F(ab')₂ conejo</i>	89	0,2244	0,2878	43,97	152,8	4,87

Tabla. nº 10. Constantes hidrodinámicas de filtración en gel de Sephadex G200 en columnas K26/45 de las proteínas patrón utilizadas y del F(ab')₂.

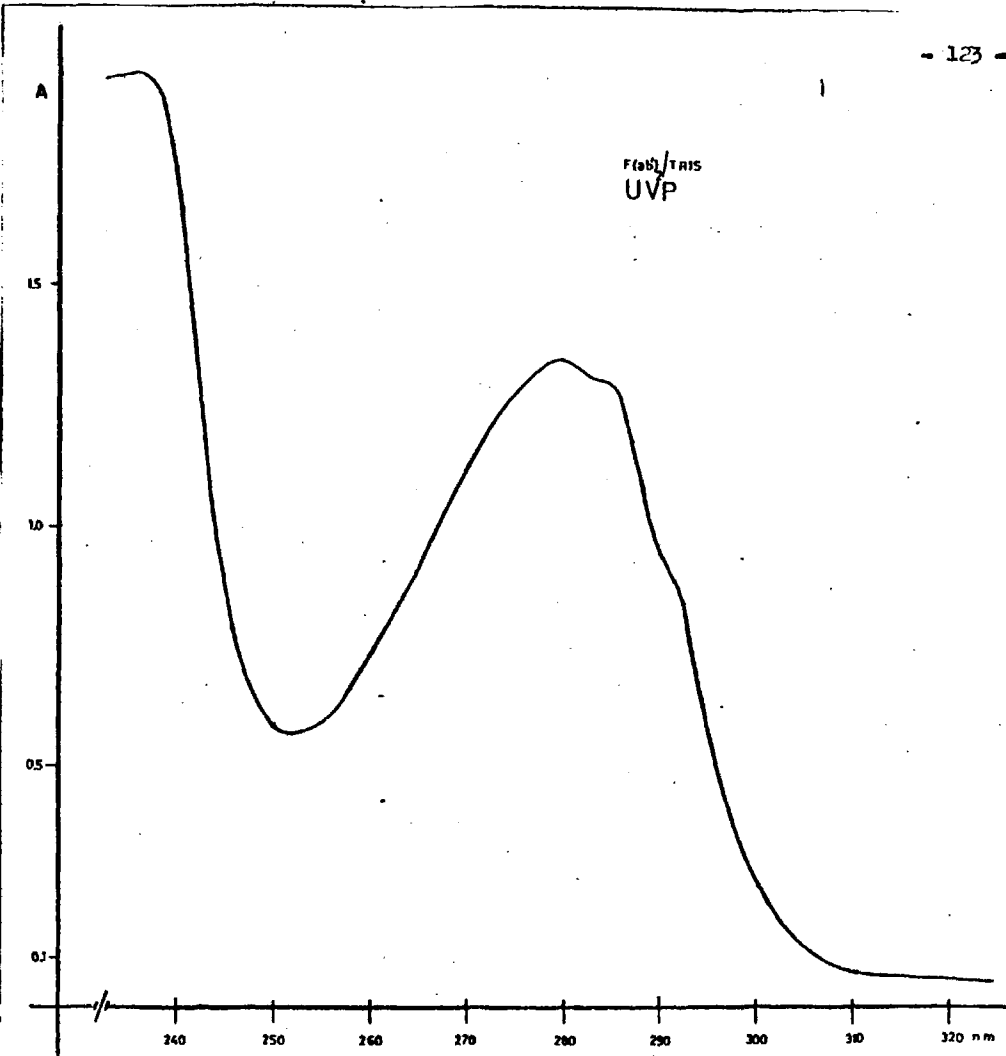


Fig.nº 19.- Espectro de absorción en el UV próximo del F(ab')₂ de la IgG de conejo.

$(\theta) \cdot 10^{-5}$

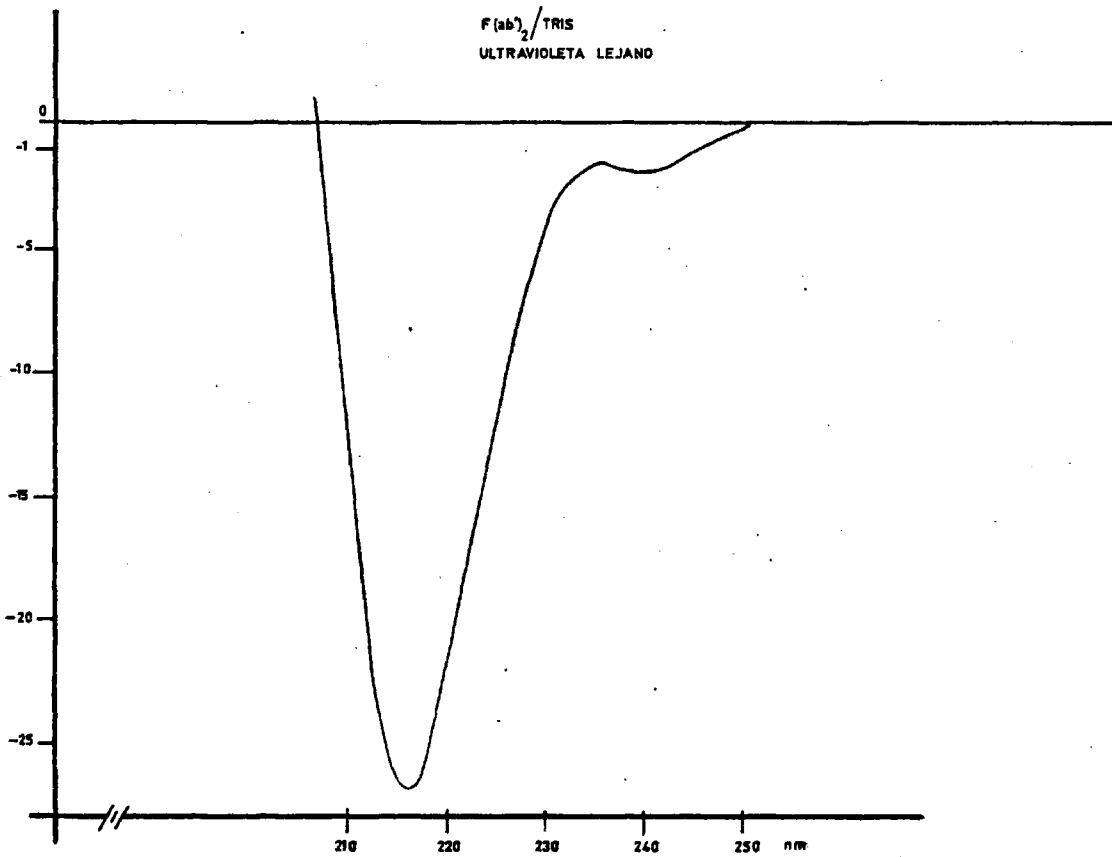


Fig. nº 20.- Espectro de dicroísmo circular del $F(ab)_2$ (UV lejano).

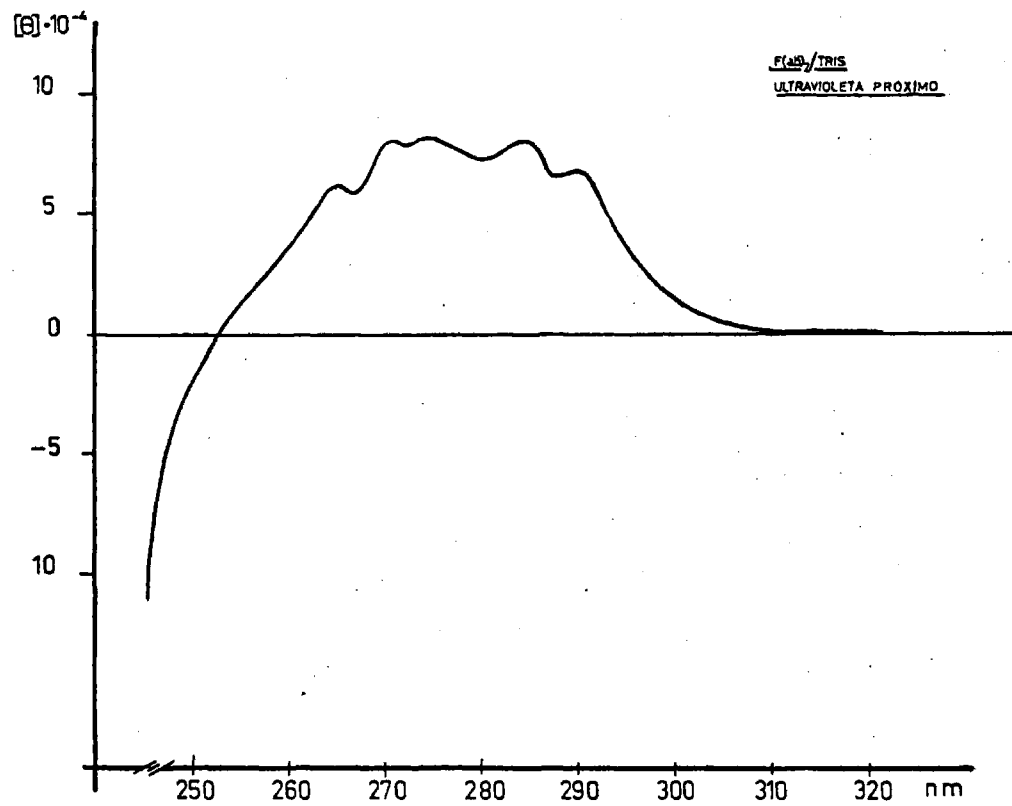


Fig. nº 21.- Espectro de dicroísmo circular del F(ab')₂. (U.V. próximo).

'dicroísmo circular del $F(ab')_2$ en el ultravioleta lejano (210---240nm) y próximo (250-320nm) respectivamente, en las condiciones que se detallan en el apartado 3.4.6. Es de destacar las bandas a 217 (-), 241(-), 265(+), 270(+), 273(+), 285(+) y 291(+)nm

4.4.7. Análisis de aminoácidos.-

La parte superior de la tabla nº 11 recoge los % molares de los aminoácidos invariantes con respecto al tiempo de hidrólisis del $F(ab')_2$, a las 24, 48, 72 y 96 horas así como la media de estos valores y la media de los % molares de todos los aminoácidos.

La parte inferior de la misma tabla recoge los % molares del resto de los aminoácidos y está complementada por la tabla nº 12 que representa los moles de Trp por mol de $F(ab')_2$ y la tabla nº 14 que hace referencia a los moles de Cys por mol de $F(ab')_2$.

4.4.8. Determinación del coeficiente de extinción.-

La tabla nº 13 recoge los valores obtenidos para el coeficiente de extinción de una disolución 0.1% (p/v) de $F(ab')_2$ por los métodos indicados en el apartado 3.4.8.

	Longitud de onda nm	$E_{cm}^{0.1\%}$	
		1 ^{er} método	2 ^o método
Tabla nº 13	278	1.32	
	280	1.33	1.34
	290	0.90	

La obtención de este coeficiente por el 2^o método está complementado por las tablas nº 11, 12, y 14.

Tabla nº 11.- Analisis de amino acidos del fragmento F(ab')₂ de la IgG de conejo.

AMINOACIDO	TIEMPO DE HIDROLISIS (HORAS)				X'	X
	24	48	72	96		
Asx	12.2	12.1	12.1	12.3	12.2	7.1
Glx	12.8	12.9	13.0	12.9	12.9	7.5
Pro	15.4	15.4	15.5	15.6	15.5	9.1
Gly	13.5	13.3	13.6	13.7	13.5	7.9
Ala	11.0	11.2	11.0	11.1	11.1	6.6
Met	1.2	1.0	1.2	1.1	1.1	0.6
Leu	10.9	10.9	10.7	10.7	10.8	6.3
Tyr	7.2	7.2	7.0	7.1	7.1	4.1
Phe	3.6	3.8	3.7	3.7	3.7	2.1
His	1.6	1.7	1.6	1.5	1.6	0.9
Lys	6.9	6.9	7.2	7.0	7.0	4.1
Arg	3.7	3.6	3.4	3.3	3.5	2.0
Thr	18.0	15.1	11.0	8.0	19.9 [*]	12.8
Ser	13.5	9.8	6.0	3.0	16.2 [*]	9.3
Val				20.5	20.5	12.1
Ile				4.9	4.9 ^g	2.9
Cys					5.3 ^g	3.1
Trp					2.5 ^e	1.3

* Obtenidos por extrapolacion a tiempo de hidrolisis = cero

g Obtenida como carboximetilcisteina radioactiva (Apartado 3.4.10)

e Obtenida segun el metodo de Edelhoch(213) y Goodwin y Morton (212)

X' Media de los valores de % molar de los amino acidos invariantes, y la de los variables referida a la de los invariantes.

X % molar de cada amino acido por molecula de F(ab')₂.

Tabla nº 12.- Determinación del nº de moles de Trp/mol de F(ab')₂

A/ METODO DE GOODWIN Y MORTON.-

<u>D_{294.4}</u>	<u>D₂₈₀</u>	<u>M_{Tyr}/M_{Trp}</u>	<u>Trp*</u>
0.430	0.463	2.76	13.04
0.330	0.355	2.72	13.23
0.230	0.250	2.64	13.64

B/ METODO DE EDELHCOCH.-

<u>D₂₈₈</u>	<u>D₂₈₀</u>	<u>Trp**</u>
0.84	1.29	14

*En base a 36 Tyr.

**En base a pM: 97000

4.4.9. Punto Isoelectric.-

Las fig nº 22 y 23 representan los perfiles de los electroenfoques realizados con el F(ab')₂ de la IgG de conejo con rangos de pH comprendidos entre 3.5 y 10 y entre 5 y 7 respectivamente.

Todas las fracciones fueron analizadas por inmunodifusión doble bidimensional. Para el electroenfoque que representa la fig, 22, desde la fracción 15 a la 31 revelaron una única banda

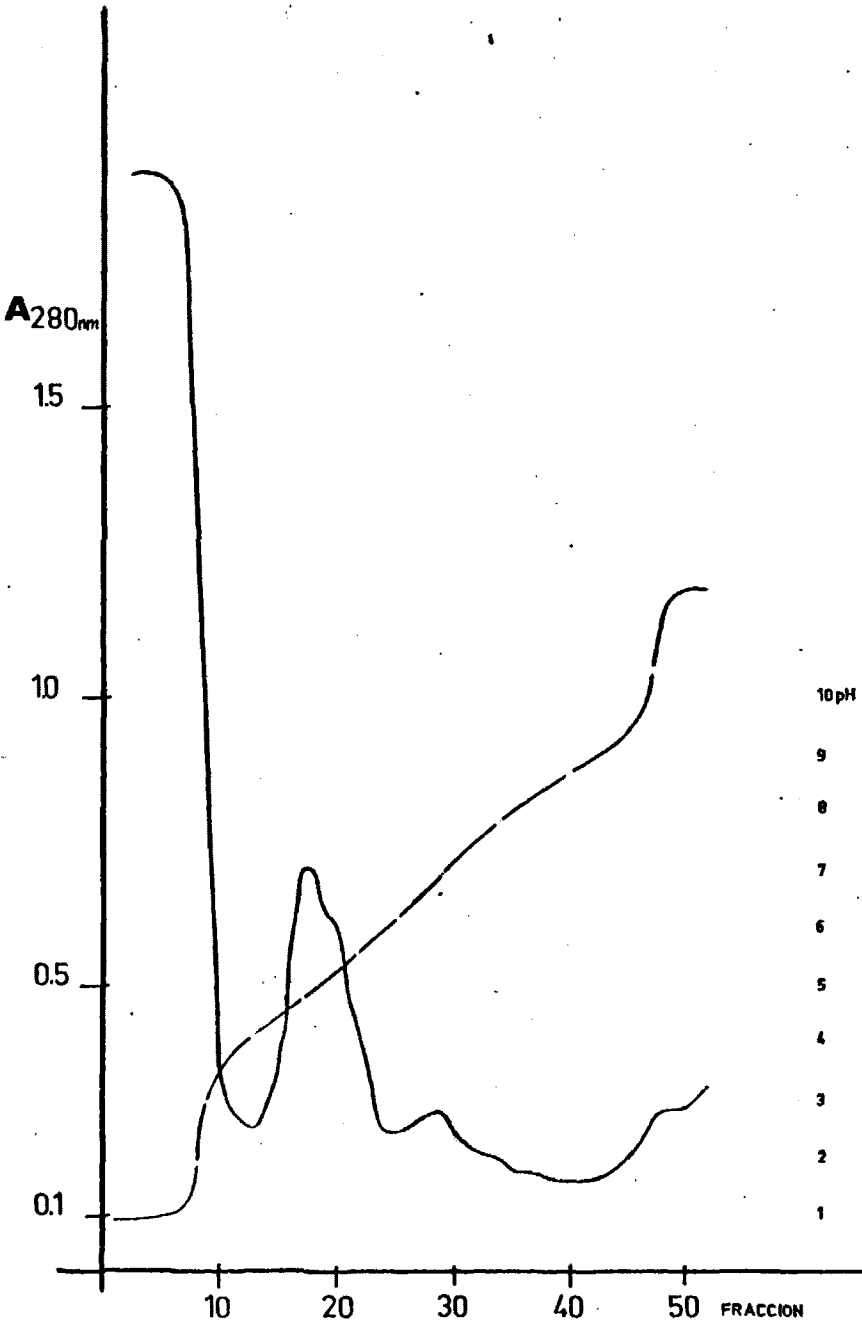


Fig. nº 22.- Electroenfoco del fragmento F(ab')₂ en un rango de pH de 3.5 a 10.

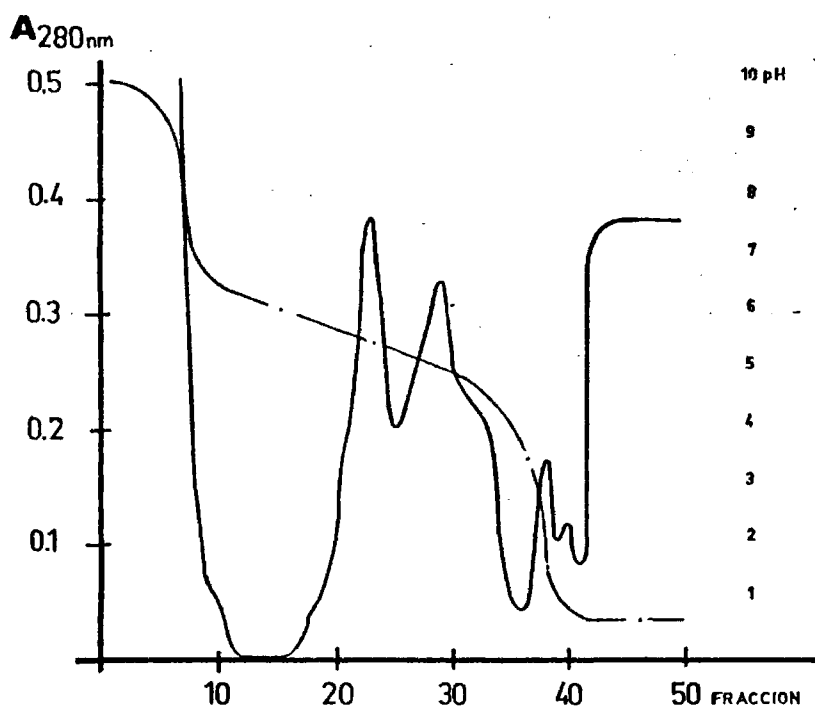


Fig. 23.- Electroenfoque del $F(ab')_2$ en un rango de pH de 5 a 7.

que evidenciaba identidad total con $F(ab')_2$ e identidad parcial con IgG. El resto de las fracciones no se revelaban con antisuero anti-gamma-globulina de conejo. Análoga situación evidenció el electroenfoque que representa la fig. 23 para las fracciones 19 a 31.

4.4.10. Determinación cuantitativa de grupos Sulfhidrilo.-

La tabla nº 14 hace referencia a dos de las experiencias realizadas según se detalla en materiales y métodos, apartado 3. 4.10. La última columna de la tabla evidencia los grupos -SH que posee el $F(ab')_2$ de la IgG de conejo tras la reducción exhaustiva previa de los puentes disulfuro con ditioeritritol.

El valor obtenido es de 30 grupos que se corresponden con sendas cisteínas.(15 puentes disulfuro)

4.5. OBTENCION DE ANTISUERO DE COBAYO FRENTE A IgG DE CONEJO.-

Los antisueros obtenidos según se detalla en materiales y métodos fueron probadas su potencia frente a IgG, $F(ab')_2$ y pFc' comparandolos con los antisueros comerciales resultando ser más potentes que estos.

4.6. CARBOXIMETILACION SELECTIVA DEL $F(ab')_2$.-

La tabla nº 15 recoge las experiencias de modificación química selectiva llevadas a cabo sobre el $F(ab')_2$ y representa el número de grupos -SH que se alquilan con $I^{14}CH_2CONH_2$ tras la reducción selectiva de los puentes disulfuro a diferentes concentraciones de reductor, DTE, en condiciones no desnaturizantes. Los ensayos sin DTE suponen los controles de incorporación radiactiva inespecífica. Se obtiene un máximo de 10 grupos -SH que se corresponden con 5 puentes disulfuro, susceptibles de modificación

TABLA N°14. Determinacion Cuantitativa de Grupos -SH Modificados

T. N°	ICH ₂ CONH ₂		dpm	dpm netas dpm _i -control	S _{F(ab')₂} μCi/mmol	S _{ICH₂CONH₂} μCi/mmol	GRUPOS -SH MODIFICADOS
	DTE(mM)	(mM)					
0			102				
1	-	40	932	830	34.9	100	0.3
2	-	80	1602	1500	61.2	100	0.6
3	10	40	72183	71251	2968.8	100	29.7
4	20	80	74483	72983	2979.5	100	29.8
3'	10	40	74151	73321	2993.3	100	29.9
4'	20	80	73825	72325	2982.8	100	29.8
3''	10	40	72952	72122	2944.3	100	29.4
4''	20	80	72582	70082	2920.0	100	29.2

1 μCi: 2400000 dpm en las condiciones de trabajo utilizadas. Media de 10 determinaciones.

en estas condiciones.

La fig nº 24 ilustra graficamente los resultados expresados en la tabla nº 15. La fig. nº 25 supone una composición de los experimentos de carboximetilación señalados en apartado 3.9 donde se recoge el número total de grupos -SH modificados según la concentración de reductor, las fracciones $F(ab')_2$, obtenidas por filtración en gel en columnas de Pharmacia K26/75 en un lecho de gel de Sephadex G-150 eluidas con SSF, a las diferentes concentraciones de reductor y el gel de poliacrilamida -SDS para cada concentración de reductor.

4.7. ESTUDIOS DE DICROISMO CIRCULAR.-

Las fig. nº 26, 27 y 28 exhiben los espectros de CD del $F(ab')_2$, Fab'y Fab'-red (sin actividad anticuerpo), $F(ab')_2$ -aAH , Fab'-aAH y Fab'-aAHred y $F(ab')_2$ -aEC, Fab'-aEC y Fab'-aECred respectivamente como se detalla en materiales y métodos apartado 3.10 observándose en todos los casos el patrón característico exhibido en las figuras nº 20 y 21, solo los fragmentos reducidos muestran un ligero aplanamiento, pérdida de estructura fina, en la región del ultravioleta próximo.

4.8. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA.-

4.8.1. Ensayos hemolíticos en placa.-

La figura nº 29 muestra la correlación obtenida entre la concentración de suero (Complemento) y el área de hemolisis.

Se ensayaron tres fuentes de complemento diferentes: humano, conejo y cobaya y dos de células blanco: eritrocitos de conejo y de cobaya. Sólo se representa la respuesta a eritrocitos de cobaya con sueros humanos y de conejo porque las otras combinaciones no producian halos de hemolisis perceptibles. Ver además -

Tabla n° 15.- Carboximetilacion radioactiva del fragmento F(ab')₂ de la IgG de conejo.

DTE *	I- ¹⁴ CH ₂ CONH ₂ *	d.p.m.	d.p.m.(netas)	S _{prot}	S _{alq.}	GRUPOS -SH MODIFICADOS
0.010	0.040	6081	4854	242.2	3125	0.08
0.010	0.040	7467	5504	275	3125	0.09
0.0125	0.050	9826	8689	433.6	2500	0.17
0.0125	0.050	9503	8391	418.7	2500	0.16
0.0125	0.050	9358	8208	409.5	2500	0.16
0.025	0.100	13612	12229	610.2	1250	0.48
0.025	0.100	12046	10569	527.5	1250	0.42
0.025	0.100	12296	11257	561.8	1250	0.45
0.050	0.200	39820	37350	1864	1250	1.49
0.050	0.200	31041	29139	1454	1250	1.12
0.050	0.200	22817	19682	982	625	1.57
-	0.040	1226	1154	57	3125	0.02
-	0.040	1962	1919	95	3125	0.03
-	0.050	1139	1075	52.7	2500	0.02
-	0.050	1112	1052	52.5	2500	0.02
-	0.050	1150	995	49.6	2500	0.02
-	0.100	1383	1324	66.1	1250	0.05
-	0.100	1476	1589	69.3	1250	0.05
-	0.100	1039	959	47.8	1250	0.04
-	0.200	2470	2410	120.2	1250	0.09
-	0.200	1902	1852	92.4	1250	0.07
-	0.200	3135	3035	151.4	625	0.24

/cont.

DTE*	I- ¹⁴ CH ₂ CONH ₂ *	d.p.m.	d.p.m.(netas)	S _{prot}	Salq.	GRUPOS -SH MODIFICADOS
0.10	0.40	41735	39451	1968.5	625	3.15
0.10	0.40	44526	42201	2105.7	625	3.37
0.10	0.40	40978	38626	1927.3	625	3.08
0.15	0.60	21298	20076	1002.1	208.3	4.80
0.15	0.60	20152	19146	955.3	208.3	4.58
0.15	0.60	20260	19030	949.5	208.3	4.55
0.20	0.80	34962	33400	1667.0	312.5	5.33
0.20	0.80	36025	34525	1722.7	312.5	5.51
0.20	0.80	37210	35580	1775.3	312.5	5.68
0.30	1.20	29437	27763	1385.3	208.3	6.65
0.30	1.20	30250	28590	1426.6	208.3	6.84
0.30	1.20	29424	27474	1370.8	208.3	6.58
-	0.40	2284	2210	110.3	625	0.17
-	0.40	2325	2065	103.0	625	0.16
-	0.40	2352	2300	114.7	625	0.18
-	0.60	1210	1165	58.1	208.3	0.28
-	0.60	1006	966	48.2	208.3	0.23
-	0.60	1230	1160	57.9	208.3	0.28
-	0.80	1562	1489	74.3	312.5	0.23
-	0.80	1500	1450	72.3	312.5	0.23
-	0.80	1630	1580	78.8	312.5	0.25
-	1.20	1674	1614	80.5	208.3	0.38
-	1.20	1660	1595	79.6	208.3	0.38
-	1.20	1952	1885	94.0	208.3	0.45

/cont.

Tabla n° 15.- (Continuacion).-

DTE*	I- ¹⁴ CH ₂ CONH ₂ *	d.p.m.	d.p.m. (netas)	Sprot.	S _{alq.}	GRUPOS -SH MODIFICADOS
0.50	2.00	43785	41428	2067.1	250	8.27
0.50	2.00	42132	39829	1937.4	250	7.95
0.50	2.00	44632	42282	2109.7	250	8.44
1.00	4.00	25480	24558	1225	125	9.8
1.00	4.00	24009	23056	1150.4	125	9.2
1.00	4.00	24853	23920	1193.5	125	9.5
1.50	6.00	18345	16676	832	83.33	9.9
1.50	6.00	18003	16503	823	83.33	9.9
1.50	6.00	18002	16600	828.3	83.33	9.9
2.00	8.00	26977	25202	1257	125	10
2.00	8.00	26906	25004	1247.6	125	9.9
2.00	8.00	26945	25050	1249.9	125	10
-	2.00	2357	2285	114.0	250	0.45
-	2.00	2303	2253	112.4	250	0.45
-	2.00	2350	2295	114.5	250	0.46
-	4.00	922	875	43.6	125	0.35
-	4.00	953	900	44.9	125	0.36
-	4.00	933	880	43.9	125	0.35
-	6.00	1669	1609	80.2	83.33	0.96
-	6.00	1500	1430	71.3	83.33	0.85
-	6.00	1402	1345	67.1	83.33	0.80
-	8.00	1775	1720	85.5	125	0.68
-	8.00	1902	1850	92.3	125	0.74
-	8.00	1895	1830	91.3	125	0.73

/cont.

Tabla n° 15.- (Continuacion).-

DTE*	I- ¹⁴ CH ₂ CONH ₂ *	d.p.m.	d.p.m.(netas)	Sprot.	Salq.	GRUPOS -SH MODIFICADOS
5.00	20.00	36446	33292	1661	166.6	9.97
5.00	20.00	36252	33330	1663	166.6	9.98
10.00	40.00	22255	20040	998	100	9.98
10.00	40.00	22134	19944	995	100	9.95
-	20.00	3154	3070	153.2	166.6	0.91
-	20.00	2922	2880	143.7	166.6	0.80
-	40.00	2215	2160	107.7	100	1.07
-	40.00	2190	2120	105.7	100	1.05

1 μ Ci = 1943974 d.p.m., media de 10 determinaciones segun se detalla en el apartado 3.4.10.1..

* = Concentracion mM.

Fig. nº 24.- Representación gráfica de la carboximetilación radiactiva del $F(ab')_2$ de la IgG de conejo tras la reducción selectiva de sus puentes disulfuro.

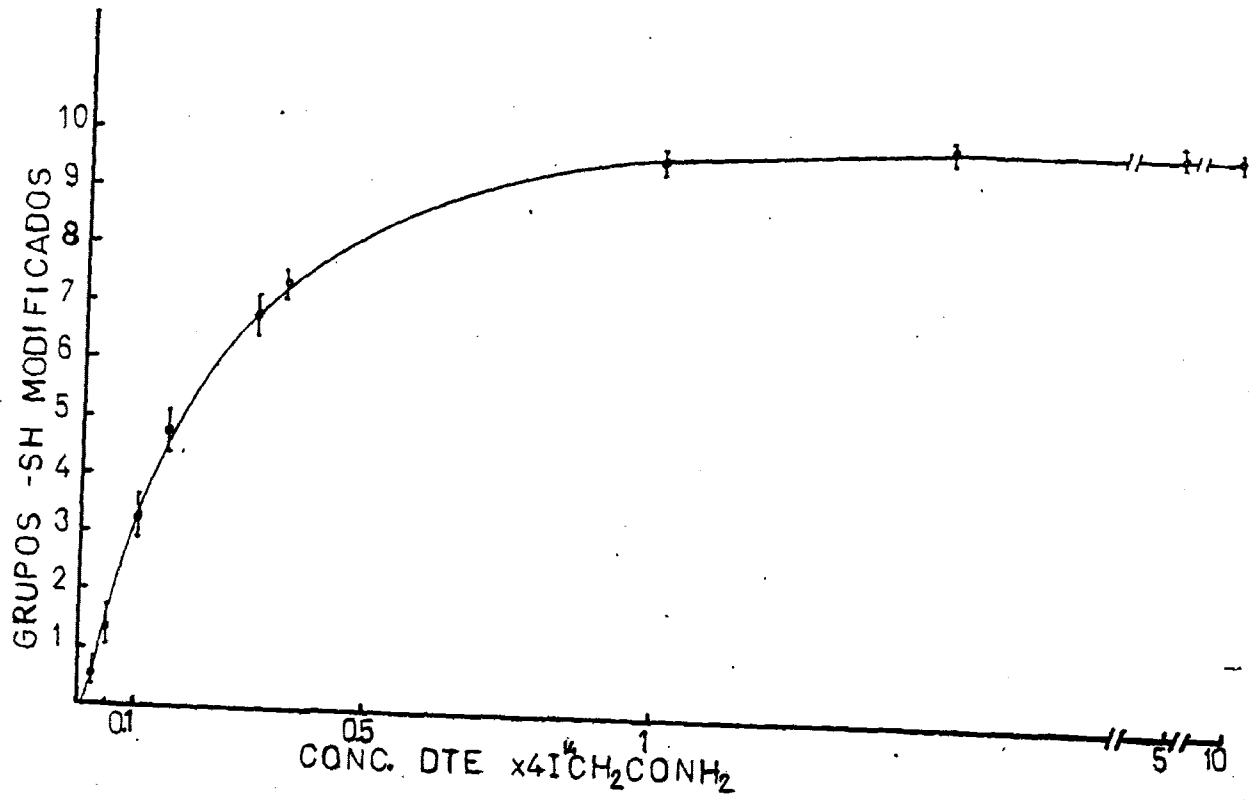
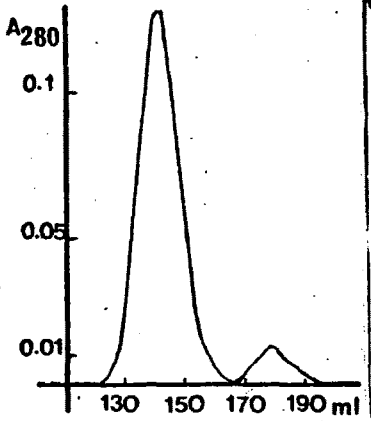


Fig N° 25

DTE : 0.010 mM EGPA-SDS

Grupos Modif.: 0.08

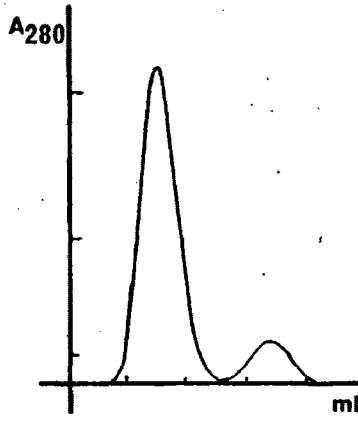
Filtracion en Gel : 92/8



DTE : 0.0125 mM EGPA-SDS

Grupos Modif.: 0.10

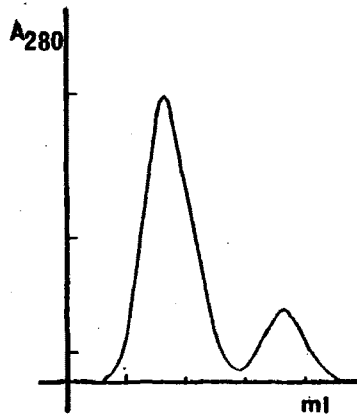
Filtracion en Gel : 89/11



DTE : 0.025 mM EGPA-SDS

Grupos Modif.: 0.40

Filtracion en Gel : 80/20



DTE : 0.050 mM EGPA-SDS

Grupos Modif.: 1.35

Filtracion en Gel : 53/47

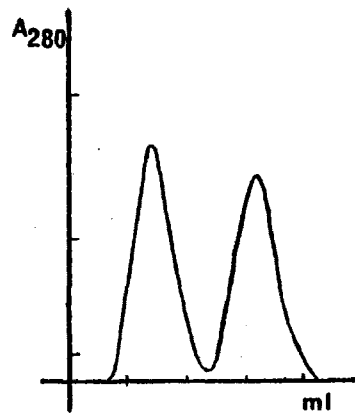
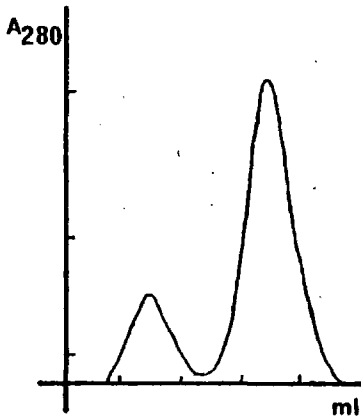


Fig.nº.25.- Datos conjuntos de carboximetilación radiactiva, filtración en gel y EGPA-SDS del $F(ab')_2$ tras su reducción selectiva de puentes disulfuro.

DTE : 0.100 mM EGPA-SDS

Grupos Modif.: 3.20

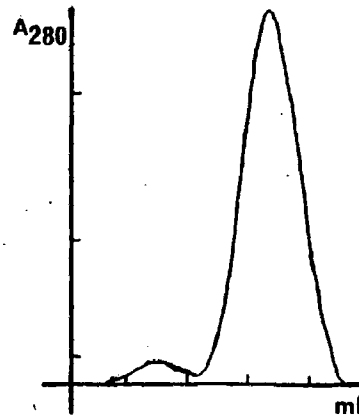
Filtracion en Gel : 20/80



DTE : 0.200 mM EGPA-SDS

Grupos Modif.: 5.35

Filtracion en Gel : 3 / 97



DTE : 2.00 mM EGPA-SDS

Grupos Modif.: 10

Filtracion en Gel : 0/100

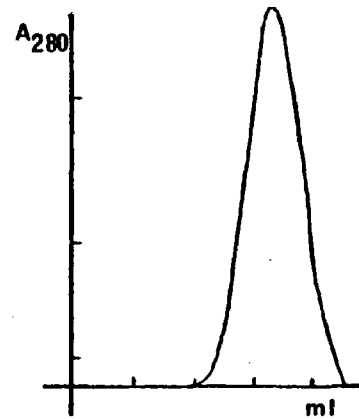


Fig. n° 25.- (continuación)

FIG. 26

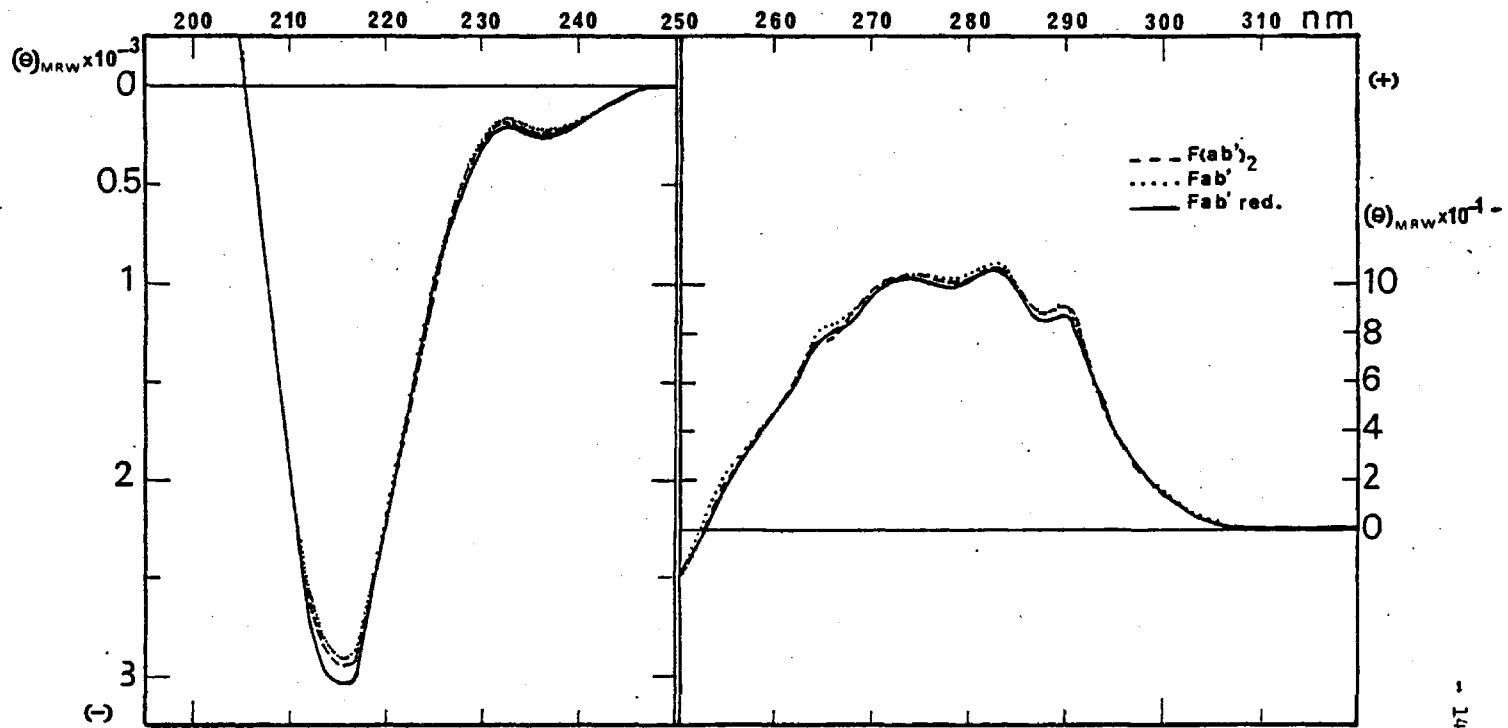


FIG. 27

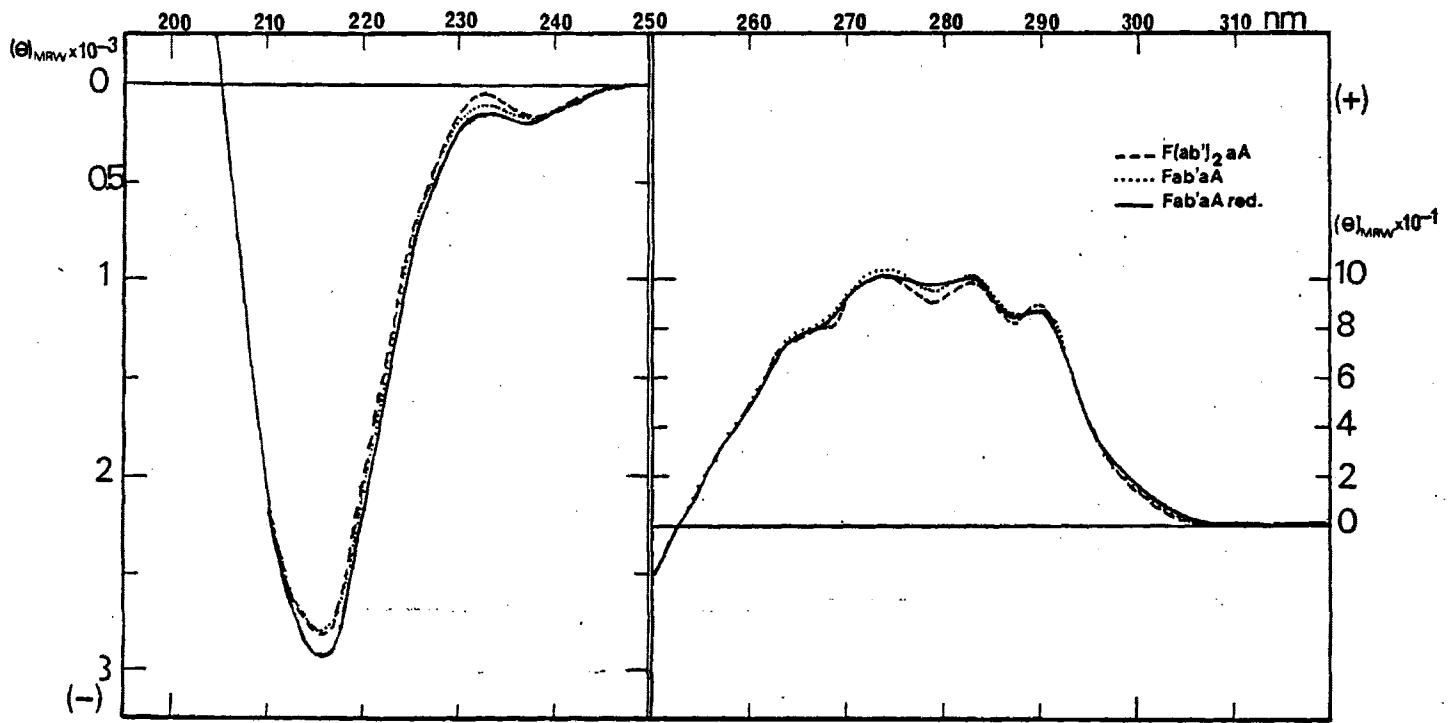
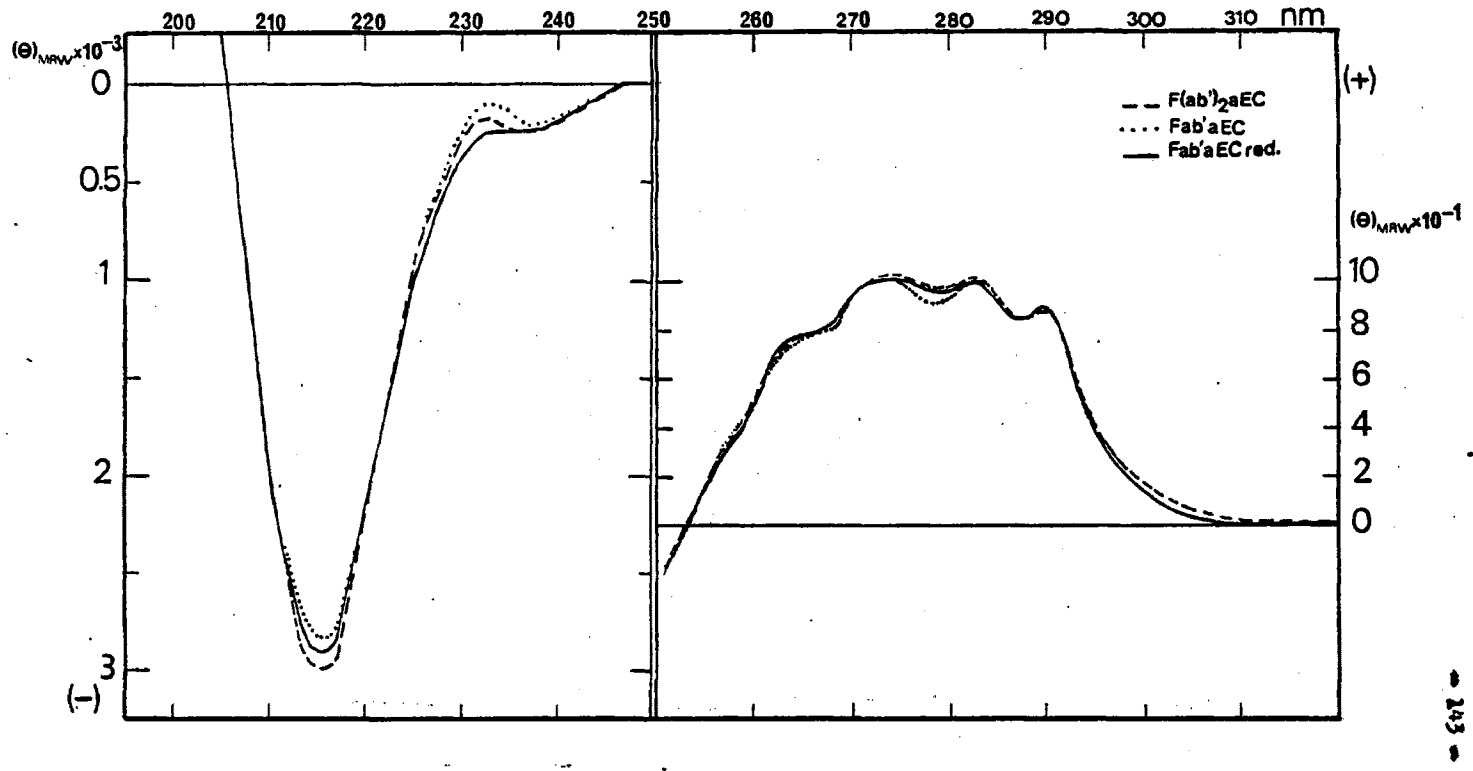


FIG. 28



fotos nº 11 y 12.

La foto nº 13 muestra los halos de hemólisis producidos siguiendo la técnica que se detalla en materiales y métodos de: diversas diluciones de suero humano (1ª fila), IgG no anti AH, IgG aA, F(ab')₂-aA y Fab'-aA (2ª fila de izq a der.), Fab'-aAHred, Fab aAH, IgGaAH y F(ab')₂-aAH (3ª fila de izq. a der,) todos ellos en forma de complejos con Albumina Humana.

Por esta técnica se mide el complemento residual a la incubación de los complejos inmunes previamente formados, con suero humano normal como puente de complemento. Es de observar que sólo los complejos formados con anticuerpo bivalente específico consumen complemento IgG-aAH y F(ab')₂-aAH. (ausencia de halo de hemólisis en ambos casos).

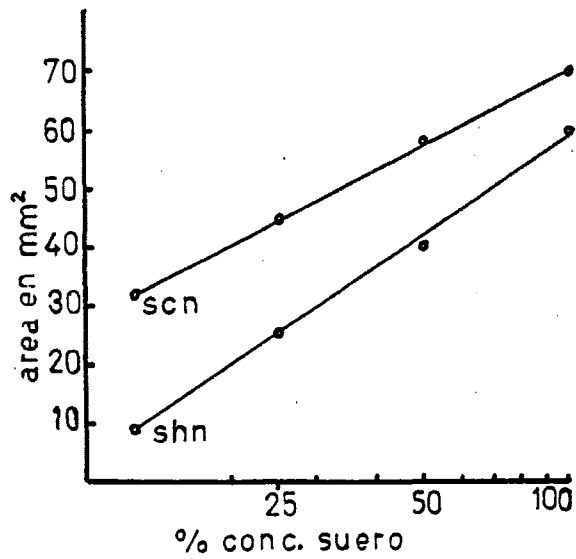
4.8.2. Ensayos hemolíticos en fase soluble.-

La fig. nº 30 representa la titulación de complemento de un suero de conejo (los de cobayo y humano producían menor hemólisis que el suero homólogo para una misma cantidad de eritrocitos de carnero (y de anticuerpo) en exceso de anticuerpo específico frente a la membrana del hematíe.

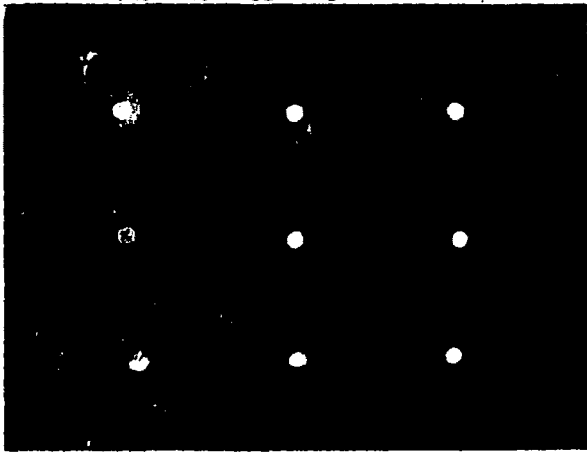
La fotografía nº 14 muestra el patrón en gel de poliacrilamida -SDS de los fragmentos F(ab')₂-aE, Fab'-aE y Fab'-aEred obtenidos como se indica en materiales y métodos y que posteriormente se utilizaron en las pruebas de actividad anticomplementaria. Además se representa un esquema de estos fragmentos.

La tabla nº 16 representa la cantidad de los diferentes fragmentos anticuerpo utilizados capaces de producir un 50% de lisis. Es de destacar que los fragmentos monovalentes si consumen complemento, aunque la cantidad mínima de estos para producir la lisis que los bivalentes sea 4 veces superior.

Fig. nº 29.- Representación, en escala semilogarítmica, del área de hemólisis producida sobre eritrocitos de cobayo a diferentes concentraciones de complemento, utilizando suero de conejo y suero humano como fuentes de complemento.



ERITROCITOS DE COBAYO

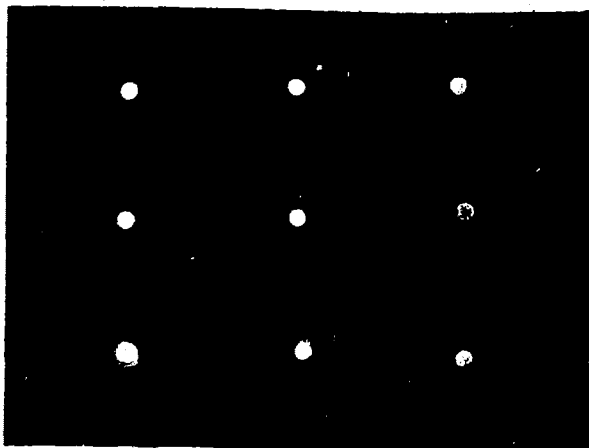


HN

CV

CU

Foto nº 11.



HN

CV

CU

Foto nº 12.

ERITROCITOS DE CARNERO

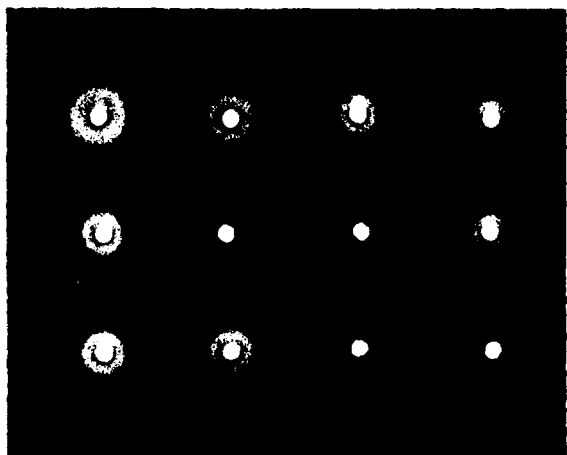


Foto nº 13. (Ver texto)

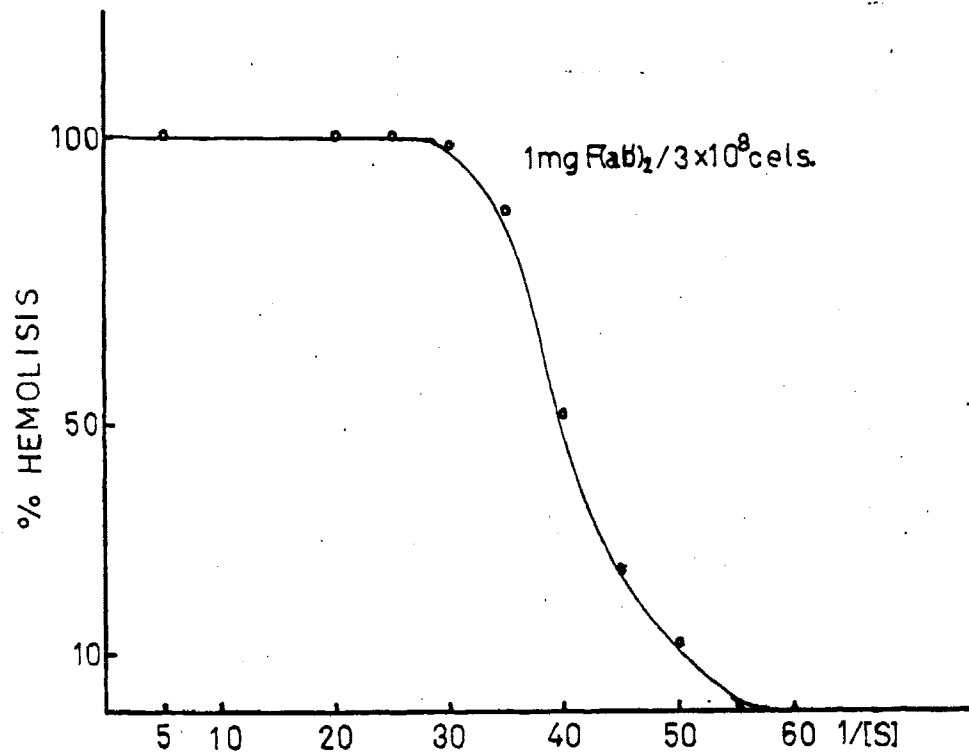


Fig. n^o 30.- Titulación de complemento por la vía alternativa de un suero de conejo normal.

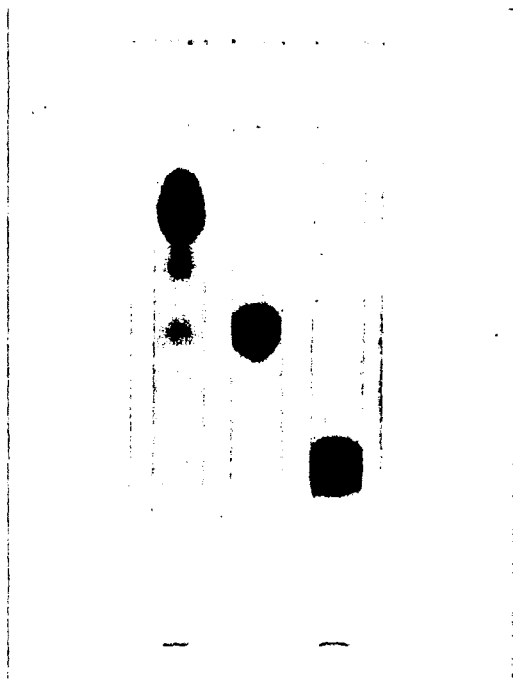


Foto nº 14.

IgG

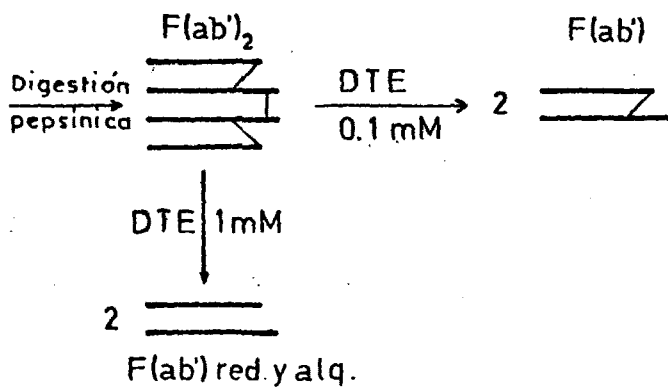

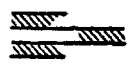
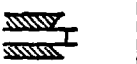

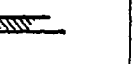
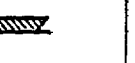


TABLA N° 16. Capacidad Hemolitica de IgG y Fragmentos.-

Anticuerpo(•) Fuente de Complemento						
	IgG	IgG red.	F(ab') ₂	Fab'	Fab' red.	Fab
SHN (1/10)	0.380	0.400	0.350	0.500	0.500	0.500
SCbN (1/10)	0.330	0.350	0.350	0.800	1.000	0.800
SCN (1/20)	0.004	0.006	0.005	0.022	0.020	0.020

(•): mg/3x10⁸ cels. necesarios para producir el 50% de lisis

La tabla nº 17 expresa la absorbancia a 414nm que los diversos fragmentos de anticuerpo producen a los diferentes tiempos de incubación sobre 3×10^8 células (eritrocitos) en presencia de complemento.

La tabla nº 18 muestra la variación en cuanto al grado de unión de los fragmentos anticuerpo $F(ab')_2$ -aE y Fab'-aEred medida como radiactividad incorporada específicamente a la superficie - del antígeno (eritrocito de carnero) a dos concentraciones diferentes para ambos fragmentos. Se obtiene una relación de unión - $F(ab')_2$ /Fab' a la superficie del eritrocito de 4, lo que evidencia una mayor avidéz por parte del $F(ab')_2$ hacia la superficie del - eritrocito.

Tabla n° 17 .- Cinetica de hemolisis de IgG y fragmentos.

T.I.*	$A_{414nm} / 1mg\ Ac/3 \times 10^8\ células$						
	IgG	IgGred.	F(ab') ₂	Fab'	Fab'red.	Fab	F(ab') ₂ **
3	0.01						
5	0.04	0.03	0.04				
7	0.09	0.08	0.11				
9	0.13	0.15	0.15				
10	0.18	0.22	0.22	0.01			0.06
11	0.23	0.27	0.24				
12	0.34	0.33	0.32	0.02	0.02	0.01	0.10
13	0.43	0.40	0.43				
14	0.52	0.52	0.50	0.04			0.27
15	0.63	0.64	0.61		0.05	0.04	0.33
16				0.07		0.06	
17	0.80	0.82	0.78				0.48
18				0.22	0.16	0.16	
19	0.95	0.98	0.97				0.69
20				0.33			
21	1.05	1.05	1.04		0.38	0.42	0.88
22				0.51		0.52	
23	1.09	1.11	1.10				0.96
24				0.77	0.68	0.75	
25	1.12	1.10	1.10				1.07
26				0.92		0.90	
27	1.11	1.11	1.10		0.97		1.12
28				0.99		1.01	
30	1.12	1.11	1.11	1.06	1.08	1.04	1.12
32				1.10			
33					1.11	1.10	1.11
34	1.12	1.12	1.10	1.08			
36				1.10	1.11	1.09	
38				1.09			1.10
40	1.12	1.11	1.10	1.10	1.11	1.10	1.12

* Tiempo de incubacion en minutos (a 37°C)

** 0.5 mg/3 x 10⁸ células

Fig. no 32.- Cinética de hemólisis por la vía alternativa de IgG de conejo y fragmentos.

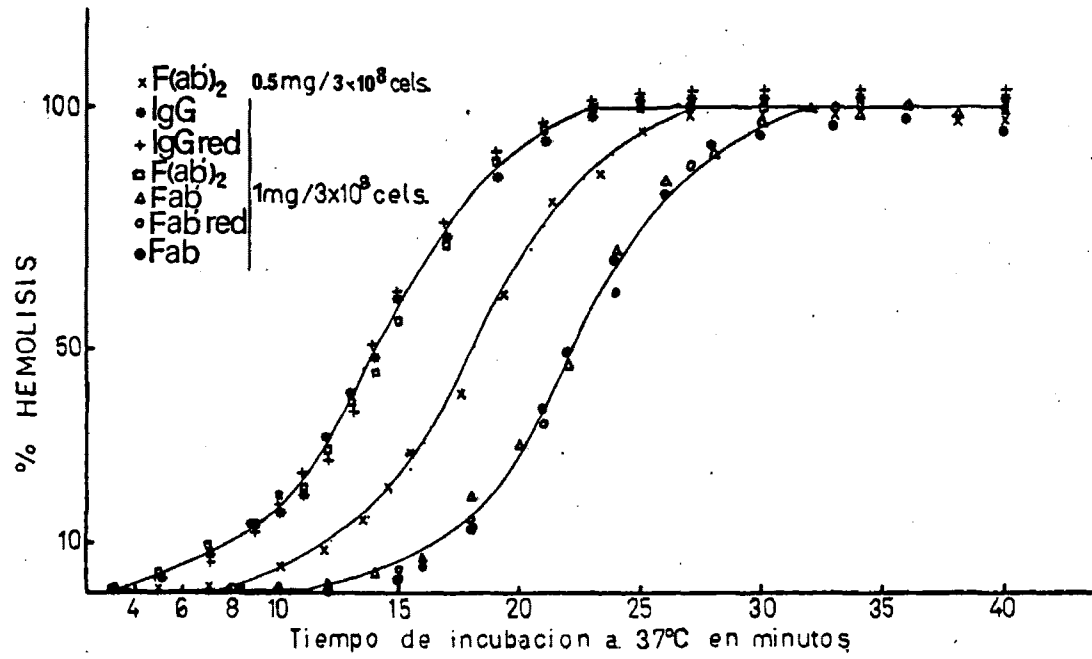


TABLA N° 17.- RELACION DE UNION $F(ab)_2$ / Fab' A LA SUPERFICIE DEL ERITROCITO

anticuerpo	r.i.(*)	r.i.e.(**)	$F(ab)_2$ / Fab'
$F(ab)_2 aE^{-125}I$ (0.3 mg)	3762	3292	3.9
$Fab' aE^{-125}I$ red. (0.3 mg)	1230	850	
$F(ab)_2 aE^{-125}I$ (0.15 mg)	1740	1430	4.1
$Fab' aE^{-125}I$ red (0.15 mg)	655	345	
$F(ab)_2 aA^{-125}I$ (0.3 mg)	380		
$F(ab)_2 aA^{-125}I$ (0.15 mg)	310		

(*): cpm incorporadas a la superficie del eritrocito

(**): id. específicamente a la superficie del eritrocito

5. DISCUSSION.-

La IgG obtenida en DEAE celulosa y eluida con tampón fosfato 0.01 M a pH 7.6 supone modificación a los procedimientos usados anteriormente por Peterson y Sober (203), Gonvers, Guillaumond e Isliker (220), Reif (221) y otros. La fracción gamma así obtenida no es la fracción gamma total del suero pero supone un amplio pool de la misma de rápida obtención, libre de agregados, cuya pureza es total en base a los cuatro criterios utilizados.

El $F(ab')_2$ obtenido tras la proteólisis de la IgG con pepsina y posterior filtración en gel de Sephadex G-200 resulta asimismo puro.

Las fotos nº 6 y 7, indican que los determinantes antigénicos presentes en el " $F(ab')_2$ " son compartidos por la IgG, (identidad parcial con esta), y no se encuentran en el dominio C_H3 de la molécula de IgG, pFc' (reacción de no identidad), la fig. 14 descarta la posibilidad de agregados y supone que la fracción proteínica obtenida posee un peso molecular próximo a los 100.000 Dalton, y las fotos nº 8 y 9, evidencian que el $F(ab')_2$ es una proteína heterogénea como corresponde a su carácter de región combinante con el antígeno.

Este fragmento exhibe una movilidad de tipo $\beta_2-\delta_1$ como se observa en la foto nº 10.

El peso molecular obtenido para el $F(ab')_2$ fue de 98000 - Dalton por filtración en gel de Sephadex y 96000 Dalton por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, valores que son compatibles con los aparecidos en la literatura: 90.700 Jaquet y Cabra - 1965 (197), 100.000 Brigman 1946 (222), Jackson y Grant 1976(199) 92000 Gerottini y Fitch 1968 (223), 106000 Nisonoff y col 1960(90) 9500 Nisonoff, Hopper y Spring 1975 (85), y otros.

El radio molecular calculado a partir de los datos del fil

tracción en gel que fue de 43.97 Å es compatible con los aparecidos en la literatura para otras proteínas globulares de tamaños moleculares superiores e inferiores: IgG humana 57.96 Å (150.000 Dalton) IgA humana 61.27 Å (160.000 Dalton, Albumina bovina 36.35 Å (66.000 Dalton), Fc humano 30.34 (50.000 Dalton).

Por otro lado el coeficiente de difusión que fue de $4.87 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$ es muy similar al calculado por Nisonoff en 1960 (224) de $4.7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$

El espectro de absorción exhibió un máximo a 280 en el Ultravioleta próximo debido a Tyr y Trp, evidenciándose dos hombros uno a 285nm y otro a 291nm, transiciones debidas igualmente a cadenas laterales de triptofanos.

En los espectros de dicroísmo circular obtenidos se observaron las bandas de elipticidad características a 217 (-), (241(-) 265(+), 270(+), 273(+), 285(+), y 291(+). La fuerte banda de elipticidad negativa a 217nm es característica de estructura beta-conformacional. Por otro lado la magnitud de la elipticidad a 217nm es mayor para el fragmento F(ab')₂ obtenido, que la elipticidad a esta longitud de onda para la IgG de conejo y el fragmento Facb. La causa de este aumento no esta claramente justificada pero podría deberse: según R.Cathou (225) a) incremento de beta estructura b) alteración en los microentornos de la estructura beta debido a la rotura enzimática. La banda de 241 nm se debe a estructura en cadena el azar y las bandas de elipticidad positiva en el Ultravioleta próximo se deben a cromóforos de cadenas laterales aromáticas en entornos asimétricos, interpretaciones ambas dadas asimismo por Cathou (225)

La zona del espectro superior a 250nm con bandas de elipticidad positivas en el rango 260-295 evidencian. aún más la pureza del fragmento en base a los datos aparecidos hasta el momento

sobre la región Fab de inmunoglobulinas. De haber arrastrado algún contaminante de los dominios C_{H2} y C_{H3} habríamos observado: alteraciones en el espectro de esta región o elipticidades negativas en esta zona.

Asimismo esta zona es de sumo interés para el objetivo final de este trabajo porque ya en 1968 Rosa y Jirgenson (226) encontraron en estudios de dispersión rotatoria óptica para la IgG humana de mieloma modificada (sometida a S-sulfitolisis), que el efecto Cotton a 265nm desaparece y que el correspondiente a 284nm se disminuye mucho. Esto sugiere que la integridad de los puentes disulfuro es necesaria para la actividad óptica de las transiciones a estas longitudes de onda en el espectro de dicroísmo circular del Fab-anti-DNP. Estas bandas pueden deberse a los puentes disulfuro en sí mismos o a los aminoácidos aromáticos en entornos asimétricos mantenidos por la presencia de tales puentes disulfuro.

Caracterización que se ajusta bastante a la publicada por R.Cathou en 1968 (225) para Fab de la IgG de conejo anti ovoalbumina y a la publicada por Stanworth en 1977 (227), para $F(ab')_2$ solo que la banda a 242nm de Cathou aparece a 238nm.

El relativamente alto contenido en prolina tiene su origen en que el fragmento $F(ab')_2$ contiene la región gozne que es especialmente rica en este aminoácido. Los altos valores en Val, Ser y Thr, responden al alto contenido en estructuras beta de cada dominio globular (principalmente en los V). Aminoácidos estos que propician la conformación beta (226) efecto que concuerda con la fuerte banda de elipticidad negativa a 217nm que se obtiene por dicroísmo circular. Extremo que es corroborado por los estudios de difracción de rayos-X que sobre el fragmento Fab' de la IgG humana realizó Poljak (228), así como por Edmundson en los estudios sobre los dominios de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas (229)

La existencia de 14 restos de Trp y 36 Tyr se ajusta a -- las observaciones previas que realizaron Poljak (228), y Padlam(230) estableciendo que en el interior de cada dominio debe de existir al menos un Triptofano y dos tirosinas. Asimismo la Tyr conforma el sitio combinante.

El valor obtenido para el coeficiente de extinción a 280nm para una disolución de $F(ab')_2$ 0.1% (p/v) por los dos métodos utilizados (1.34 y 1.33) da una plena concordancia y se aparta ligeramente de los considerados por McBurnette y Mandy 1.5 (231), Schlampowitz y col. 1.4 (232) para IgG y sus fragmentos y coinciden con el valor considerado por Jackson y Grant 1.34 (199).

Los perfiles de los electroenfoques obtenidos para el $F(ab)_2$ evidencian la heterogeneidad de este fragmento ya apuntada por -- Painter y Freedman (233,234) para IgG anticuerpo antihapteno (p-aminofeniltrimetiladomonio) de conejo. Las dos fracciones principales obtenidas pueden estar relacionadas con las dos subclases de IgG de conejo existentes.

El valor obtenido para el número de grupos -SH, presentes en la molécula tras la reducción exhaustiva de los puentes disulfuros, de 30 se ajusta a los datos de secuencia de cadenas L de conejo (L_K) por Braun y Jatón (235) y de cadenas H por Lebovitz y - col. (236), Fruchter y col. (237) Appella y col. (238) y Fleisidman (239)

Las 30 correspondientes cisteinas están repartidas de la forma siguiente: 16 forman parte de las 8 Cistinas intracatenarias 4 de las 2 Cistinas inter H-L, 2 de Cistina inter H-H, 4 de las 2 Cistinas intracatenarias denominadas "anomalas" o de "alta reactividad" por Frangione (240) y 4 de las 2 Cistinas interdominio presentes en la cadena ligera. Este dato supone además un dato indirecto que nos evidencia acerca del subtipo de la IgG utilizada, es

este no puede ser otro que el K_B que posee un puente disulfuro -- "extra" en la cadena ligera respecto al subtipo K_A (Cisteinas frente a 5) máximo de 26 cisteinas se hubiesen obtenido caso de tratarse del subtipo K_A , o una cifra intermedia caso de tratarse de una mezcla de ambos subtipos.(241)

Los datos de carboximetilación radiactiva del fragmento $F(ab')_2$ en condiciones no desnaturalizantes (Fig. nº 24) muestran una modificación máxima de 10 grupos $-SH$ tras la reducción (5 puentes disulfuro), valor que ya se alcanzaba a una concentración de 1mM de DTE. Estos datos junto con los obtenidos en gel de Sephadex G150 y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS al 7.5%, del fragmento modificado en un rango de reductor desde 0.01mM a 2mM, se hallan recogidas en la Fig. nº 15. De estas se puede llevar a la conclusión de que existe una clara susceptibilidad diferencial a la reducción del $F(ab')_2$ por DTE, en base a la cual se han podido obtener, y ensayar posteriormente, fragmentos "tipo" con diversos niveles de modificación química además de tener conocimiento de qué grupos específicos se hallaban modificados.

De los datos allí reseñados se puede ver claramente que hasta una concentración de reductor de 0.025mM los puentes disulfuro modificados son exclusivamente los inter H-H (hasta este punto la molécula se comporta como si solo tuviese este puente disulfuro) ya que el nº de grupos modificados en este punto es de 0.4 (0.2 puentes S-S) lo que supone que el 20% de las moléculas de $F(ab')_2$ se hayan reducido, la filtración en gel muestra un pico correspondiente a Fab' que es el 20% del total de la disolución de proteína reducida a esta concentración y el gel de EGPA-SDS no muestra ninguna banda a nivel de 25000 Dalton.

0.050 mM de reductor cuando los gels de EGPA-SDS siguen si evidencian ninguna banda a 25000 Dalton, el porcentaje espera

do de Fab' suponiendo que solo se modificasen los puentes disulfuro inter H-H y en base a los grupos totales modificados: 1.35 (0.67 puentes S-S) sería de un 67% cuando realmente se obtiene un 47%, el resto (20%) se debe de concluir que corresponde a la modificación de los hiperreactivos intracatenarios.

Análoga conclusión se extrae de la modificación a 0.10 mM. A 0.2mM ya se observa en los geles de EGPA-SDS la aparición de la banda de 25000 Dalton y la desaparición de la de 100.000 punto en el que el 100% de los grupos inter H-H se han modificado y aprox. el 75% de los hiperreactivos. En conclusión los puentes inter H-H son más susceptibles a la reducción que los inter H-L y los intracatenarios anómalos o hiperreactivos (según la denominación de Frangione) son más susceptibles a la reducción que los inter H-L.

Estas series de experimentos nos evidencian, por otro lado que a 0.1mM de reductor no se ha modificado ningún puente inter H-L y que a 2mM todos los puentes del $F(ab')_2$ excepto los intradominio han sido modificados. Estas dos concentraciones de reductor fueron las utilizadas para obtener dos formas de $F(ab')_2$ modificado a la de Fab', obtenida por filtración en gel del modificado a 0.1mM de DTE y la de Fab' red, obtenida por dialisis exhaustiva del modificado a 2mM.

La Fig. nº 26 representa los espectros de dicroísmo circular de los tres fragmentos tipo elegido como representativos de diferentes estados de modificación de los puentes disulfuro y que podrían evidenciar diferencias funcionales. De esta se puede concluir que la integridad conformacional se mantiene en sus rasgos, esenciales, además de evidenciar la ausencia de interacciones entre los brazos Fab en la molécula completa, extremo este último ya evidenciado por diversos autores Cathou y col.(242) Iguerabide y col. (76) por depolarización de la fluorescencia de IgG y Fab y

F(ab')₂, Valentine y Green (243) por microscopía electrónica de un complejo hapteno-anticuerpo, y otros. Por otro lado las posibles alteraciones en la capacidad de activar el Complemento por la vía alternativa de estos fragmentos serían de esta forma asignables a la modificación química puntual introducida y no a alteraciones conformacionales.

La Fig. nº 27 y 28 exhiben unos perfiles de DC para los fragmentos con capacidad anticuerpo practicamente indistinguibles de los fragmentos sin capacidad anticuerpo conocida, figura nº 26 pudiendo extrapolarse las conclusiones anteriores.

La medida de la actividad anticomplementaria de estos fragmentos supuso la puesta a punto de un sistema hemolítico en placa (modificación al sistema de Martin y Lachman(217)) y de otro en fase soluble habida cuenta de las limitaciones que el primero supone.

Las fotos nº 11 y 12, y la Fig. nº 29 muestran que el sistema que mejor responde a los complejos Albúmina-Anticuerpo es aquel que utiliza suero humano como fuente de complemento y eritrocitos de cobayo como células blanco obteniéndose no obstante una buena correlación con suero de conejo.

Por esta técnica se evidenció que tanto los complejos IgG anti-Albúmina humana-Albúmina humana (IgG₁AH-AH) como los F(ab')₂ anti-AH-AH consumen Complemento por la vía alternativa corroborando las experiencias de Reid (170), Kinnon y col. (202), Fujita y col. (200) y otros, pero los formados con Fab'-aAH, Fab'-aAHred o FabaAH se revelaron incapaces de consumir Complemento.

En principio esto apuntaría a una implicación de los puentes disulfuro en la activación del Complemento por la vía alternativa pero hemos de tener presente que la modificación química introducida supone la pérdida de la bivalencia del anticuerpo por lo

que la formación del complejo inmune en los casos del Fab', Fab'ed y Fab'está limitada a la formación de complejos bimoleculares (una molécula de antígeno y otra del fragmento de la molécula de anticuerpo) pudiendo obtenerse falsos negativos en la medida de la actividad anticomplementaria por este método. Por esto se decidió poner a punto otro sistema que obviase la formación previa de este tipo de complejos inmunes.

El sistema hemolítico en fase soluble de medida de la capacidad de activación del Complemento por la vía alternativa que se detalla en materiales y métodos, supone que el complejo inmune Ag-Ac formado EC-Ac es por si mismo lítico en presencia de complemento y además dado al alto número de determinantes antígenos presentes en la superficie del eritrocito nos sitúa en un sistema que obvia los inconvenientes apuntados en el sistema en placa. Este sistema se reveló como al menos 10 veces más sensible que el sistema en placas, observándose además que el suero homólogo es el más eficiente como fuente de complemento, aspecto ya apuntado por Jackson y Grant en 1976 (199). De los datos de la tabla nº 16 se concluye que tanto la IgG reducida como los fragmentos monovalentes Fab', Fab'ed y Fab' consumen complemento por la vía alternativa, así como los anticuerpos bivalentes. La capacidad de consumir Complemento por la vía alternativa de fragmentos monovalentes ha sido asimismo recientemente corroborada por A. Ehrnst (244) en un sistema de activación de anticuerpos citotóxicos frente al virus del sarampión. Y este consumo se realiza con una capacidad del mismo orden de magnitud que la IgG y $F(ab')_2$. En estas condiciones la mínima cantidad de anticuerpos monovalentes que se precisa para producir la misma lisis que producía por los bivalentes es de unas cuatro veces superior a la de estos.

Por otro lado los datos de cinética tabla nº 18, Fig. nº 31 corroboran esta relación de 1/4, ya que emplear la mitad de anticuerpo bivalente la gráfica se desplaza al centro de los perfiles

exhibidos por iguales cantidades de monovalentes y bivalentes.

En este aspecto hay que señalar que la curva cinética de los monovalentes "alcanza" a la de los bivalentes aumentando convenientemente la cantidad de anticuerpo presente.

Con todo se podría concluir que al menos unos puentes disulfuro (los inter H-H) estarían implicados, en alguna medida, en la funcionalidad de activar el complemento por esta vía (formando parte de la región efectora). Los inter H-L evidentemente no lo estarían (ni lo están) ya que el comportamiento del Fab-red y Fab'es prácticamente indistinguible. Sin embargo los datos que suministra la experiencia que refleja la tabla nº18 evidencian claramente que los fragmentos monovalentes no pierden funcionalidad anticomplementaria sino que su avidéz de unión específica por la superficie del eritrocito se ve disminuida a la cuarta parte.

En conclusión, estos datos, junto con los de dicroísmo circular permiten afirmar que los puentes disulfuro no están directamente implicados en el centro efector de la molécula de inmunoglobulina para activar el complemento por la vía alternativa. Sin embargo se puede afirmar que la condición suficiente para la activación de esta vía por inmunoglobulinas es que sobre la superficie del antígeno se sitúen un apropiado número de unidades Fab suficientemente próximas; no obstante de los datos obtenidos no se puede sacar la conclusión de que la región efectora del anticuerpo para la activación de esta vía se halle necesariamente en el primer dominio constante de las cadenas de inmunoglobulina, se requiera una cooperación V-C, o una cooperación mas amplia que abarque además a la superficie del antígeno.

6. CONCLUSIONES.-

1. Las características fisico-químicas del fragmento $F(ab')_2$ de la IgG de conejo son:
 - a) presente un peso molecular aproximado de 98000 Dalton por filtración en gel y de 96000 Dalton por EGPA-SDS.
 - b) Su radio molecular es de 43.97 Å.
 - c) Su coeficiente de difusión es de $4.87 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
 - d) Exhibe una movilidad electroforética en gel de agar de β_2 - γ_1 con un punto isoelectrico heterogeneo, alrededor de 5 en la escala de pH.
 - e) Su espectro de absorción presenta un máximo característico a 280nm con dos "hombros" a los 286 y 293nm.
 - f) Presenta un coeficiente de extinción a 280nm para una disolución 0.1% (p/v) de 1.34 en base a su composición de aminoácidos y 1.33 en base a su "peso en seco".
 - g) Su espectro de dicroísmo exhibe bandas características a 217 (-), 241(-), 265(+), 270(+), 273(+), 285(+) y 291(+)nm.
 - h) Su composición de aminoácidos en % molar es la siguiente: Asx 7.1, Glx: 7.5, Pro 9.1, Gly 7.9, Ala 6.6, Met 0.6, Leu 6.3 Tyr 4.1, Phe 2.1, His 0.9, Lys 4.1, Arg 2.0, Thr 12.8, Ser 9.3, Val 12.1, Ile 2.9, Cys 3.1, y Trp 1.3.

2. La carboximetilación del $F(ab')_2$ suministró los siguientes resultados:
 - a) El máximo nº de grupos sulfhidrilos obtenidos tras la reducción exhaustiva del fragmento $F(ab')_2$ de la IgG de conejo en condiciones desnaturalizantes es de 30 lo que supone la existencia de 15 puentes disulfuro y que el subtipo de la inmunoglobulina sea el K_B .
 - b) En condiciones no desnaturalizantes el máximo nº de grupos sulfhidrilo que se modifican es 10.
 - c) Estos grupos son los correspondientes al puente disulfuro inter cadenas pesadas (H-H), los correspondientes a los 2 puentes inter H-L y los correspondientes a los puentes intradominio "hiperreactivos" presentes en el fragmento de ca

dena pesada Fd.

- d) Los puentes disulfuro del $F(ab')_2$, modificables en condiciones no desnaturizantes, exhiben una susceptibilidad diferencial a la reducción, siendo los más susceptibles los inter H-H y los menos los inter H-L, exhibiendo los intracatenarios hiperreactivos una susceptibilidad intermedia lo que permite
 - e) La reducción del $F(ab')_2$ a 0.1mM de concentración de reductor permite obtener un fragmento, el Fab', que sin tener alterados los puentes inter H-L si tiene el correspondiente al inter H-H. Y a 2mM se obtiene el Fab' red, con todos los puentes modificados (excepto los intradominio).
 - f) La carboximetilación aplicada, en condiciones no desnaturizantes, no altera la estructura secundaria de la proteína como lo evidencian los espectros de dicroísmo de los fragmentos nativo y modificados, no existiendo interacción alguna entre los brazos monovalentes del $F(ab')_2$.
3. El sistema hemolítico en placa, de medida de actividad anticomplementaria residual, no es útil medir la capacidad anticomplementaria de los fragmentos monovalentes.
 4. El sistema hemolítico en fase soluble de medida de la actividad anticomplementaria por la vía alternativa, puesto a punto, es un sistema directo de medida reproducible, simple, es al menos 10 veces más sensible que el sistema en placa y obvia la limitación de no ser útil para fragmentos monovalentes.
 5. Los fragmentos monovalentes, Fab', Fab' red y/o Fab consumen complemento por la vía alternativa.
 6. Los puentes disulfuro del fragmento $F(ab')_2$ no están directamente implicados en la activación del sistema del complemento por la vía alternativa.

7. La condición suficiente para la activación de la vía alternativa es que se situen en suficiente proximidad un número apropiado de unidades Fab sobre la superficie del antígeno, por lo - que la bivalencia del anticuerpo no es condición necesaria para su activación. Pero no se puede concluir que la región efectora del anticuerpo se halle necesariamente en el primer dominio constante de las cadenas de inmunoglobulina, si se requiere una cooperación V-C, o una cooperación más amplia que abarque además a la superficie del antígeno.

7. BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Edelman G.M. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 63, 78-85, (1969).
- 2.- Fleischman J.B. y col. / Biochem. J. 88, 220-228, (1963).
- 3.- McConnell I. / en "The Immune System" cap.1, (1975), (Hobar M.J. y Backwell Scientific Publication).
- 4.- Kindt T.J. / Advances in Immunology 21, 35-86, (1975).
- 5.- Ortiz F. / Actas IX Congreso Nacional de Medicina Interna (1970).
- 6.- Nisonoff A. Hopper J.E. y Spring S.B. / "The Antibody Molecule" pag 550, (1975), (Academic Press)
- 7.- Fudenberg H.H. y col. / en "Basic Immunogenetics" cap. 5, (1978), 2^a Ed. (Oxford University Press; N.Y.).
- 8.- Raff M.C. y col. / Nature 225, 553-554, (1970).
- 9.- Strayer D.S. y col. / J. Immunol. 114, 722-727, (1975).
- 10.- Burnet F.M. / en "The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity" (Vanderbilt Univer. Press, Nashville, Tennessee), (1959).
- 11.- Kincade P.W. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 67, 1918-1925, (1970).
- 12.- Tonegawa S. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74, 3518-3522, (1977).
- 13.- Hozumi N. y Tonegawa S. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73, 3628-3632, (1976).
- 14.- Brack C. y Tonegawa S. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74, 5652-5656, (1977).
- 15.- Hood L. y col. / Ann.Rev.Genet. 9, 305-353, (1975).
- 16.- Weigert M. y col. / Nature 228, 1045-1047, (1970).
- 17.- Wu T. y Kabat E. / J.Exp.Méd 132, 211-250 (1979).
- 18.- Capra J.D. y Kindt T.J. / Immunogenetics 1, 417-427, (1975).
- 19.- Kabat E.A. y col. Proc.Nat. Acad.Sci.USA 75, 2429-2433, (1978).
- 20.- Marx J.L. / Science 202, 298-299, (1978).
- 21.- Marx J.L. / Science 202, 412-415, (1978).
- 22.- Weigert M. y col. / Nature 276, 785-790, (1978).
- 23.- Early P.W. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 76, 857-861, (1979).
- 24.- Kolata G.B. / Science 186, 432-435, (1974).
- 25.- Valbuena O. y col. / Nature 276, 780-784, (1978).
- 26.- Potter M. / Advances in Immunology 25, 141-212, (1978).
- 27.- McKean D.J. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 75, 3913-3917, (1978).
- 28.- Schechter I. y Burstein Y. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73, 3273-3277, (1976).
- 29.- Tonegawa S y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 75, 1485-1489, (1978).
- 30.- Glover D.M. y Hogness D.S. / Cell 10, 167-176, (1977).

- 31.- Wellauer P.K. y David I.B. / Cell 10, 193-212, (1977).
- 32.- Jeffreys A.J. y Flavell R.A. / Cell 12, 1097-1108, (1977).
- 33.- Tilghman S.M. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 75, 725-729, (1978).
- 34.- Breathnach R. y col. / Nature 270, 314-319, (1977).
- 35.- Goodman H.M. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 74, 5453-5457, (1977).
- 36.- Valenzuela P. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 75, 190-194, (1978).
- 37.- Honjo T. y Kataoka T. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 75, 2140-2144, (1978).
- 38.- Rabbitts T.H. / Nature 275, 291-296, (1978).
- 39.- Brack Ch. y col. / Cell 15, 1-14, (1978).
- 40.- Sakano H. y col. / Nature 277, 621-633, (1979)
- 41.- Wabl M.R. y col. / Science 199, 1078-1080, (1978).
- 42.- Wang A. y col. / J.Biol.Chem. 252, 7192-7199, (1977).
- 43.- Fu S.M. y col. / J.Immunol. 114, 250-252, (1975).
- 44.- Scharff M.D. y Uhr J.W. / Science 148, 646-648, (1965).
- 45.- De Petris S. / Biochem.J. 118, 385-389, (1970).
- 46.- Bevan M.J. y col. / Prog. Biophys. Mol. Biol. 25, 135-161, (1972).
- 47.- Cioli D. y Lennox E.S. / Biochemistry 12, 3211-3217, (1973).
- 48.- Bevan M.J. / Biochem. J. 122, 5-11, (1971).
- 49.- Choi Y.S. y col. / Biochemistry 10, 668-679, (1971).
- 50.- Uhr J.W. y Shenkein I. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 66, 952-956, (1970).
- 51.- Melchers F. / Biochemistry 10, 653-659, (1971).
- 52.- Zagury D. y col. / J. Cell.Biol. 46, 52-63, (1970).
- 53.- Schubert D. y Cohn M. / J. mol. Biol. 38, 273-288, (1968).
- 54.- Winterburn P.J. y Phelps C.F. / Nature 236, 147-151, (1972).
- 55.- Baglioni C. y col. / Nature New Biol. 232, 8-12, (1971).
- 56.- Baezinger J. y Kornfeld S. / J. Biol. Chem. 249, 7270-7281, (1974).
- 57.- Lennarz W.J. / Science 188, 986-991, (1975).
- 58.- Hsu A. y col. / Proc. Nat.Acad. Sci. USA 71, 2391-2395, (1974).
- 59.- Marshall / Biochem. Soc. Symp. 40, 17, (1974).
- 60.- Della Corte E. y Parkhouse R.M. / Biochem. J. 136, 589-596, (1973).
- 61.- Parkhouse R.M. / Nature New Biol. 236, 9-11, (1972).
- 62.- Koshland M.E. / Advances in Immunology 20, 41-69, (1975).
- 63.- Parkhouse R.M. y Della Corte E. / Biochem. J. 136, 607-609, (1973).
- 64.- Spiegelberg H.L. / Advances in Immunology 19, 259-294, (1974).

- 65.- Toraho A. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74, 2301-2305,(1977).
- 66.- Poljak R. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 70, 3305-3310,(1973).
- 67.- Novotny J. y Franck F. / Nature 258, 641-643,(1975).
- 68.- Segal D.H. y col. / Proc.Nat.Acad. Sci. USA 71, 4298-4302,(1974).
- 69.- Poljak R. y col. / Prog.Biophys.Mol.Biol. 31, 67-93,(1976).
- 70.- Green N.H. / Advances in Immunology 11, 1-30,(1969).
- 71.- Edelman G.M. y Gall W.E. / Ann.Rev.Biochemistry 38, 415-466,(1969).
- 72.- Padlan E.A. y col. / Nature New Biol. 245, 165-167,(1973).
- 73.- Hill R.L. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 56, 1762-1768,(1966).
- 74.- Steiner L.A. y Lowey S. / J. Biol. Chem. 241, 231-240,(1966).
- 75.- Stewart G.A. y col. / Immunochemistry 14, 263-268,(1977).
- 76.- Ygerabide J. y col. / J.Mol.Biol. 51, 573-590,(1970).
- 77.- Chan L.M. y Cathou R.E. / J.Mol.Biol. 112, 653-656,(1977).
- 78.- Zagjansky Y.A. / Arch.Biochem.Biophys. 166, 371-381,(1975).
- 79.- Dorrington K.J. y Painter R.H. / Prog. Immunol. II-1,75-84,(1974).
- 80.- Winkelhake J.L. / Immunochemistry 16, 695-714,(1978).
- 81.- Alexander M.D. y col. / Eur.J.Immunol. 6, 101-108 ,(1976).
- 82.- Ovary Z. y col. / J.Immunol. 116, 1265-1271 ,(1976).
- 83.- Endressen C. y Grov A. / Acta Path.Microbiol.Scand. 84, C,397,(1976).
- 84.- Porter R.R. / Nature 182, 670- 671 , (1958).
- 85.- Nisonoff A., Hoper J.E. y Spring S.B. / en "The Antibody Molecule" cap. 8 (Academic Press),(1975).
- 86.- Dubiski S. / J.Immunol. 103, 120-128 ,(1969).
- 87.- Nandy W.J.y Todd C.W. / Biochem.Genet. 4, 59,(1970).
- 88.- Parfentjev I.A. / U.S.Patent 2,065,196,(1936).
- 89.- Porter R.R. / Biochem.J. 73, 119-126,(1959).
- 90.- Nisonoff A. y col. / Arch.Biochem.Biophys. 89,230,(1960)
- 91.- Fudenberg H.H. / J.Clin.Invest. 41, 2123-2134,(1962).
- 92.- Nisonoff A. y Dixon F. / Biochemistry 3,1338-1342,(1964).
- 93.- Mole L.E. y col. / Biochem.J. 124, 301-318,(1971).
- 94.- Prahl J.W. / Nature 215, 1386-1387 ,(1967).
- 95.- Nisonoff A. y Nandy W.J. / Nature 194, 355-361,(1962).
- 96.- Givol D. / Biochem.J. 104, 39C-40C,(1967).
- 97.- Ghetie V. y Mihaescu S. / Immunochemistry 10, 251-255 ,(1973).

- 98.- Connell G.E. y Porter R.R. / *Biochem.J.* 124, 53P, (1971).
- 99.- Nelson C.A. / *J.Biol.Chem.* 239, 3727-3732, (1964).
- 100.- Goodman J.W. / *Biochemistry* 4, 2350-2357, (1965).
- 101.- Cahumann H.J. y col. / *J.Biol.Chem.* 240, 2762-2767, (1965).
- 102.- Givol D. y De Lorenzo F. / *J.Biol.Chem.* 243, 1886-1891, (1968).
- 103.- Fanger M.W. y Smyth D.G. / *Biochem.J.* 127, 757-765, (1972).
- 104.- Fanger M.W. y Smyth D.G. / *Biochem.J.* 127, 767-774, (1972).
- 105.- Hinrich W.A. y Smyth D.G. / *Immunology* 18, 759-767 (1979).
- 106.- Tristram G.R. y Smith R.H. / en "The Proteins" pag44, (1963), (academic Press).
- 107.- Foss O. / en "Organic Sulfur Compounds" pag 70, (1960), Vol 1, (Pergamon Press)
- 108.- Mitchell K.A.R. / *Chem.Rev.* 69, 166, (1969).
- 109.- Takagi T. y Ito N. / *Biochem.Biophys.Acta* 257, 1-10, (1972).
- 110.- Fieser L.F. / *Recl.Trav.Chim.* 69, 410, (1950).
- 111.- Jocelyn P.C. / en "Biochemistry of the -SH Group" cap.5, (1972), (Academic Press)
- 112.- Kharasch M.S. y col. / *J.Org.Chem.* 18, 1233, (1953).
- 113.- Cecil R. y McPhee J.R. / *Adv.Prot.Chem.* 14, 255-389, (1959).
- 114.- Ryle A.P. y Sanger F. / *Biochem.J.* 60, 535-540, (1955).
- 115.- Parker A.J. y Kharasch N. / *Chem.Rev.* 59, 583, (1959).
- 116.- Hirs C.H.W. / *Methods in Enzymology* 11, 197- , (1967).
- 117.- David N.M. y col. / *Biochem Biophys.Acta* 359, 101-111, (1974).
- 118.- Smithies O. / *Science* 150, 1595-1598, (1965).
- 119.- Neumann H. y col. / *Biochemistry* 6, 1421-1428, (1967).
- 120.- Catsimpoolas N y Wood J.L. / *J.Biol.Chem.* 239, 4132-4137, (1964).
- 121.- Azari P. / *Arch.Biochem.Biophys.* 115, 230-232 , (1966).
- 122.- Danehy J.P. / en "The Chemistry Of Organic Sulfur Compounds" Vol 2, cap 13 (pergamon Press), (1960).
- 123.- Atassi M.Z. / en "Immunochemistry of Proteins" Vol 1, cap 1 (1977).
- 124.- Cleland W.W. / *Biochemistry* 3, 480-482, (1964).
- 125.- Cecil R. y Weitzman P.D.J. / *Biochem.J.* 93, 1-11, (1964).
- 126.- Press E.M. / *Biochem.J.* 149, 285-288, (1975).
- 127.- Isenman D.E. y col. / *J.Immunol.* 114, 1726-1729 , (1975).
- 128.- Lopez de Castro J.A. y col. / *Biochem.Biophys.Res.Com.* 78, 1319-1326, (1977).

- 129.- McNabb T. y col. / J.Immunol. 117, 882-888,(1976).
- 130.- Takatsu K. y col. / J.Immunol. 114, 1838-1845,(1975).
- 131.- Dorrington K.J. y Painter R.H. / Prog.Immunol. III, 298-305,(1977).
- 132.- Romans D.G. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74, 2531-2535,(1977).
- 133.- Chan L.M. y Cathou R.E. / J.Mol.Biol. 112, 653-656,(1977).
- 134.- Hauptman S.P. y Tomasi T.B. / J.Biol.Chem. 250, 3891-3896,(1975).
- 135.- McFarlane R.G. / Proc.Roy.Soc.B. 173, 257-445,(1969).
- 136.- Bordet J. / Ann.Inst.Pasteur 10, 193-219,(1896).
- 137.- Pillemer L. y col. / J.Immunol. 71, 331-339,(1953).
- 138.- Alper C.A. y col. / New Engl.J.Med. 282, 349-354,(1970).
- 139.- Lay V.H. y Nussenweig V. / J.Exp.Med. 128, 991-1007,(1968).
- 140.- Huber H. y col. / Science 162, 1281-1283,(1968).
- 141.- Repis M.B. / Transplantation 32, 93-120,(1976).
- 142.- Hobart M.J. y Lachmann P.J. / Transplantation 32, 26-42,(1976).
- 143.- Porter R.R. y Reid K.M.B. / Nature 275, 699-704,(1978).
- 144.- Gigli I. y Austen K.F. / Ann.Rev.Microbiol. 25, 309-332,(1971).
- 145.- Romano E.L. y col. / Immunochemistry 10, 655-657,(1973).
- 146.- Lepow L.J. y col. / J.Exp.Med. 117, 983-1008,(1963).
- 147.- Muller-Eberhard H.J. y Kunkel H.G. / Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 106, 291-295,
(1961).
- 148.- Kaplan M.H. y Volanakis J.E. / J.Immunol. 112, 2135-2147,(1974).
- 149.- Reut R. y col / J.Immunol. 114, 120-124,(1975).
- 150.- Valet G. y Cooper N.R. / J.Immunol. 112, 1667-1673,(1974).
- 151.- Ratnoff O.D. y Naff G.B. / J.Exp.Med. 125, 337-358,(1967).
- 152.- Cooper N.R. / Science 165, 396-398,(1969).
- 153.- Gigli I. y Austen K.F. / J.Exp.Med 130, 833-846,(1969).
- 154.- Williams B.D. / en "Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis" pag.99,
(1979),(Reedbooks,Chertsey).
- 155.- Cooper N.R. y Muller-Eberhard H.J. / J.Exp.Med. 132, 775-793,(1970).
- 156.- Muller-Eberhard H.J. / Ann. Rev. Biochemistry 44, 697-724,(1975).
- 157.- Mayer M.M. / Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69, 2954-2958,(1972).
- 158.- Kolb W.P. y Muller-Eberhard H.J. / J.Exp.Med 143, 1131-1139,(1976).
- 159.- Lachmann P.J. y col. / Immunology 24, 135-145,(1973).
- 161.- Opferkuch W. y Segerling M. / en "Comprehensive Immunology Vol 2, cap. 1.,
(1977),(Plenum Medical Press,New York,London).

- 160.- Medicus R.G. y col. / *Scand.J.Immunol.* 5, 1049-1055,(1976).
- 162.- Donaldson V.H. y Evans R.R. / *Amer.J.Med.* 35, 37-44,(1963).
- 163.- Ratnoff O.D. y col. / *J.Exp.Med.* 129,315-331,(1969).
- 164.- Pillemer L. y col. / *Science* 120, 279-285,(1954).
- 165.- Marcus R.L. y col. / *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 68, 1351-1354,(1971).
- 166.- Burger R. y col. / *Fed.Proceedings* 34, 918a,(1975).
- 167.- Platts-Hills T.A. e Ishizaka K. / *J.Immunol.* 113, 349-358,(1974).
- 168.- Poskitt T.R. y col. / *J.Exp.Med.* 138, 715-722,(1973).
- 169.- Sandberg A.L. y col. / *J.Immunol.* 107, 920-923,(1971).
- 170.- Reid K.B.M. / *Immunology* 20, 649-658,(1971).
- 171.- Gotze O. y Muller-Eberhard H.J. / *J.Exp.Med.* 134, 905-108S,(1971).
- 172.- Joseph B.S. y col. / *J.Exp.Med.* 141, 761-774,(1975).
- 173.- Medicus R.G. y col. / *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 73, 612-616,(1976).
- 174.- Schreiber R.D. y col. / *J.Exp.Med.* 144, 1062-1075,(1976).
- 175.- Medicus R.G. y col. / *J.Exp.Med.* 144, 1076-1093,(1976).
- 176.- Whaley K. y Ruddy S. / *J.Exp.Med.* 144, 1147-1163,(1976).
- 177.- Pangburn M.K. y col. / *J.Exp.Med.* 146, 257-270,(1977).
- 178.- Fearon D.T. y Austen K.F. / *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 74, 1683-1687,(1977).
- 179.- Pangburn M.K. y Muller-Eberhard H.J. / *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 75,2416-2420,
(1978).
- 180.- Fearon D.T. / *Proc Nat.Acad.Sci.USA* 75,1971-1975,(1978).
- 181.- Lachmann P.J. y Halbwachs L. / *Clin.Exp.Immunol.* 21, 109-114,(1975).
- 182.- Fearon D.T. y Austen K.F. / *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 72, 3220-3224,(1975).
- 183.- Phillips J.K. y col. / *J.Immunol.* 109, 334-341,(1975).
- 184.- Schreiber R.D. y col. / *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 75, 3948-3952,(1978).
- 185.- Spitzer R.E. y col. / *Science* 164, 436-437,(1969).
- 186.- Ruley E.J. y col. / *J.Clin.Invest.* 52, 896-903,(1973).
- 187.- Schreiber R.D. y col. / *J.Exp. Med.* 142, 760-772,(1975).
- 188.- Scott D.M. y col. / *Clin. Exp.Med.* 32,12-24,(1978).
- 189.- McLean R.H. y Nilson S.H. / *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 161, 358-363,(1979).
- 190.- Medicus R.G. y col. / *J.Immunol.* 116, 1741-1742,(1976).
- 191.- Gotze O. y Muller-Eberhard H.J. / *Advances in Immunology* 24, 1-35,(1976).
- 192.- Taranta A. y Franklin E.C. / *Science* 134, 1981-1982,(1961).
- 193.- Ishizaka K. y col. / *J.Immunol.* 88, 690-695,(1962).

- 194.- Ovary Z. y Taranta A. / Science 140, 193-195, (1963).
- 195.- Schur P.H. y Becker E.L. / J.Exp.Med. 118, 891-904, (1963).
- 196.- Chan P. y col. / Fed.Proceedings 23, 558, (1964).
- 197.- Jaquet H. y Cebra J. / Biochemistry 4, 954-963, (1965).
- 198.- Isliker H. y col. / Vth Int.Symp.Immunopathology pag.197, (1968), (Schwab, Bases).
- 199.- Jackson D.C. y Grant C.K. / Immunochemistry 13, 721-724, (1976).
- 200.- Fujita T. y col. / Immunochemistry 14, 25-30, (1977).
- 201.- Ishizaka T. y col. / J.Immunol. 108, 848-851, (1972).
- 202.- Konno T. y col. / Immunochemistry 12, 773-777, (1975).
- 203.- Peterson E.A. y Sober H.A. / en "Methods in Enzymology" Vol.5, pag.3-27, (1962), (Academic Press, New York).
- 204.- Ouchterlony O. / Acta Pathol.Microbiol. Scand. 26, 507, (1949).
- 205.- Scheidegger J.J. / Inter.Arch.Allergy Appl. Immunol. 7, 103-110, (1955).
- 206.- Davis B.J. / Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404-427, (1964).
- 207.- Kabat E. y Mayer H. / en "Experimental Immunochemistry" pag.556, 2^a Ed., (1961), (Thomas C.C. Ed.).
- 208.- Andrews P. / Methods Biochem.Analysis 8, 1-53, (1969).
- 209.- Weber K. y Osborn M. / en "The Proteins" Cap.3, (1975), (Academic Press, N.Y.).
- 210.- Ackers G.K. / Biochemistry 3, 723-730, (1964).
- 211.- Gavilanes J. / Tesis Doctoral "L-Glicerol-3-Fosfato Deshidrogenasa del Insecto Ceratitis Capitata. Aislamiento y Purificacion. Propiedades Fisico-Quimicas y Enzimaticas" , (1976), (Univer.Complutense de Madrid, Madrid).
- 212.- Goodwin T.W. y Morton R.A. / Biochem.J. 40, 628-632, (1946).
- 213.- Edelhoch H. / Biochemistry 6, 1948-1954, (1967).
- 214.- Wetlaufer D.B. / Advan.Prot.Chem. 17, 303-390, (1962).
- 215.- Haber E. y Anfinsen C.B. / J.Biol.Chem. 236, 422-424, (1961).
- 216.- Gall W.E. y col. / Biochemistry 7, 1973-1982, (1968).
- 217.- Hartin A. y col. / Immunochemistry 13, 371-378, (1976).
- 218.- Hunter W.N. y Greenwood F.C. / Nature 194, 495-496, (1962).
- 219.- Kliman N.R. y Taylor R.B. / Clin.Exp.Immunol. 4, 473-487, (1969).
- 220.- Gonvers J.J. y col. / Biochem.Biophys.Acta 251, 263-273, (1971).
- 221.- Reif A.E. / Immunochemistry 6, 723-731, (1969).
- 222.- Brigman W.B. / J.Amer.Chem.Soc. 68, 857, (1964).

- 223.- Cerottini J.C. y Fitch F. / Int.Arch.Allergy 34, 188-200,(1968).
- 224.- Nisonoff A. y col. / Science 132, 1770-1771,(1960).
- 225.- Cathou R.E. / Biochemistry 7, 3958-3964,(1968).
- 226.- Ross D.L. y Jirgenson B. / J.Biol.Chem. 243, 2829-2836,(1968).
- 227.- Stewart G.A. y col. / Immunochemistry 14, 263-268,(1977).
- 228.- Poljak R.J. y col. / Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70, 3305-3310,(1973).
- 229.- Edmundson A.B. y col. / Biochemistry 14, 3953-3961,(1975).
- 230.- Padlan E.A. y col. / en "The Immune System: Genes,Receptor,Signals."(1974),
(Academic Press,New York).
- 231.- McBurnette S.K. y Handy N.J. / Immunochemistry 12, 861-864,(1975).
- 232.- Schlamowitz M. y col. / J.Immunol. 114, 1590-1598,(1975).
- 233.- Painter R.H. y Freedman M.H. / J.Biol.Chem. 246, 4340-4349,(1971).
- 234.- Freedman M.H. y Painter R.H. / J.Biol.Chem. 246, 6692-6699,(1971).
- 235.- Braun D.G. y Jatou J.C. / Immunochemistry 10, 387-395,(1973).
- 236.- Lebovitz H.E. y col. / J.Biol.Chem. 243, 4197-4205,(1968).
- 237.- Fruchter R.G. y col. / Biochem.J. 116, 249-259,(1970).
- 238.- Appella E. y col. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 68,1341-1345,(1971).
- 239.- Fleischman J.B. / Immunochemistry 10,401-407,(1973).
- 240.- O'Donnell I.J. y col./ Biochem.J. 116,261-268,(1970).
- 241.- Strosberg A.D. y col. / Biochemistry 11, 4978-4984,(1972).
- 242.- Cathou R.E. y col./Prog.Immunol.II,Vol.1,63-73,(1974),(North-Holland,
Amsterdam).
- 243.- Valentine R.C. y Green N.M. / J.Mol.Biol. 27, 615-617,(1967).
- 244.- Ehrnst A. / J.Immunol. 121, 1206-1212,(1978).

