

Cinética de las reacciones producidas en el radioinmunoanálisis (RIA) de algunas sustancias

Reaction kinetics produced in the radioimmunoassay (RIA) of some substances

SAN MARTÍN, E.; MORENO-FRIGOLS, J.L.; PERIS, JE Y SAN MARTÍN, MD.

Departamento de Química Física. Sección Farmacia. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
Avda. Vicente Andrés Estellés, s/n. 46100-Burjasot. Valencia

RESUMEN

Se ha estudiado la cinética de la unión, a sus anticuerpos específicos, de la insulina y dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAs), como RIA en fase sólida, y de la osteocalcina y fracción c-terminal de la parathormona (c-PTH), como RIA en disolución. Para realizar el estudio cinético se ha utilizado el método diferencial. Se realizan diluciones de la concentración inicial de antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac) comprobando las modificaciones que presenta la velocidad de reacción. Así mismo se ha estudiado la velocidad de la reacción entre las sustancias indicadas y sus anticuerpos en función de la temperatura de incubación. La cinética de la reacción antígeno-anticuerpo en los casos estudiados (con una excepción) presenta un orden aparente inferior a uno para el antígeno. Se propone un posible mecanismo de reacción de tipo micaliano. Dicho mecanismo es coherente con los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la temperatura.

Palabras clave: Unión, antígeno, anticuerpo, cinética.

ABSTRACT

The kinetics of binding of insulin and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAs) to their specific antibodies were studied by means of solid phase radioimmunoanalysis. The kinetics of binding of the osteocalcine and the c-terminal human parathyroid hormone (c-PTH) were studied by means of liquid phase radioimmunoanalysis. The differential method was used in all the studies. Both, the effect of dilution of antigen (Ag) and antibody (Ab) and the effect of temperature on the reaction rate were studied. With the exception of DHEAs, for all the other antigens studied the antigen-antibody reaction showed an apparent kinetic order lower than one, and a michaelis-menten reaction mechanism is proposed. This mechanism is consistent with results obtained from the study of influence of temperature.

Key words: Binding, antigen-antibody, kinetics.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo constituye una aproximación a la puesta a punto de un esquema de trabajo que sirva para poder estudiar las uniones antígeno-anticuerpo a partir de los reactivos del radioinmunoanálisis (RIA).

Se pretende determinar un modelo que explique, de manera general, dichas reacciones antígeno-anticuerpo, así como establecer la influencia, que sobre esta unión, presenten algunos factores como: temperatura, clase de anticuerpo, reacción en fase sólida o en disolución, características del antígeno, etc.

La unión del antígeno con el anticuerpo tiene lugar a través de múltiples enlaces no covalentes entre ese antígeno y los aminoácidos del sitio de combinación. Las fuerzas que mantienen unidos el antígeno y el anticuerpo no son, en esencia, diferentes de las interacciones denominadas inespecíficas que se producen entre dos proteínas no relacionadas (1,2,3).

Aunque las fuerzas de atracción (es decir, enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, de Van Der Waals e hidrófobas) involucradas son individualmente débiles, en comparación con las uniones covalentes, la multiplicidad de los enlaces conduce a una considerable energía de unión (1,2).

Es posible que la cinética de la reacción pueda tener significado para muchas de las actividades biológicas de los anticuerpos (2,4).

En muchas situaciones, las reacciones Ag-Ac son dirigidas por factores entálpicos, incluyendo, al menos en el caso de la reacción de la lisozima con con el Ac monoclonal D1.3, la entalpía de solvatación (5).

Varios estudios (6,7) realizados con FSH, LH y cortisol marcados con ^{125}I frente a sus anticuerpos específicos indican que, para un rango de concentraciones de antígeno determinado, las velocidades iniciales obtenidas con distintas diluciones del antígeno son proporcionales a las concentraciones iniciales de Ag. También se ha obtenido dicha proporcionalidad entre velocidades iniciales y concentraciones para diferentes diluciones de anticuerpo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados para cada sustancia son:

- **Insulina:** los componentes del kit COAT-A-COUNT Insulina de DPC® (Diagnostic Products Corporation).
- ^{125}I -Insulina. Viales que contienen una solución concentrada de ^{125}I -Insulina.
- Tubos recubiertos. Tubos de polipropileno recubiertos de anticuerpos monoclonales anti-insulina.
- **Dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAs):** Pertenecientes al kit DHEA sulfato de INMUNOTECH®.
- ^{125}I -DHEA sulfato. En forma líquida con proteínas y azida de sodio.
- Tubos recubiertos de anticuerpos monoclonales anti-DHEA sulfato.
- **Osteocalcina:** Pertenecientes al kit Osteocalcina RIA DSL-6900 de Diagnostic Systems Laboratories Inc..
- ^{125}I -Osteocalcina. Un vial que contiene osteocalcina bovina marcada con ^{125}I en un tampón de base proteica con azida de sodio como conservante.
- Antisuero osteocalcina. Un vial que contiene anticuerpos de conejo contra osteocalcina bovina en un tampón de base proteica con azida de sodio como conservante.
- Reactivo precipitante. Contiene anticuerpos de oca contra gammaglobulina de conejo en una solución tamponada con polietilenglicol como precipitante y azida de sodio como conservante.
- **Fracción C-terminal de la parathormona (c-PTH):** Incluidos en C-terminal PTH ^{125}I RIA kit de INCSTAR® Corporation.
- ^{125}I -C-terminal PTH sintética humana. Diluida en tampón BSA-borato-EDTA con timerosal (liofilizado).
- C-terminal PTH antisuero. Anticuerpo anti hormona paratiroidea humana diluido en tampón BSA-borato-EDTA con timerosal liofilizado.
- Patrón cero C-terminal PTH. Tampón BSA-borato-EDTA con timerosal y otros estabilizantes (liofilizado).
- Complejo precipitante de PTH C-terminal. Suero normal de pollo previamente precipitado con suero antipollo de oca o conejo y polietilenglicol (PEG), diluido en tampón BSA-borato con timerosal (liofilizado).

Todos los reactivos de este kit contienen como conservante azida de sodio.

Procedimiento analítico

La preparación de reactivos se realiza a partir de la disolución o el liofilizado que contiene el antígeno marcado con ^{125}I y que suministra el Kit para cada sustancia. De esta disolución se realizan una serie de diluciones preparando en todos los casos, unas disoluciones de antígeno correspondientes a concentraciones relativas del 100, 80, 60, 40, 30, 20, 10 y 5% de la inicial. Es decir 8 concentraciones relativas de antígeno.

El estudio de la cinética para distintas concentraciones de antígeno se ha realizado a temperatura ambiente para cada una de las distintas concentraciones relativas de antígeno y manteniendo constante la

concentración de anticuerpo (tubos recubiertos de anticuerpo contra el antígeno o un volumen constante de la disolución de anticuerpo suministrada por el Kit). En el caso concreto de la PTHc-terminal, se utilizaron dos concentraciones relativas de antígeno adicionales, correspondientes al 150 y 200%.

Descripción

Este ensayo se realizó de la siguiente forma:

- 1) Se prepara un grupo de tubos (recubiertos de anticuerpo contra el antígeno o con un volumen constante de la disolución de anticuerpo que suministra el Kit) para cada dilución de antígeno. Cada uno de los grupos tiene un número de tubos determinado que corresponde al número de tiempos empleados en el estudio.
- 2) Se añade un volumen constante de cada dilución de antígeno a cada uno de los tubos de su grupo y se mantiene a temperatura ambiente. En los casos con anticuerpos en disolución, se realiza el ensayo manteniendo los tubos en agitación.
- 3) Se detiene la reacción, a los distintos tiempos, de la siguiente forma según los casos:
 - a) En los casos en que el anticuerpo está fijado a la pared del tubo (técnicas de RIA en fase sólida) mediante decantación y lavado de cada tubo tres veces con 5 ml de agua destilada para quitar el exceso de antígeno marcado.
 - b) En las técnicas con anticuerpo en disolución, añadiendo a cada tubo 1 ml de la suspensión precipitante. A continuación se mantiene los tubos en un baño de hielo hasta que se ha detenido la reacción de los tubos del último de los tiempos. A partir de este momento se deja incubar todos los tubos 15 minutos a temperatura ambiente en el caso de la osteocalcina y dos horas a 4-8 °C en la c-PTH. Una vez terminada la incubación se centrifuga a 1500 g durante 15 minutos con refrigeración (4 °C) en ambos casos.
- 4) Para conocer la actividad total de cada dilución de antígeno se mide las cpm de los tubos correspondientes a las diferentes diluciones antes de decantar.
- 5) Cuando el ensayo ha terminado se determina la actividad, en cuentas por minuto (cpm), de todos los tubos en el contador de radiaciones gamma.

El estudio de la cinética para distintas concentraciones de anticuerpo se realizó de igual manera que la descrita en la cinética para diferentes concentraciones de antígeno pero en este caso con una serie de concentraciones relativas de anticuerpo y manteniendo constante la concentración de antígeno. La temperatura ambiente, tiempos de estudio y forma de parar la reacción son idénticos, para cada sustancia, a los empleados en su respectivo ensayo a diferentes concentraciones de antígeno.

El estudio de la cinética de la reacción antígeno-anticuerpo en función de la temperatura se realizó con concentraciones de antígeno y anticuerpo constantes correspondientes a las concentraciones relativas del 100% y empleando los mismos tiempos de muestreo. Las distintas temperaturas fueron 10, 20, 30 y 40 °C. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Las características concretas, para cada una de las sustancias utilizadas en los ensayos anteriormente descritos, se indican, de forma resumida, en la tabla siguiente:

TABLA I. Tiempos, temperatura (T^a amb.), volumen utilizado y tipo de anticuerpo (Ac) empleados en cada una de las sustancias estudiadas (Ag).

Ag	T ^a amb.(°c)	tiempos (min)	Volumen (µL)	Ac
Insulina	22	2,5,10,15,20, 25 y 30	500 µL	tubo recu.
DHEAs	22	2,5,10,15,20, 25,30 y 45	500 µL	tubo recu.
Osteocalcina	21	2,5,10,15,20, 30,40 y 50	100 µL	100 µL
PTHc	21	10,20,30,45, 60,90,120, 150 y 180	200 µL	200 µL

Como contador de radiación gamma se ha empleado el L.K.B. Wallac. 1277 Gammamaster, automatic gamma counter.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evitar una excesiva extensión en la exposición de los resultados se muestra, como ejemplo de lo que se ha obtenido en todos los casos, únicamente las figuras correspondientes a las concentraciones relativas más altas de la insulina (como ejemplo de RIA en fase sólida) y de la c-PTH (como RIA en disolución). Del mismo modo, sólo se representa una figura del estudio de la influencia de la temperatura correspondiente a la insulina y la figura de las cuatro concentraciones relativas mayores de anticuerpo anti cPTH como ejemplo del estudio de la cinética para diferentes concentraciones de anticuerpo.

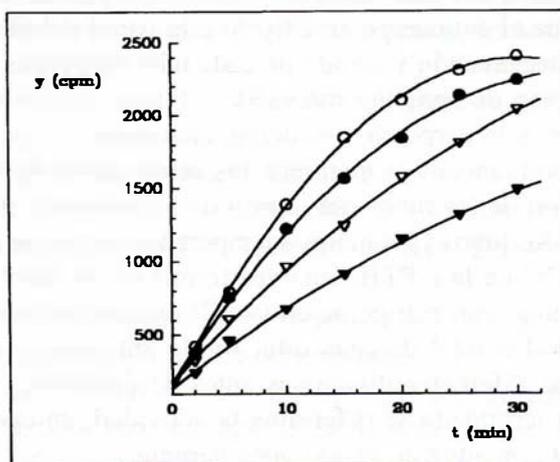


Figura 1. Se representa la actividad medida (y en cpm) a los tiempos estudiados (t en minutos) para las concentraciones relativas de insulina (○ C = 100, ● C = 80, ▽ C = 60, ▼ C = 40).

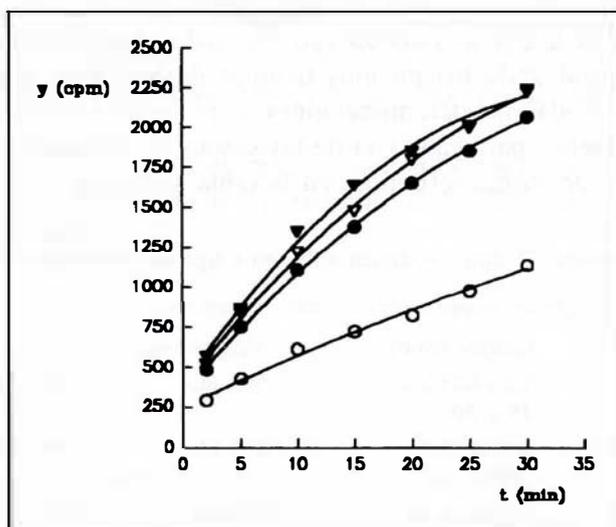


Figura 2. Se representa la actividad medida (y en cpm) a los tiempos estudiados (t en minutos) para las cuatro temperaturas (▼ T = 40°C, ▽ T = 30°C, ● T = 20°C, ○ T = 10°C) para la concentración relativa de 100 en el caso de la insulina.

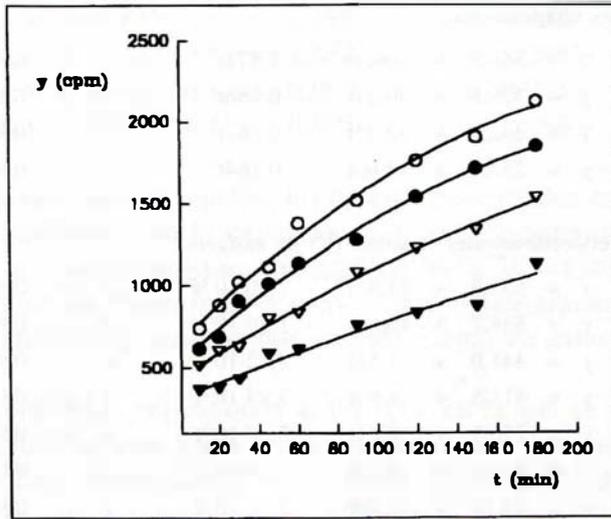


Figura 3. Se representa la actividad medida (y en cpm) para las concentraciones relativas de cPTH (○ C = 100, · C = 80, ▽ C = 60, ▼ C = 40) frente al tiempo de incubación (t en minutos).

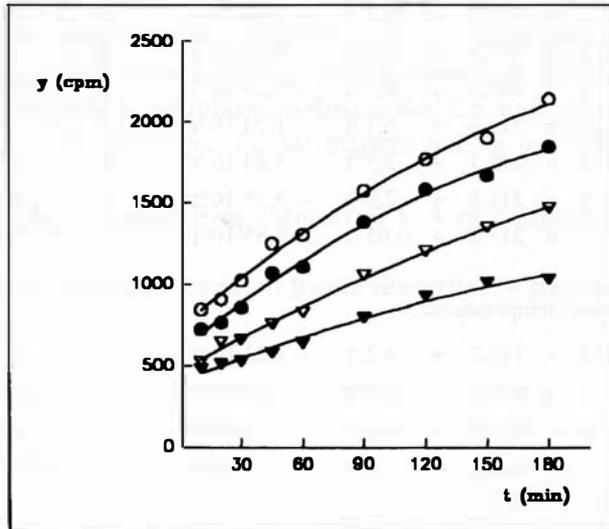


Figura 4. Se representa la actividad medida (y, en cpm) para las concentraciones relativas de anticuerpo anti cPTH (○ C = 100, · C = 80, ▽ C = 60, ▼ C = 40) frente al tiempo de incubación (t, en minutos).

Las ecuaciones correspondientes a los ajustes para cada uno de los procesos estudiados se indican a continuación (y = actividad en cpm y t = tiempo en en minutos). Sólo se muestran las correspondientes a la insulina y la cPTH para evitar un exceso de ecuaciones.

Insulina; cinética para diferentes concentraciones (C) de antígeno:

C = 100	$y = 129,7 + 149,6t - 2,474t^2$	r = 0,9996
C = 80	$y = 174,6 + 118,6t - 1,658t^2$	r = 0,9990
C = 60	$y = 174,4 + 84,32t - 0,752t^2$	r = 0,9995
C = 40	$y = 135,4 + 59,78t - 0,495t^2$	r = 0,9993
C = 30	$y = 94,91 + 55,38t - 0,731t^2$	r = 0,9991
C = 20	$y = 127,3 + 30,92t - 0,305t^2$	r = 0,997
C = 10	$y = 65,80 + 20,38t - 0,210t^2$	r = 0,998
C = 5	$y = 46,83 + 13,69t - 0,145t^2$	r = 0,9990

Insulina; cinética para diferentes temperaturas:

T = 40°C	y = 388,7 + 104,1t - 1,471t ²	r = 0,997
T = 30°C	y = 379,6 + 90,28t - 0,986t ²	r = 0,9990
T = 20°C	y = 342,9 + 82,75t - 0,867t ²	r = 0,9995
T = 10°C	y = 253,1 + 33,60t - 0,164t ²	r = 0,996

cPTH; cinética para diferentes concentraciones relativas (C) de antígeno:

C = 100	y = 655,9 + 11,93t - 2,20·10 ⁻² t ²	r = 0,995
C = 80	y = 534,7 + 10,67t - 1,89·10 ⁻² t ²	r = 0,995
C = 60	y = 441,0 + 7,55t - 8,82·10 ⁻³ t ²	r = 0,997
C = 40	y = 313,5 + 4,89t - 3,89·10 ⁻³ t ²	r = 0,983
C = 30	y = 256,1 + 4,01t - 5,30·10 ⁻³ t ²	r = 0,996
C = 20	y = 145,6 + 4,29t - 1,10·10 ⁻² t ²	r = 0,992
C = 10	y = 99,19 + 2,40t - 5,52·10 ⁻³ t ²	r = 0,988
C = 5	y = 69,44 + 1,21t - 2,46·10 ⁻³ t ²	r = 0,995

cPTH; cinética para diferentes concentraciones relativas (C) de anticuerpo:

C = 100	y = 735,3 + 10,76t - 1,74·10 ⁻² t ²	r = 0,997
C = 80	y = 595,7 + 10,29t - 1,90·10 ⁻² t ²	r = 0,996
C = 60	y = 467,8 + 7,08t - 8,10·10 ⁻³ t ²	r = 0,997
C = 40	y = 402,9 + 4,98t - 7,28·10 ⁻² t ²	r = 0,991
C = 30	y = 317,6 + 5,13t - 1,23·10 ⁻² t ²	r = 0,991
C = 20	y = 295,1 + 2,37t - 3,84·10 ⁻⁴ t ²	r = 0,998
C = 10	y = 211,8 + 2,04t - 3,35·10 ⁻³ t ²	r = 0,987
C = 5	y = 213,2 + 0,657t - 3,85·10 ⁻² t ²	r = 0,980

cPTH; cinética para diferentes temperaturas:

10°C	y = 713,7 + 4,22t - 1,23·10 ⁻² t ²	r = 0,998
20°C	y = 851,3 + 5,50t - 2,28·10 ⁻² t ²	r = 0,9990
30°C	y = 861,8 + 14,12t - 3,11·10 ⁻² t ²	r = 0,978
40°C	y = 1111 + 2,47t - 1,38·10 ⁻² t ²	r = 0,510

Puede observarse que, en general, la actividad unida al anticuerpo (y) sigue, con respecto al tiempo una relación de la forma:

$$y = a + bt + ct^2$$

La derivada de "y" con respecto al tiempo, en t = 0, da la velocidad inicial del proceso.

$$v = (dy/dt) = b + 2ct$$

$$v_0 = (dy/dt)_{t=0} = b$$

Las velocidades iniciales de los procesos estudiados manteniendo constante la concentración de anticuerpo aumentan con la concentración de antígeno. Este aumento se produce de manera inferior a la que cabría esperar si se cumpliera una proporcionalidad directa entre velocidad inicial y concentración de antígeno. Ello sugiere que dichos procesos no responden a la cinética de orden uno con respecto al antígeno.

Con objeto de determinar el orden aparente, se realizan ajustes de ln v frente a ln C (siendo v la velocidad inicial y C la concentración relativa de antígeno), cuya pendiente se identifica con el orden. Las correspondientes ecuaciones obtenidas y sus coeficientes de correlación son:

Insulina:	$\ln v = 0,805 \ln C + 1,198$	$r = 0,992$
DHEAs:	$\ln v = 1,087 \ln C + 1,852$	$r = 0,995$
Osteocalcina:	$\ln v = 0,924 \ln C - 0,069$	$r = 0,993$
PTH c-terminal:	$\ln v = 0,724 \ln C - 0,905$	$r = 0,984$

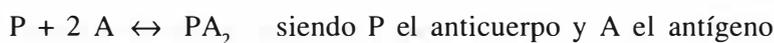
Puede observarse que, salvo una excepción, los órdenes encontrados con respecto al antígeno son inferiores a uno, lo que concuerda con lo expuesto en el párrafo anterior.

Este hecho sugiere un comportamiento correspondiente a la ecuación de Michaelis-Menten, que como es sabido, predice un orden igual a cero a altas concentraciones e igual a uno a bajas concentraciones, siendo intermedio entre ambos valores (como en estos casos) a concentraciones medias.

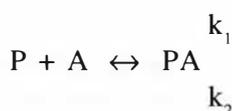
La excepción antes comentada corresponde al DHEAs, en la que se obtiene un orden prácticamente igual a uno, que podría deberse a una concentración baja de antígeno, con lo que el grado de saturación sería pequeño. Esta suposición es concordante con el hecho de que, para todas las concentraciones estudiadas, se une prácticamente el 80% de la actividad total a tiempos suficientemente largos como para suponer que el proceso se encuentra próximo al equilibrio.

POSIBLE MECANISMO DE REACCIÓN

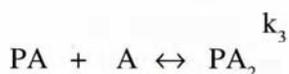
Para la interpretación de los resultados y su reflejo en un posible mecanismo de reacción se debe recordar que los anticuerpos utilizados en estos cuatro casos han sido de clase IgG policlonales (antisueros) fijados sobre la superficie del tubo o en disolución. Las moléculas de IgG son monoméricas, y por tanto, contienen dos sitios de unión. De tal manera que la reacción sería de la forma:



En una primera etapa, el antígeno ocupa de forma reversible y parcial los sitios de unión según el proceso:



En una segunda etapa se fija otra molécula de antígeno:



Las ecuaciones diferenciales de velocidad para las especies PA y PA₂ pueden escribirse como:

$$\frac{d(PA)}{dt} = k_1 C(1-\theta) - k_2 \theta - k_3 \theta$$

$$\frac{d(PA_2)}{dt} = k_3 \theta$$

donde C es la concentración de antígeno y θ el grado de saturación, o fracción de sitios ocupados. La primera ecuación de velocidad es análoga a la del clásico modelo de Langmuir para la adsorción de gases por sólidos, que equivale también a la fijación de un ligando a un sitio de unión de una macromolécula. Si se supone estado estacionario para PA, resultaría:

$$k_1 C(1-\theta) - k_2 \theta - k_3 \theta = 0$$

$$\theta = \frac{k_1 C}{k_1 C + k_2 + k_3} = \frac{C}{C + \frac{k_2 + k_3}{k_1}} = \frac{C}{C + K}$$

$$K = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

En los ensayos experimentales se mide la actividad, en cuentas por minuto, debidas al antígeno unido al anticuerpo (a través del propio antígeno marcado con ^{125}I o con un segundo anticuerpo marcado que se fija al antígeno unido al anticuerpo). Llamando, como se ha indicado anteriormente, "y" a dichas cpm, puede escribirse que:

$$y = \alpha [(PA) + 2(PA_2)]$$

Ecuación que expresa que "y" es proporcional (á constante de proporcionalidad) a la concentración total de antígeno unida al anticuerpo. El coeficiente "2" se debe a que el complejo PA_2 contiene dos moléculas de A.

La velocidad medida en este trabajo es dy/dt en el instante inicial. Por tanto:

$$v = \frac{dy}{dt} = \alpha \frac{d(PA)}{dt} + 2\alpha \frac{d(PA_2)}{dt}$$

Al considerar estado estacionario para PA , resulta:

$$v = 2\alpha k_3 \theta = \frac{2\alpha k_3 C}{C + K} = \frac{k_4 C}{C + K} \quad (k_4 = 2 \alpha k_3)$$

La ecuación de velocidad obtenida supone estado estacionario para el complejo PA . Ello sugiere que la segunda etapa es más rápida que la primera. Tal hecho se supone implícitamente al expresar que la velocidad de la segunda etapa es directamente proporcional al grado de saturación, lo cual lleva a pensar en un mecanismo semejante a la autocatálisis.

Los resultados obtenidos en los casos estudiados son, en general, concordantes con el mecanismo propuesto. Se encuentran velocidades iniciales que aumentan con la concentración de antígeno, pero sin seguir una relación de proporcionalidad directa. Los órdenes aparentes son inferiores a uno. Sin embargo, los ajustes a Linewaver-Burk son defectuosos. Ello puede explicarse por la heterogeneidad de los anticuerpos policlonales utilizados en estos casos. Si bien, podría suponerse que cada clon de anticuerpos sigue un comportamiento análogo al descrito, ya que en otros estudios (8) que se han realizado con anticuerpos monoclonales se han obtenido resultados muy similares a los descritos para estas sustancias incluyendo además unos adecuados ajustes a Linewaver-Burk.

El orden de reacción respecto al anticuerpo se ha estudiado en dos casos: osteocalcina y PTHc-terminal. En estos casos el anticuerpo y el antígeno se encuentran disueltos, por lo que la reacción tiene lugar en una única fase. La relación entre velocidad inicial (v) y concentración relativa (C) viene dada por:

Osteocalcina:	$\ln v = 0,646 \ln C + 1,197$	$r = 0,966$
cPTH:	$\ln v = 0,895 \ln C - 1,648$	$r = 0,981$

De acuerdo con el mecanismo propuesto cabría esperar un orden igual a uno con respecto al anticuerpo. La discordancia obtenida en los casos comentados, unida a los coeficientes de correlación

relativamente bajos obtenidos para estos casos, podría explicarse por el hecho de que los anticuerpos utilizados en estas dos sustancias son policlonales, y por tanto, con un cierto grado de heterogeneidad, sin embargo en otros estudios (8) realizados con anticuerpos monoclonales se han obtenido órdenes de reacción muy próximos a uno.

Se ha estudiado la influencia de la temperatura sobre la velocidad de la reacción antígeno-anticuerpo manteniendo constantes las concentraciones de ambas especies. Este estudio se ha realizado representando gráficamente $\ln v$ frente al inverso de la temperatura, $1/T$. Tal representación sería equivalente a una gráfica de $\ln K$ frente a $1/T$ si la ecuación de velocidad fuese de la forma $v = K \cdot C^n$, ya que, en este caso, y teniendo en cuenta la ecuación de Arrhenius, resultaría:

$$v = A \cdot e^{-E_a/RT} \cdot C^n = A' \cdot e^{-E_a/RT}$$

Puesto que se trabaja a concentración constante, podría englobarse el producto $A \cdot C^n$ en una nueva constante, A' . Si se toma logaritmos queda:

$$\ln v = \ln A' - E_a/RT$$

Los ajustes obtenidos para esta ecuación son, en general, deficientes, tal como puede observarse en las ecuaciones siguientes, lo cual confirma que la ecuación de velocidad no es del tipo $v = K \cdot C^n$.

$\ln v = 14,78 - 3130 (1/T)$	$r = -0,890$	(Insulina)
$\ln v = 12,86 - 2034 (1/T)$	$r = -0,955$	(DHEAs)
$\ln v = 14,10 - 2434 (1/T)$	$r = -0,918$	(Osteocalcina)
$\ln v = 19,50 - 5145 (1/T)$	$r = -0,945$	(PTH c-terminal)

Teniendo en cuenta que la ecuación que se propone para explicar el mecanismo de reacción es de tipo michaeliano, y por tanto, contiene dos constantes, cada una de las cuales depende de la temperatura, resulta explicable la deficiencia de los ajustes.

CONCLUSIONES

1.- La cinética de la reacción antígeno-anticuerpo en los casos estudiados (con una excepción) presenta un orden aparente inferior a uno para el antígeno.

2.- El orden aparente inferior a uno obtenido para el antígeno se interpreta aceptando una cinética de tipo Michaelis-Menten.

3.- Este tipo de cinética concuerda con un mecanismo en dos etapas de velocidades diferentes. En la primera, una molécula de antígeno ocupa uno de los lugares de unión con el anticuerpo a una determinada velocidad y en la segunda etapa, se ocupa el segundo lugar con otra velocidad distinta.

4.- El mecanismo propuesto es también coherente con el deficiente ajuste obtenido al representar ($\ln v$) frente a ($1/T$).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ROITT I. Inmunología esencial. (1988). 6ª edición. Editorial Jims.
- (2) ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. Inmunología. (1997). 4ª edición. Editorial Salvat.
- (3) GETZOFF Ed, TAINER J.A. and LERNER R.A. **43**: 1-98. The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. *Adv Immunol*, (1988).
- (4) PARKER CW. (1971). Nature of immunological responses and antigen-antibody interaction. in: *Principles of competitive protein-binding assays*, Odell WD, Daughaday JB, JB Lippincott Company.

- (5) BRADEN BC, DALL'ACQUA W, EISENSTEIN E, FIEDELS BA, GOLDBAUM FA, ET AL. (1995). Protein motion and lock and key complementarity in antigen-antibody reactions. *Pharm Acta Helv.* **69**(4): 225-30.
- (6) Anton Fos GM, Moreno Frigols JL, Salabert Salvador MT, Mut Ronda S, Perz Gimenez F. (1991). Estudio de la cinética de reacción entre el ^{125}I -Cortisol y su anticuerpo específico en fase sólida. *An Real Acad Farm.* **57**(1): 43-50.
- (7) GALLEGO GARCIA MC, MORENO FRIGOLS JL, CIUDAD PLATERO J. (1991). Estudio cinético de la reacción antígeno anticuerpo que tiene lugar en la vañoración de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) mediante radioinmunoanálisis (RIA). *An Real Acad Farm.* **57**: 581-94.
- (8) SAN MARTÍN CIGES, E. (1996). Estudio de la cinética y el equilibrio de algunas reacciones antígeno-anticuerpo. (1991). Tesis Doctoral.