

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
1.1.- Autoanticuerpos naturales	1
1.1.1.- Consideraciones generales	1
1.1.2.- Caracterización experimental	2
1.1.3.- Genes que codifican para los autoanticuerpos naturales	4
1.2.- Aglutininas frías	5
1.2.1.- Consideraciones generales	5
1.2.2.- Antígenos reconocidos por las aglutininas frías	7
1.2.2.1.- Antígenos Ii	8
1.2.2.2.- Relación entre los antígenos iI y los del sistema ABO(H) ..	12
1.2.3.- Semejanzas estructurales de las aglutininas frías	14
1.3.- Maduración de eritrocitos	15
1.4.- Hipótesis de trabajo y objetivo	17
1.5.- Planteo general del trabajo	21
1.5.1.- Separación de eritrocitos jóvenes y viejos	22
1.5.2.- Purificación y marcado de las aglutininas frías	23
1.5.3.- Análisis de la interacción entre la proteína KAU y los eritrocitos	26
2.- MATERIALES Y METODOS	28
2.1.- Separación de subpoblaciones de eritrocitos	28
2.1.1.- Obtención de la sangre	28
2.1.2.- Preparación del gradiente de densidad	28
2.1.3.- Preparación de los eritrocitos	29
2.1.4.- Separación de subpoblaciones de eritrocitos	29
2.1.5.- Medida de los marcadores de edad de las fracciones	30
2.1.5.1.- Determinación del volumen celular medio	30
2.1.5.2.- Determinación de la concentración de hemoglobina corpuscular media	30
2.1.5.3.- Actividad enzimática de acetil colinesterasa	30
2.1.5.4.- Porcentaje de reticulocitos	32
2.1.5.5.- Determinación del porcentaje de hemoglobina glicosilada ..	32
2.1.5.5.1.- Preparación de los hemolisados	32
2.1.5.5.2.- Cromatografía de afinidad	33



2.1.6.- Tratamiento de datos	34
2.2.- Aglutinina fría (AF)	34
2.3.- Caracterización de la actividad de aglutinina fría	34
2.3.1.- Eritrocitos tratados con papaína	35
2.3.2.- Ensayo de hemoaglutinación	36
2.4.- Purificación de la aglutinina fría	36
2.4.1.- Purificación utilizando membranas de eritrocitos como inmunoadsorbente	36
2.4.1.1.- Preparación de las membranas de eritrocitos	36
2.4.1.2.- Purificación de la aglutinina fría	37
2.4.1.3.- Control de la purificación	37
2.4.1.3.1.- Rendimiento y enriquecimiento	37
2.4.1.3.2.- Análisis de la pureza de las fracciones	39
2.4.2.- Purificación por precipitación a baja fuerza iónica	40
2.4.3.- Purificación por precipitación a baja fuerza iónica y gel filtración	40
2.4.4.- Purificación por precipitación a baja fuerza iónica y por cromatografía de afinidad sobre τ -globulinas anti-albúmina humana inmovilizadas	41
2.5.- Marcado de la aglutinina fría purificada con ^{125}I	42
2.5.1.- Marcado por métodos directos	42
2.5.1.1.- Preparación de tubos con iodogen	43
2.5.1.2.- Preparación de la cloramina-T	43
2.5.1.3.- Reacción de incorporación de yodo	43
2.5.2.- Marcado directo mediante bloqueo previo del sitio activo de la aglutinina fría	46
2.5.2.1.- Reacción de las membranas de eritrocitos y de la AF con yodo no radioactivo	46
2.5.2.2.- Marcado de la aglutinina fría con ^{125}I mediante bloqueo previo de su sitio activo	47
2.5.3.- Marcado de la aglutinina fría por métodos de conjugación	48
2.6.- Análisis de los métodos de marcado empleados	51
2.6.1.- Métodos de marcado directo (anticuerpos marcados #1 a #5)	51
2.6.1.1.- Evaluación de la incorporación de yodo en la IgM	51
2.6.1.2.- Estudio de la estabilidad de los anticuerpos marcados	52

2.6.1.3.- Estudio de la actividad biológica de los anticuerpos marcados	53
2.6.1.3.1.- Estudio de la actividad biológica del anticuerpo marcado #1	54
2.6.1.3.1.1.- Reactividad de concentraciones variables de anticuerpo marcado con una concentración fija de eritrocitos	54
2.6.1.3.1.2.- Reactividad del anticuerpo marcado con concentraciones variables de eritrocitos	54
2.6.1.3.2.- Estudio de la actividad biológica de los anticuerpos marcados #2 a #5	54
2.6.1.3.2.1.- Reactividad de los anticuerpos marcados con eritrocitos normales	54
2.6.1.3.2.2.- Reactividad de los anticuerpos marcados con eritrocitos tratados con papaína	55
2.6.1.3.3.- Estudio de la actividad biológica del anticuerpo marcado #3	55
2.6.1.3.3.1.- Determinación de la mínima concentración de anticuerpo aglutinante	55
2.6.1.3.3.2.- Reactividad del anticuerpo marcado en condiciones aglutinantes	56
2.6.1.3.3.3.- Reactividad del anticuerpo marcado con concentraciones variables de eritrocitos normales	56
2.6.1.3.3.4.- Reactividad del anticuerpo marcado con concentraciones variables de eritrocitos tratados con papaína	56
2.6.1.3.3.5.- Purificación por afinidad del anticuerpo marcado utilizando membranas de eritrocitos	57
2.6.1.3.3.6.- Purificación por afinidad del anticuerpo marcado utilizando eritrocitos tratados con papaína	57
2.6.1.3.3.7.- Evaluación de las purificaciones	58
2.6.1.3.4.- Evaluación de la acción del oxidante y/o del yodo sobre la reactividad del anticuerpo marcado	58
2.6.1.3.4.1.- Estudio de la integridad del pentámero de la IgM luego de la reacción con el yodo	60
2.6.1.3.4.2.- Estudio de la actividad biológica del anticuerpo luego de la reacción con el yodo	60
2.6.2.- Marcado realizado con el sitio activo del anticuerpo bloqueado	60
2.6.2.1.- Análisis del anticuerpo luego de su reacción con yodo no radioactivo	60
2.6.2.2.- Análisis del anticuerpo marcado con ^{125}I	61
2.6.3.- Marcado del anticuerpo por métodos de conjugación (anticuerpos marcados #6-#10)	62
2.6.3.1.- Evaluación de la incorporación de yodo a la IgM	62
2.6.3.2.- Estudio de la estabilidad de los anticuerpos marcados	62

2.6.3.3.- Estudio de la actividad biológica de los anticuerpos marcados	62
2.6.3.3.1.- Determinación de la capacidad máxima de asociación a eritrocitos	62
2.6.3.3.2.- Competencia entre anticuerpo marcado y no marcado . . .	63
2.7.- Determinación de la densidad de sitios de antígeno I	63
2.7.1.- Determinación de la cinética de la reacción de la aglutinina fría con el antígeno I a 4°C	63
2.7.2.- Determinación del rango óptimo de inhibición	64
2.7.3.- Determinación del número de sitios de antígeno I y de la constante de afinidad	64
2.7.3.1.- Cinética del tratamiento con papaína	68
2.7.3.2.- Efecto del Percoll en la determinación del número de sitios de antígeno I	68
2.7.4.- Tratamiento de datos	68
2.7.4.1.- Evaluación del ajuste de los datos a los modelos lineales y medida de la dispersión	68
2.7.4.2.- Estimación del error en la determinación del número de sitios de antígeno I por eritrocito	69
3.- RESULTADOS	71
3.1.- Separación de las subpoblaciones	71
3.2.- Caracterización de las fracciones	72
3.2.1.- Determinación del volumen celular medio	72
3.2.2.- Determinación de la concentración de hemoglobina corpuscular media	72
3.2.3.- Actividad enzimática acetil colinesterasa	76
3.2.4.- Porcentaje de reticulocitos	76
3.2.5.- Determinación del porcentaje de hemoglobina glicosilada . . .	80
3.3.- Caracterización de la proteína KAU	84
3.4.- Purificación de la aglutinina fría	84
3.5.- Marcado de la aglutinina fría purificada con ¹²⁵ I	89
3.5.1.- Marcado por métodos directos (anticuerpos marcados #1 a #5)	89
3.5.1.1.- Evaluación de la incorporación de iodo a la IgM	89
3.5.1.2.- Estudio de la estabilidad de los anticuerpos marcados	94

3.5.1.3.- Estudio de la actividad biológica de los anticuerpos marcados	94
3.5.1.3.1.- Anticuerpo marcado #1	94
3.5.1.3.1.1.- Reactividad de concentraciones variables de anticuerpo marcado con una concentración fija de eritrocitos	94
3.5.1.3.1.2.- Reactividad del anticuerpo marcado con concentraciones variables de eritrocitos	96
3.5.1.3.2.- Anticuerpos marcados #2 a #5	96
3.5.1.3.2.1.- Reactividad con eritrocitos normales	96
3.5.1.3.2.2.- Reactividad con eritrocitos tratados con papaína	98
3.5.1.3.3.- Anticuerpo marcado #3	98
3.5.1.3.3.1.- Determinación de la concentración mínima aglutinante	98
3.5.1.3.3.2.- Reactividad en condiciones aglutinantes	99
3.5.1.3.3.3.- Reactividad con concentraciones variables de eritrocitos normales	99
3.5.1.3.3.4.- Reactividad con concentraciones variables de eritrocitos tratados con papaína	99
3.5.1.3.3.5.- Purificación por afinidad del anticuerpo marcado	100
3.5.1.4.- Evaluación de la acción del oxidante y/o del yodo en la reactividad del anticuerpo marcado	103
3.5.1.4.1.- Estudio de la integridad del pentámero de la IgM luego de su reacción con el yodo	103
3.5.1.4.2.- Estudio de la actividad biológica del anticuerpo luego de su reacción con el yodo	103
3.5.2.- Marcado realizado con el sitio activo del anticuerpo previamente bloqueado	106
3.5.2.1.- Análisis del anticuerpo luego de su reacción con yodo no radioactivo	106
3.5.2.2.- Análisis del anticuerpo marcado con ¹²⁵ I	106
3.5.3.- Marcado por métodos de conjugación (anticuerpos marcados #6-#10)	111
3.5.3.1.- Evaluación de la incorporación de yodo a la IgM	111
3.5.3.2.- Estudio de la estabilidad de los anticuerpos marcados	111
3.5.3.3.- Estudio de la actividad biológica de los anticuerpos marcados	113
3.5.3.3.1.- Determinación de la máxima capacidad de asociación a eritrocitos	113
3.5.3.3.2.- Competencia entre anticuerpo marcado y no marcado	115
3.6.- Determinación de la densidad de sitios de antígeno I	115
3.6.1.- Determinación de la cinética de la reacción de la aglutinina fría con el antígeno I	115
3.6.2.- Determinación del rango de concentraciones de anticuerpo sin marcar	118

3.6.3.- Determinación del número de sitios de antígeno I y de la constante de afinidad	118
3.6.3.1.- Resultados observados con el anticuerpo marcado #6	118
3.6.3.2.- Resultados observados con el anticuerpo marcado #7	124
3.6.3.2.1.- Cinética del tratamiento con papaína	124
3.6.3.2.2.- Determinación del número de sitios de antígeno I	124
3.6.3.3.- Resultados observados con el anticuerpo marcado #8	132
3.6.3.3.1.- Análisis del efecto del Percoll en la determinación del número de sitios de antígeno I	132
3.6.3.3.2.- Determinación del número de sitios de antígeno I	132
3.6.3.4.- Resultados observados con el anticuerpo marcado #10	136
3.6.3.4.1.- Número de sitios de antígeno I en eritrocitos fraccionados de acuerdo a su edad	139
3.6.3.4.2.- Repeticiones realizadas en un mismo ensayo de las dos extracciones de cada individuo	145
3.6.3.5.- Análisis de la dispersión observada en la determinación del número de sitios de antígeno I por eritrocito	148
3.6.3.5.1.- Estudio de algunas variables que inciden en la determinación del número de sitios de antígeno I	148
3.6.3.5.2.- Estimación del error en la determinación del número de sitios de antígeno I	154
3.6.3.5.2.1.- En las condiciones experimentales de trabajo	154
3.6.3.5.2.2.- En condiciones hipotéticas: correlación lineal óptima de los datos experimentales a la ecuación de Ekins	161
3.6.3.6.- Modificaciones de las condiciones de trabajo para disminuir el error en la determinación del número de sitios de antígeno I	161
3.6.3.6.1.- Incidencia de las fuentes de error más relevantes en la ecuación de Ekins	161
3.6.3.6.2.- Aproximación a la determinación de la incidencia de algunas variables en condiciones hipotéticas	167
4.- DISCUSION	170
4.1.- Separación de las subpoblaciones	170
4.2.- Ensayo de la edad de las fracciones	171
4.3.- Caracterización de la proteína KAU	173
4.4.- Purificación de la aglutinina fría	173
4.5.- Marcado de la aglutinina fría purificada con ¹²⁵ I	174

4.5.1.- Análisis de los métodos de marcado directo (anticuerpos marcados de #1 a #5)	174
4.5.1.1.- Evaluación de la incorporación de yodo a la IgM	175
4.5.1.2.- Análisis de la estabilidad de los anticuerpos marcados	176
4.5.1.3.- Estudio de la actividad biológica de los anticuerpos marcados	177
4.5.1.3.1.- Reacción del anticuerpo marcado #1	177
4.5.1.3.2.- Reacciones de los anticuerpos marcados #2 a #5	178
4.5.1.3.3.- Evaluación de la acción del oxidante y/o del yodo en la pérdida de reactividad del anticuerpo marcado	180
4.5.2.- Análisis del método de marcado mediante bloqueo previo del sitio activo del anticuerpo	182
4.5.2.1.- Análisis de la actividad del anticuerpo luego de la reacción con yodo no radioactivo	183
4.5.2.2.- Análisis de la actividad del anticuerpo luego de la reacción con ¹²⁵ I	184
4.5.3.- Análisis del método de marcado por conjugación (6 a 10)	186
4.5.3.1.- Evaluación de la incorporación de yodo	187
4.5.3.2.- Análisis de la estabilidad	188
4.5.3.3.- Estudio de la actividad biológica de los anticuerpos marcados	188
4.5.3.3.1.- Determinación de la máxima capacidad de asociación a eritrocitos	188
4.5.3.3.2.- Competencia entre anticuerpo marcado y sin marcar	190
4.5.4.- Comparación de los métodos de marcado	191
4.6.- Determinación de la densidad de sitios de antígeno I'	192
4.6.1.- Análisis de los resultados observados con el anticuerpo marcado #6	193
4.6.2.- Análisis de los resultados observados con el anticuerpo marcado #7	196
4.6.3.- Análisis de los resultados observados con el anticuerpo marcado #8	198
4.6.4.- Análisis de los resultados observados con el anticuerpo marcado #10	201
4.6.5.- Análisis de la dispersión observada en la determinación del número de sitios de antígeno I	204
4.6.5.1.- Estudio de algunas variables que inciden en la determinación del número de sitios de antígeno I	204
4.6.5.2.- Incidencia del método empleado para determinar el nivel de interacciones inespecíficas	206
4.6.5.3.- Estimación del error en la determinación del número de sitios de antígeno I	207

4.6.5.4.- Posibles modificaciones para disminuir el error en la determinación del número de sitios de antígeno I	210
4.6.5.4.1.- Incidencia de la relación "f/e" en la ecuación de Ekins .	210
4.6.5.4.2.- Aproximación a la determinación de la incidencia de "f/e" en condiciones experimentales hipotéticas	212
4.6.6.- Fluctuaciones fisiológicas en la exposición del número de sitios de antígeno I en eritrocitos	213
5.- CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	216
6.-BIBLIOGRAFIA	220
APENDICE I: DEDUCCION DE LAS ECUACIONES DE SCATCHARD Y EKINS	
I.1.- Ecuación de Scatchard	232
I.2.- Ecuación de Ekins	232
APENDICE II: PROGRAMA REALIZADO PARA ESTIMAR EL ERROR EN EL NUMERO DE SITIOS DE ANTIGENO I POR ERITROCITO	
	236
APENDICE III: SECUENCIA AMINOACIDICA DEL FRAGMENTO FAB DE LA PROTEINA KAU	
	239

