

**UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y
ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**"AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL ANTIGENO
"A" DEL SISTEMA ABO, MEDIANTE LA COLUMNA
CROMATOGRAFICA DE AFINIDAD"**

**TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD: INMUNOLOGIA**

Presenta: M. C. P. JUAN SALAZAR REYNA

MONTERREY, N. L.

TM

Z665

FM

S.a.

S24



1020071036

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSTGRADO.

"AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL ANTIGENO A DEL SISTEMA
ABO, MEDIANTE LA COLUMNA CROMATOGRAFICA DE AFINIDAD".

TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD: INMUNOLOGIA

PRESENTA : M.C.P. JUAN SALAZAR REYNA.

MONTERREY, N.L.

TM
Z6658
FM
S.A.
S24



FONDO TESIS

163681

NOMBRE DEL ASESOR DE TESIS: DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA.

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO: FACULTAD DE MEDICINA DE
LA U.A.N.L., DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA.

INSTITUCION QUE AUSPICIO LA TESIS: FACULTAD DE MEDICINA DE -
LA U.A.N.L., A TRAVES DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA.

COMISION DE TESIS

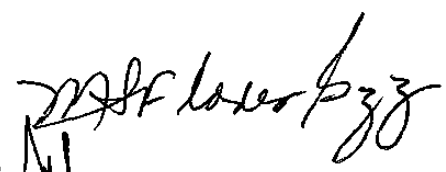
PRESIDENTE : DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA.



SECRETARIO : M.C. IRMA SALINAS.



1* VOCAL : DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES.



2* VOCAL : DR. MARIO ALBERTO GARZA E.



3* VOCAL : DRA. ALMA YOLANDA ARCE M.

Dedico este trabajo de Tesis a:
Mis padres, a mis maestros y en
especial al Dr. Mario César Sa-
linas Carmona, un ejemplo a se-
guir.

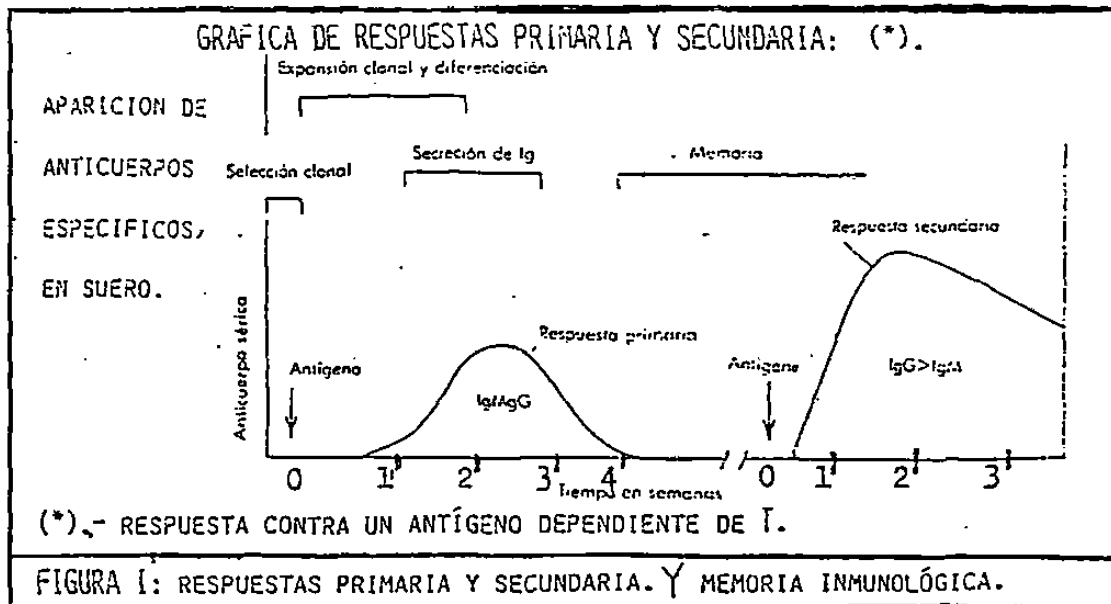
I N D I C E :

<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
INTRODUCCION	1
JUSTIFICACION	12
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	29
DISCUSION	38
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43

I N T R O D U C C I O N

En 1900, Karl Landsteiner descubrió que el suero de la mayoría de los individuos contenía sustancias que aglutinaban y lisisaban los glóbulos rojos de muchos otros seres humanos. Tales reacciones de aglutinación y lisis fueron útiles para diferenciar en los humanos, cuatro grupos sanguíneos principales que se designaron como A, B, AB, y O (1, 3, 4, 6, 9, 20).

Los elementos responsables de la hemaglutinación, una de las manifestaciones visibles de la reacción antígeno-anticuerpo, son los anticuerpos; estos forman parte de las proteínas del suero y son similares estructuralmente entre sí. A los anticuerpos, también se les ha llamado Inmunoglobulinas y son sintetizadas por las células plasmáticas. Los anticuerpos circulan por el suero y los líquidos tisulares y tienen la capacidad de unirse a su contraparte, un antígeno determinado. La reacción antígeno anticuerpo es específica, reversible y espontánea, además de que se presenta de una manera rápida. La unión de los anticuerpos con sus antígenos específicos se lleva a cabo entre el sitio activo del anticuerpo y el determinante antigénico del antígeno (ver figuras 1 y 2).



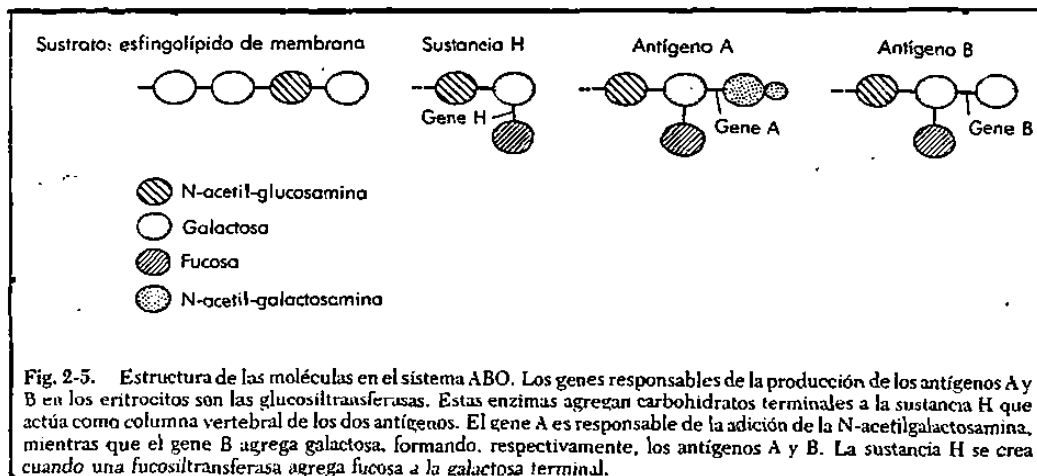
La reacción entre los anticuerpos y los eritrocitos (glóbulos rojos) es la base inmunohematológica para diferenciar los cuatro grupos sanguíneos humanos A, B, AB, y O; esto se lleva a cabo haciendo reaccionar los antígenos que de manera natural se encuentran sobre la superficie de los eritrocitos, y la existencia de anticuerpos específicos para tales antígenos y así es factible identificar también: anticuerpos anti-A que son los que reaccionan únicamente con el antígeno A; y anticuerpos anti-B, específicos para el grupo sanguíneo B del sistema ABO (ver tabla 1). (1, 3, 4, 7, 9, 12).

A la clasificación de los grupos sanguíneos humanos hecha por Landsteiner se llamó sistema ABO y los factores que determinan la presencia de antígenos y/o anticuerpos referentes a los grupos sanguíneos son de carácter hereditario. El sistema ABO está constituido por tres genes alélicos: A, B, y O. Los genes de los antígenos A y B están relacionados con la síntesis de enzimas responsables de la adición de residuos de carbohidratos simples:

A).- N-Acetil-Galactosamina para el grupo sanguíneo A.

B).- D-Galactosa para el grupo sanguíneo B.

Estos monosacáridos son unidos covalentemente a una glucoproteína antigénica básica con un azúcar terminal, la L-Fucosa, esta molécula se encuentra en la superficie del eritrocito y que es conocida como sustancia H (ver figura 2) y sirve como precursor. A este precursor luego se le adiciona la N-Acetil-Galactosamina para dar la especificidad A o la D-galactosa para dar la especificidad del grupo sanguíneo B (figura II).



De esta forma tenemos que los determinantes antigénicos de los cuatro grupos sanguíneos (A, B, AB, y O) son el resultado de tres genes:

D, A, y B

Los genes A y B dominan al D, los genotipos AA y AO, así como los BB y BO son indistinguibles serológicamente (mediante análisis sanguíneos) y por esa razón se clasifican como fenotipos A y B respectivamente y por lo tanto solo se reconocen cuatro fenotipos:

A, B, AB y O

Aunque en realidad pueden ocurrir hasta seis genotipos: (ver tabla I).

OO; AA y AO; BB y BO; AB (1, 5, 9, 20, 25)

En los seres humanos con los fenotipos A o B, los antígenos A y B están presentes en la mayoría de las células del organismo, incluyendo leucocitos y plaquetas. Además entre el 70% y el 80% de la población A o B posee la capacidad de secretar tales antígenos en forma soluble en agua y se encuentra a los antígenos A o B en líquidos corporales, Por ejemplo: plasma, saliva, semen y sudor y esto es importante en Medicina Forense (5, 15, 23, 25).

Los anticuerpos que existen en forma natural para los antígenos A y B o para ambos se detectan en el plasma de sujetos cuyos eritrocitos carecen de los antígenos correspondientes (ver tabla I). Para esto se utilizan las pruebas de hemaglutinación.

GRUPOS SANGUINEOS HUMANOS. SISTEMA ABO:			
FENOTIPO:	GENOTIPO:	ANTIGENO EN LA SUPERFICIE DEL ERITROCITO.	ANTICUERPOS EN EL SUERO:
B O	OO	NINGUNO.	ANTI-A y ANTI-B.
A	AA o AO	A.	ANTI-B.
B	BB o BO	B.	ANTI-A.
AB	AB	A Y B.	NINGUNO.

TABLA 1. GRUPOS SANGUINEOS HUMANOS, ANTIGENOS EN ERITROCITOS Y ANTICUERPOS NATURALES EN SUERO.

La hemaglutinación directa es una técnica que hace visible la reacción antígeno/anticuerpo, se hace mezclando los anticuerpos, antigrupos sanguíneos (A o B) con los glóbulos rojos específicos y esta reacción depende fundamentalmente de dos factores:

- 1).- Cantidad de moléculas de antígeno que tiene el glóbulo rojo sobre su superficie externa.
- 2).- Concentración de anticuerpos específicos en el suero analizado

La prueba de inhibición de la hemaglutinación se utiliza en los laboratorios de investigación pero no en la rutina clínica, esta prueba consiste en hacer reaccionar a los anticuerpos anti-A o anti-B con los antígenos A o B solubles, y después mezclarlos con los glóbulos rojos correspondientes. La técnica simplificada consiste en:

- 1).- Se obtienen los anticuerpos anti-antígeno A (como ejemplo).
- 2).- Se les agrega antígeno A soluble.
- 3).- Con lo anterior se satura los sitios activos de los anticuerpos (sitios de reacción específica contra el antígeno), después de esto:
- 4).- Se agregan a la misma mezcla los glóbulos rojos del grupo sanguíneo A y

5).- No hay hemaglutinación porque los anticuerpos están saturados por el antígeno A y por lo tanto están bloqueados para reaccionar y se inhibe la hemaglutinación. Esta técnica nos es útil para titular el antígeno.

Es posible detectar en la superficie de los glóbulos rojos, en hepatocitos, en las células del bazo, en células renales, y en células pulmonares (1, 3, 5) la presencia de los antígenos A y B del sistema ABO.

Además de los sitios referidos en el párrafo anterior, al antígeno A y al B también se les puede detectar en secreciones dado que del total de individuos de grupo sanguíneo A del sistema ABO, del 70% al 80% tienen la capacidad de secretar tal antígeno en forma soluble en agua y se encuentra el antígeno en secreciones tales como saliva, fluido seminal, jugo gástrico, sudor y en quistes mucinosos de ovario (5, 15, 23, 25).

La sustancia A o antígeno A en forma particulada e insoluble en agua fue caracterizada como un glucolípido que tiene ácidos grasos, esfingosina y mucopéptido mientras que los resultados de los análisis hechos al antígeno A en su forma soluble indicaron que en su estructura hay de 80% a 90% de carbohidratos, con los sacáridos fundamentales N-Acetil-Galactosamina y Fucosa (ver

figura 3) en el extremo libre e inmunodominante, y un 10% a 15% de proteína (constituida principalmente por serina, treonina y prolina) y a este polipéptido se ancla el sacárido, de lo que resulta un proteoglucano (10, 11, 12, 13).

El antígeno A, en sus dos formas, particulado y soluble, tiene una gran heterogeneidad en cuanto a peso molecular ya que la longitud de la fracción de sacáridos es muy variable y es la responsable del amplio rango de pesos moleculares que va desde 20,000 daltones, hasta varios millones de daltones (19, 24).

Al hacer un análisis de los antecedentes de las investigaciones sobre los grupos sanguíneos, se encuentra que : (19).

Schiff y Adelberger (1924), Landsteiner y Van Der Scheer (1925), Witebsky (1927) y Eisler y Moritsh (1928). Trataron de aislar el antígeno A de los glóbulos rojos y determinaron su estructura como lipídica.

Brahn y Cols. (1932), Jopes y Norlin (1934), Freudenberg y Eichel (1935), Bray y Cols. (1946). Aislaron los antígenos A y B de la orina, mucosa gástrica, de quistes mucinosos de ovario e iniciaron el estudio de la estructura de estos antígenos solubles en agua.

Kabat (1949). Determinó la participación del residuo fucosil en la actividad de los antígenos A, B y H. La determina---

ción que hizo fué mediante hidrólisis controladas.

Musamune y Siojima (1951), Tokura (1952 y 1953), Yamakawa (1953), Musamune y Cols. (1954), Gibbons y Cols (1955). Dieron la evidencia de que son azúcares diferentes los que se encuentran en las glucoproteínas de los grupos sanguíneos A y B.

Watkins y Morgan (1952 y 1953), Kabat y Leskowitz (1955), Cole y Morgan (1956) y Painter y Cols. (1962). Mediante la técnica de Inhibición con haptenos demostraron que los determinantes de los antígenos A, B, H eran los siguientes:

- A).- Alfa-L-Fucosil: Para el antígeno H.
- B).- Alfa-N-Acetil-Galactosamina. 1-3-Galactosa: Para el antígeno A.
- C).- Alfa-Galactosa. 1-3-Galactosa: Para el antígeno B.

Heidelbergger encontró que la antigenicidad de los polisacáridos dependía del peso molecular, y esto lo demostró con productos bacterianos. Después Kabat, con otro sistema antígeno-anticuerpo, con polisacáridos derivados de la dextrana nativa, también encontró que existe una dependencia entre la antigenicidad y el peso molecular de los polisacáridos. En el caso del antígeno A del sistema ABO de los grupos sanguíneos humanos, el contenido de carbohidratos es mayor del 80 % del peso total de la molécula y por ello debemos considerarlo como un polisacárido.

El peso molecular del antígeno A soluble que se ha reportado, varía, desde los 20,000 hasta varios millones de daltones, esta heterogeneidad esta dada por el contenido de las cadenas de oligosacáridos unidos al esqueleto central de aminoácidos. Es probable que la inmunogenicidad del antígeno A soluble también dependa de su peso molecular, sin embargo no existen estudios publicados a este respecto. En este trabajo se pretende aislar y purificar el antígeno A por cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos anti-A "inmovilizados". Con esta técnica aseguramos la calidad del antígeno A y luego con la técnica de inhibición de la hemaglutinación se obtendrá el título del antígeno A. La inhibición de la hemaglutinación en este caso esta dada por el número de determinantes antigénicos involucrados, y esto a su vez está en función del peso molecular.

El antígeno A soluble que se obtenga de esta forma, en teoría, deberá ser inmunogénico y permitirá realizar estudios para averiguar la relación entre el peso molecular y la capacidad inmunogénica.

El fundamento de purificación del antígeno A mediante la Cromatografía de afinidad se basa en la reacción antígeno/anticuerpo, la cual es rápida, específica, reversible y espontánea (1, 2, 4, 5, 9). La cromatografía de afinidad tiene dos fases:

- 1).- Fase Estacionaria: Está constituida por anticuerpos específicos e insolubilizados con glutaraldehído. (ver Material y Métodos).
- 2).- Fase Móvil: Solvente amortiguador fosfato en el que se encuentra el antígeno A que se desea purificar y otros elementos contaminantes sin relación con éste. (ver Material y Métodos).

Al pasar la mezcla en que se encuentra el antígeno A (Fase móvil) por la fase estacionaria, por afinidad se retiene únicamente el antígeno; los contaminantes no reaccionan con los anticuerpos y por lo tanto se eluyen del inmoadsorbente (Fase estacionaria).

La Cromatografía de afinidad se puede realizar utilizando los anticuerpos anti-A de manera natural (sin inmunización previa) se encuentran en sujetos del grupo sanguíneo B (ver tabla I), y para mejorar el rendimiento de este método de análisis se puede aprovechar una característica de la respuesta Inmune: La inducibilidad: inmunizando conejos con el antígeno A se induce una respuesta Inmune secundaria, la que proporciona una mayor concentración de anticuerpos anti-antígeno A. Para obtener títulos mas altos de anticuerpos en los conejos, es importante lo siguiente:

- 1).- Inmunizaciones repetitivas por vía parenteral.

2).- Uso de adyuvantes: Potenciadores de la Respuesta Inmune, como lo es el adyuvante completo o incompleto de Freund.

Una vez logrado el estímulo antigénico, se obtienen los anticuerpos anti-antígeno A y con ellos se monta una Cromatografía de afinidad de mayor rendimiento, por tener una mayor concentración de anticuerpos específicos.

La Cromatografía de afinidad hecha con anticuerpos anti-antígeno A, naturales o inducidos, permitirá purificar en un solo paso el antígeno A en base a la reacción entre el determinante antigénico de la molécula A y el sitio activo de los anticuerpos anti-antígeno A del sistema ABD.

J U S T I F I C A C I O N

El antígeno A soluble del sistema ABO se encuentra distribuido en proteoglicanos de un rango amplio de pesos moleculares que van desde 20 kilodaltones hasta varios millones de daltones.

Esta heterogeneidad en el peso molecular ha dificultado el conocimiento de la relación que existe entre la estructura química del antígeno A del sistema ABO en su forma soluble y su capacidad para inducir una respuesta anti-A.

Por lo anterior, no hay un antígeno A soluble del sistema ABO con estructura de referencia basada en la actividad inhibitoria de la hemaglutinación que sea útil para el análisis In vitro de la relación existente entre la estructura química y el peso molecular, con la antigenicidad.

HIPOTESIS

El antígeno A, aislado en base a sus determinantes antigénicos inmunodominantes deberá ser mejor inmunógeno que el antígeno A aislado solamente por métodos físicos y/o químicos.

MATERIAL Y METODOS

1.- OBTENCION DEL ANTIGENO A "SOLUBLE":

El antígeno A crudo (no purificado) fue donado por el Departamento de Inmunología del Hospital Universitario, U.A.N.L.

El antígeno A crudo se sometió a la autoclave a 15 atmósferas de presión y a una temperatura de 121°C por 2 horas, posteriormente se sedimentó por centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se recuperó y se etiquetó como antígeno A soluble del sistema ABO (6, 11, 12, 17).

2.- OBTENCION DEL SUERO HIPERINMUNE ANTI-A:

Se obtuvo el suero hiperinmune anti-A a partir del plasma de donadores voluntarios que habían sido inmunizados con antígeno A soluble del sistema ABO.

3.- AISLAMIENTO DE GAMMAGLOBULINAS (ANTICUERPOS) ANTI-A:

Los anticuerpos anti-A se obtuvieron precipitándolos del suero hiperinmune anti-A utilizando el método de precipitación por sales, usamos sulfato de amonio preparado como solución saturada y a una concentración final de 33%.

El volúmen de suero a procesar se colocó en un vaso de precipitado a 4°C. y se le agregó la solución saturada de sulfato de amonio, gota a gota, bajo agitación lenta con agitador magnético. El sulfato de amonio en solución saturada se agregó a 12 gotas por minuto hasta llegar a una concentración final del 33%. Al alcanzar esta concentración se dejó en agitación suave por 30 minutos, después de este lapso se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, el precipitado se recuperó y se reconstituyó al volúmen original del suero con solución salina al 0.85%, pH 7.4. Se repitió el procedimiento total por tres ocasiones y en la última reconstitución, el volúmen final fue el 25% del volúmen original.

El exceso de sal (sulfato de amonio) de las gammaglobulinas precipitadas se eliminó por diálisis exhaustiva, contra una solución salina-borato, hasta que el líquido de diálisis mezclado con un volúmen igual de cloruro de bario ya no dió la formación de precipitado de sulfato de bario (21, 22).

4.- INSOLUBILIZACION DE GAMMAGLOBULINAS CON ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENO A, UTILIZANDO GLUTARALDEHIDO COMO AGENTE ACOPLADOR.

Se utilizó el glutaraldehído como agente acoplador de anticuerpos los cuales quedaron insolubilizados. Los anticuerpos insolubilizados con glutaraldehído fueron estables en urea y

dodecil-sulfato de sodio; este método es rápido, reproducible y puede utilizarse para todas las proteínas con grupos aminos libres (14, 26).

Método general de insolubilización con glutaraldehído:

Se dializaron las gammaglobulinas y se ajustaron a una concentración de 25 mg/ml., la diálisis fué contra buffer-fosfato, pH7.4 (14, 22, 26). Se prepararon unas soluciones de glutaraldehído al 2% y 5% y se agregó 0.1 ml por cada ml. de proteína a la concentración mencionada. La polimerización fué casi instantánea y el gel se dejó por 3 horas a temperatura ambiente (25°C.) para completar la insolubilización. El material insolubilizado se dispersó en mortero y se lavó con el buffer fosfato hasta que la densidad óptica del sobrenadante de los lavados fuera menor de 0.050 a 280 nm.

El grado de insolubilización de las proteínas en este caso de las gammaglobulinas a concentración constante, depende de la concentración del glutaraldehído añadido, por esto se probaron concentraciones de glutaraldehído de 2.5%, 2.0%, 1.5% y 1.0%.

5.- PURIFICACION DEL ANTIGENO A POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD:

La cantidad del antígeno A del sistema ABO se determinó mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación:

La muestra de antígeno se diluyó con solución salina al 0.85%, pH7.4 desde 1:4 a 1:512. De cada una de las diluciones se tomó 0.1 ml y se mezcló en un tubo de ensayo con suero comercial anti-A (U.A.N.L.) y se dejó a temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos. Pasando este lapso, se agregó a cada tubo 0.1 ml de glóbulos rojos A al 2%, se mezcló y se centrifugó a 3500 rpm. por 45 segundos. El título del antígeno es la recíproca de la dilución máxima de éste, a la cual aún inhibe la hemaglutinación. El antígeno A soluble utilizado en todos los experimentos siempre fue de actividad inhibitoria de la hemaglutinación de 1:512, en alícuotas de 2.4 ml en amortiguador de fosfato a pH7.4.

La fase estacionaria de la Cromatografía de afinidad se preparó con gammaglobulinas en solución (46.04 mg/ml), en alícuotas de 14 ml ésta equivale a 644.5 mg de proteínas (gammaglobulinas) por columna. En todas las columnas cromatográficas de afinidad se mantuvo la proporción proteica anterior y el rendimiento de las columnas se valoró variando la concentración final del agente insolubilizador (el glutaraldehído).

Para purificar el antígeno A de la mezcla soluble en que se encuentra (llamada antígeno A soluble o no purificado) al inmuoadsorbente se agregó el antígeno A crudo, 2.4 ml, con un título de inhibición de la hemaglutinación de 1:512 a la columna de afinidad y se dejó en incubación a temperatura ambiente (25°C) por

2 horas y a 40C por 2 horas mas. Estas variaciones en la temperatura se debieron a que a temperatura ambiente reacciona mejor el anticuerpo IgG, mientras que a 40C lo hace mejor el anticuerpo IgM. Ambos anticuerpos se encuentran en las gammaglobulinas insolubilizadas y constituyen la fase estacionaria de la columna cromatográfica de afinidad. Después de la adsorción del antígeno A en la cromatografía de afinidad, se lavó el inmunoadsorbente con 500 ml. de amortiguador de fosfatos a pH7.4. Este lavado se hizo para eliminar todo el material no retenido por el inmunoadsorbente en base a la reacción antígeno/anticuerpo.

6.- ELUCION DEL ANTIGENO A DE LA COLUMNA CROMATOGRAFICA DE AFINIDAD.

La reacción antígeno/anticuerpo se caracteriza por ser reversible, dado que las interacciones entre los sitios activos del anticuerpo y el determinante antigénico son de tipo no-covalentes. Por lo tanto la separación del antígeno del sitio de unión con el anticuerpo puede llevarse a cabo por distintos métodos, algunos de mayor efectividad que otros. Los que nosotros valoramos fueron: Aumento gradual de la temperatura, cambios de pH y adición de iones caotrópicos.

El método de valoración de efectividad de cada método de elución fué igual para cada uno: Se agrega el eluyente al _

inmunoabsorbente y se dejó en incubación por 30 minutos. Para eliminar el eluyente después de transcurrido ese tiempo se dializó contra solución salina al 0.85% a pH7.4 y se tituló la capacidad de inhibición de la hemaglutinación de cada una de las muestras.

En base a los resultados, se eligió al eluyente con tiocianato de sodio:

Solución reguladora de fosfatos a 0.02 M.: Aforar a:

Solución A	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O.....	27.6 gr.....	100 ml
Solución B	Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O.....	53.65 gr.....	100 ml

Se mezclaron:

Solución A	43.85 ml
Solución B	6.15 ml
	<hr/>
	50.00 ml

Agua Bidestilada950.00 ml

Total de la Solución reguladora de Fosfatos.....1,000.00 ml

De ión tiocianato de sodio se pesaron 24.3 gr. y se aforaron a 100 ml. con la solución reguladora de fosfatos 0.02M. y se ajustó a pH 6.0.

En un intento de mejorar la efectividad como eluyente del tiocianato de sodio, se variaron la molaridad y el pH:

SOLUCION REGULADORA DE FOSFATOS:	TIOGINATO DE SODIO:	pH FINAL:
A.- 0.02 M	3.0 M	6.0
B.- 0.10 M	3.0 M	3.0
C.- 0.10 M	3.0 M	6.0

7.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENO A OBTENIDOS A SU VEZ POR AFINIDAD:

Para tener un mejor rendimiento de la columna cromatográfica de afinidad, se decidió enriquecer los anticuerpos anti-A, al obtenerlos por afinidad:

Se mezclaron glóbulos rojos A en paquete, con el suero hiperinmune anti-A, con título de hemaglutinación 1:2048, volúmen a volúmen; la mezcla se incubó a una temperatura inicial de adsorción de 4° C por 30 minutos y final de 37° C por 30 minutos - con esto se formó un coágulo por la hemaglutinación de los glóbulos rojos A al mezclarse con el suero hiperinmune anti-A. Después de la adsorción de los anticuerpos anti-A, se descartó el suero --

sobrenadante, se lavaron los glóbulos rojos con solución salina -- al 0.85%, pH 7.4.

Para la elución de los anticuerpos de la superficie de los glóbulos rojos A se utilizó únicamente el aumento de temperatura en baño serológico del matraz que contenía el coágulo y la solución salina. La temperatura se aumentó gradualmente, de 37° C -- hasta 56° C por tiempos variables, desde 10 minutos hasta 30 minutos.

Con el aumento de la temperatura se separaron los anticuerpos específicamente anti-A de los glóbulos rojos y quedaron en la solución salina, de la que se precipitaron con solución saturada de sulfato de amonio (mat. y met. apartado No. 3). A los anticuerpos obtenidos se les tituló la capacidad de hemaglutinación y se insolubilizaron con el glutaraldehído.

B.- COLUMNAS CROMATOGRAFICAS DE AFINIDAD HECHAS CON ANTICUERPOS DE CONEJO:

De un grupo de conejos no inmunizados se seleccionaron los 3 de más alto título de anticuerpos naturales anti-A. El título de anticuerpos naturales fue de 1:32 en los tres.

Dos de ellos (No. 50 y No. 61) se inmunizaron con el antígeno A purificado por la cromatografía de afinidad y de título de inhibición de la hemaglutinación de 1:512.

El esquema de inmunizaciones fue igual para todos los conejos, la única variante fue que los conejos No. 50 y No. 61 se inmunizaron con el antígeno A purificado y el conejo No. 007 se inmunizó con el antígeno A soluble (no purificado):

Día 1.-----Primoimmunización de los conejos, cada cual con el antígeno correspondiente como ya se mencionó, se utilizó adyuvante completo de Freund y la vía de administración fue subcutánea.

Día 16.-----Reimmunización vía subcutánea, se utilizó el adyuvante incompleto de Freund.

Día 20.-----Se sangraron los conejos y al suero de ellos se le tituló la actividad anti-antígeno A por hemaglutinación, cada conejo se valoró por separado.

Día 30.-----Reimmunización de cada conejo con el antígeno A que le correspondió: soluble para el No. 007 y purificado por cromatografía de afinidad para los conejos No. 50 y No. 61; la vía de administración fue intramuscular.

Día 31.-----Reimmunización por vía intramuscular con el antígeno A correspondiente.

Día 33.-----Se sangraron los conejos y al suero se le tituló la actividad anti-A, por hemaglutinación.

Día 34.-----Reinmunización con el antígeno A correspondiente, - esta vez por vía intraperitoneal.

Día 35.-----Reinmunización con el antígeno A correspondiente, - por vía intraperitoneal.

Día 36.-----Reinmunización con el antígeno A correspondiente, - por vía intraperitoneal.

Día 39.-----Se sangraron a los conejos y al suero de cada uno - de ellos se le tituló la actividad anti-A por hemaglutinación.

9.- CUANTIFICACION DE ANTICUERPO Y/O ANTIGENO POR INMUNODIFUSION RADIAL.

Se separaron placas con el gel (agarosa o ión agar en concentraciones de 0.5% y 1.0%) a las que se les incorporaron anticuerpos o antígeno A (soluble o purificado). En cada gel se hicieron 12 perforaciones para depositar allí la muestra a inmunodifundir radialmente. En los geles con anticuerpos humanos o de conejo se puso para inmunodifundir el antígeno A (soluble o purificado); mientras que en los geles con antígeno A incorporado, inmunodifundieron los sueros humano o de conejo. Véase fig. III.

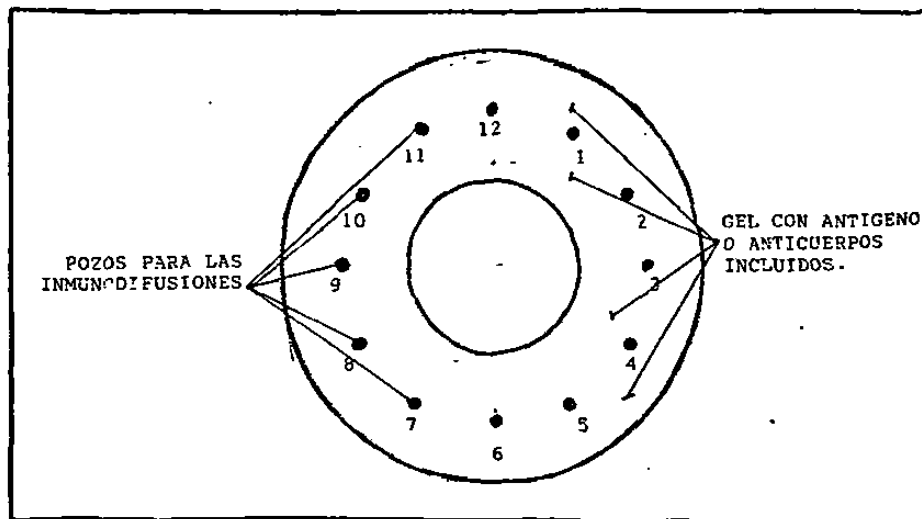


FIGURA III.- Placas de las inmunodifusiones radiales. En cada uno de los hoyos se pusieron las muestras. El diámetro de la inmunodifusión radial indica la concentración de anticuerpos o antígenos que tiene la muestra analizada.

Placas de gel (agarosa o ión agar) a las que se les incorporó el antígeno A, soluble o purificado; en estas placas inmunodifundieron los sueros anti-antígeno A:

PLACA NO.	GEL:	CONC. DEL GEL.	TITULO DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION DEL ANTIGENO a INCORPORADO AL GEL:
1	AGAROSA	0.5%	1:1024 (SOLUBLE)
2	AGAROSA	0.5%	1:64 (SOLUBLE)
3	AGAROSA	0.5%	1:32 (PURIFICADO)
4	AGAROSA	1.0%	1:16 (PURIFICADO)
5	AGAROSA	1.0%	1:8 (PURIFICADO)

6	-----	ION AGAR	-----	0.5%	-----	1:1024	(SOLUBLE)
7	-----	ION AGAR	-----	0.5%	-----	1:64	(SOLUBLE)
8	-----	ION AGAR	-----	0.5%	-----	1:32	(PURIFICADO)
9	-----	ION AGAR	-----	1.0%	-----	1:16	(PURIFICADO)
10	-----	ION AGAR	-----	1.0%	-----	1.8	(PURIFICADO)

Las doce perforaciones de las placas de gel se llenaron con -
 suero hiperinmune anti-A.

POZO NO.	TITULO DE HEMAGLUTINACION DE - LOS SUEROS HIPERINMUNES ANTI-A (HUMANO O DE CONEJO) ANADIDO - PARA INMUNODIFUNDIR:
1	----- CONTROL NEGATIVO
2	----- 1:2
3	----- 1:4
4	----- 1:8
5	----- 1:16
6	----- 1:32
7	----- 1:64
8	----- 1:128
9	----- 1:256
10	----- 1:512
11	----- 1:1024
12	----- 1:2048

Se utilizaron diez placas para la inmunodifusión de cada uno de los sueros, los cuales se aplicaron por separado lo que totalizó cuarenta placas de gel para inmunodifusiones radiales de sueros hiperinmunes. El halo de precipitación (inmunodifusión radial) se midió a las 24 horas de haberse agregado el suero hiperinmune.

Placas de gel (agarosa o ión agar) a las que se les incorporaron anticuerpos humanos o de conejo con actividad anti-antígeno A; en estas placas inmunodifundieron los antígenos A, soluble o purificado:

PLACA NO.	GEL:	CONC. DEL GEL:	TITULO DE HEMAGLUTINACION DEL ANTISUERO AGREGADO AL GEL:
I	AGAROSA	0.5%	1:1024 +
II	AGAROSA	0.5%	1:512 +
III	AGAROSA	0.5%	1:256 +
IV	AGAROSA	1.0%	1:1024 +
V	AGAROSA	1.0%	1:512 +
VI	ION AGAR	0.5%	1:1024 +
VII	ION AGAR	0.5%	1:512 +
VIII	ION AGAR	0.5%	1:256 +
IX	ION AGAR	1.0%	1:1024 +
X	ION AGAR	1.0%	1:512 +

Cada placa fue horadada en el gel, en doce sitios y los pozos se llenaron con antígeno A, soluble o purificado:

POZO	NO.	TITULO DE INHIBICION DE LA - HEMAGLUTINACION DEL ANTIGENO A (SOLUBLE O PURIFICADO) QUE SE AGREGO A LOS POZOS PARA - QUE INMUNODIFUNDIERAN:
1	-----	1:1024 (SOLUBLE)
2	-----	1:512 (SOLUBLE)
3	-----	1:256 (SOLUBLE)
4	-----	1:32 (SOLUBLE)
5	-----	1:64 (PURIFICADO)
6	-----	1:64 (PURIFICADO)
7	-----	1:32 (PURIFICADO)
8	-----	1:16 (PURIFICADO)
9	-----	1:8 (PURIFICADO)
10	-----	1:4 (PURIFICADO)
11	-----	CONTROL NEGATIVO
12	-----	CONTROL NEGATIVO

El halo de precipitación (inmunodifusión radial) se midió a las 24 horas de haberse agregado el antígeno A (soluble o purificado).

R E S U L T A D O S:

1.- OBTENCION DE GAMMAGLOBULINAS ANTI-ANTIGENO A:

La selección del método de precipitación de las gammaglobulinas se basó en la actividad específica (anticuerpos / mg de proteínas). El método de mejor rendimiento fue el de precipitación de proteínas con sulfato de amonio en solución saturada, pH 7.8 y de concentración final de sulfato de amonio de 33%.

La diálisis exhaustiva contra solución salina-boratos ocasiona una dilución de las muestras de un 15-25% por lo que hubo que concentrarla posteriormente, a su volumen inicial.

2.- INSOLUBILIZACION DE ANTICUERPOS ANTI-A CON GLUTARALDEHIDO:

Después de la eliminación del sulfato de amonio, las gammaglobulinas humanas con actividad anti-antígeno A se insolubilizaron con glutaraldehído a concentraciones finales del glutaraldehído de 2.5%, 2.0%, 1.5% y 1.0%. Se observó polimerización en las tres primeras, la concentración final de 1.0% de glutaraldehído no fue suficiente para insolubilizar anticuerpos. Se seleccionó la de 1.5% en base a que:

- a).- La insolubilización es completa.
- b).- No es necesario homogeneizar en mortero pues queda en consistencia de gel.
- c).- Es menor la manipulación de las proteínas.
- d).- Con el glutaraldehído a concentración final de 1.5% fue mejor el rendimiento de las columnas cromatográficas de afinidad.

CONCENTRACION DEL GLUTARALDEHIDO:	TITULO DEL ANTIGENO A DEL SISTEMA ABO PURIFICADO:
2.5 %	1:4
2.0 %	1:8
1.5 %	1:64 a 1:256
<p>TABLA 2.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL GLUTARALDEHIDO EN EL RENDIMIENTO DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE AFINIDAD.</p>	

3.- ELUCION DEL ANTIGENO A DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE AFINIDAD.

Una vez determinado el método más efectivo de insolubilización de proteínas, se valoraron métodos diferentes de elución del antígeno A de la columna cromatográfica de afinidad: (21, 22).

- a).- Método de elución basado en el amortiguador HCL-glicina-
pH 2.8: El rendimiento máximo de este método de elución
fue: antígeno A con título de inhibición de la hemaglu-
tinación de 1:4.
- b).- La disminución hasta pH 4.0 y la elevación a pH 8.0 del
amortiguador de fosfatos utilizado para " lavar " las --
columnas, no dió resultado en la elución del antígeno A-
de la columna cromatográfica de afinidad.
- c).- Elución del antígeno A mediante la elevación de la tem-
peratura: "Las interacciones antígeno-anticuerpo son re-
versibles por aumento de la temperatura dado que son
interacciones no covalentes"; este método dió resultado-
promedio de elución del antígeno A de la columna-
cromatográfica de afinidad, de un título de inhibición-
de la hemaglutinación de 1:2.
- d).- Método de elución del antígeno A con tiocianato de
sodio: Los componentes de la mezcla original se modifi-
caron para buscar mejor rendimiento en la elución del
antígeno A del sistema ABO, de la columna cromatográfica
de afinidad.

TIOCIANATO DE SODIO:	SOLUCION REGULADORA DE FOSFATO	pH FINAL	TITULO DEL ANTIGENO A ELUIDO:
3.0 M.	0.02 M.	6.0	1:64
3.0 M.	0.10 M.	3.0	1:16
3.0 M.	0.10 M.	6.0	1:128 a 1:256

TABLA 3.- EFECTO DEL pH Y LA MOLARIDAD DEL BUFFER DE ELUCION SOBRE EL RENDIMIENTO DEL ANTIGENO A PURIFICADO MEDIANTE LA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

Por lo que se utilizó en los experimentos subsecuentes, el tiocianato de sodio 3.0 M., solución reguladora de fosfatos 0.10 M y un pH final de 6.0.

4.- DOBLE PRINCIPIO DE AFINIDAD PARA PURIFICAR EL ANTIGENO A:

Se obtuvieron anticuerpos anti-A por afinidad, adsorbiéndolos sobre la superficie de glóbulos rojos A y luego se eluyeron mediante aumento de temperatura. Los experimentos con las variaciones de temperaturas y tiempos diferentes para cada una de ellas mostraron que la adsorción óptima fue con una temperatura inicial de 4° C por 30 minutos y una temperatura final de 37° C por 30 minutos.

La elución de los anticuerpos adsorbidos sobre la superficie de los glóbulos rojos A, por aumento de la temperatura, fue mejor a 56° C por 30 minutos, ya que a esta temperatura y tiempo se separó una mayor concentración de anticuerpos específicamente anti-A, lo que se comprobó por el título de hemaglutinación alcanzado-- por este método que fue de 1:512 a 1:1024.

Con los anticuerpos obtenidos por afinidad se hicieron nuevas columnas para cromatografía de afinidad y estas resultaron de rendimiento mayor en cuanto a título de la inhibición de la hemaglutinación en la purificación del antígeno A del sistema ABO.

5.- EL ANTIGENO COMO INMUNOGENO EN CONEJOS:

Para comparar el rendimiento de las columnas cromatográficas de afinidad hechas con anticuerpos humanos, versus las hechas con anticuerpos de conejo, se inmunizaron conejos con el antígeno A del sistema ABO, en sus formas purificadas o solubles para obtener anticuerpos de conejo y utilizarlos para la fase estacionaria de la columna cromatográfica, y los resultados se enlistan en la tabla 4.

DÍA DE LAS INMUNIZACIONES	CONEJOS:	INMUNOGENO	TITULO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-A DEL SUE-RO:
1	50	ANTIGENO A PURO	1:32 +
	61	ANTIGENO A PURO	1:32 ++
	007	Ag. A SOLUBLE.	1:32 ++
20	50	ANTIGENO A PURO	1:128 +
	61	ANTIGENO A PURO	1:8192 +
	007	Ag. A SOLUBLE.	1:32 ++

33	50	ANTIGENO A PURO	1:1024 +
	61	ANTIGENO A PURO	1:8192 ++
	007	Ag. A SOLUBLE.	1:32 ++
39	50	ANTIGENO A PURO	1:4096 ++
	61	ANTIGENO A PURO	1:16,384 +
	007	Ag. A SOLUBLE.	1:32 +
TABLA 4.- COMPARACION DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA, EN CONE- JOS, DE LOS ANTIGENOS A SOLUBLE (NO PURIFICADO) Y ANTIGENO A PURIFICADO MEDIANTE LA COLUMNA CROMATO- GRAFICA DE AFINIDAD.			

Los anticuerpos de conejo con actividad anti-antígeno A del sistema ABO se obtuvieron por afinidad adsorbiéndolos sobre la superficie de glóbulos rojos A con los tiempos y temperaturas que fueron útiles para hacer lo mismo con anticuerpos humanos. De la misma manera fueron insolubilizados con glutaraldehído al 1.5% de concentración final. Las columnas cromatográficas de afinidad hechas con anticuerpos de conejo fueron mas efectivas que las hechas con los anticuerpos de humanos, la efectividad fue proporcional al título de hemaglutinación de los sueros obtenidos.

6.- INMUNODIFUSION RADIAL:

El diámetro de precipitación de la inmunodifusión radial -- es un análisis cualitativo y visible de la reacción antígeno-anti- cuerpo. En las placas de gel a las que se les incorporó el anti- genos A soluble o purificado se obtuvieron los resultados siguien- t.s:

A.- Las placas de gel a las que se les llenaron los pozos con suero humano mostraron un halo de precipitación en agarosa al 0.5% (placas 1 y 2) y en ión agar al 0.5% (placas 6 y 7). A estas placas se les había incorporado antígeno A soluble. El resto de las placas fue negativo para las inmunodifusiones radiales.

B.- En las placas de gel a las que se les llenaron los pozos con el suero de conejo No. 007 se encontraron resultados similares a los de las placas en las que inmunodifundió el suero humano. Hubo difusión radial en las placas de agarosa al 0.5% (placas 1 y 2) y en las de ión agar al 0.5% (placas 6 y 7). A este juego de placas se les había incorporado antígeno A soluble. En el resto de las placas no hubo precipitación radial.

C.- Las inmunodifusiones de las placas de gel a las que se les llenaron los 12 pozos con sueros de los conejos No. 50 y No. 61 fueron similares: Se observó halo de precipitación en las placas de agarosa al 0.5% y 1.0% (placas 3, 4 y 5) y en las de ión agar al 0.5% y al 1.0% (placas 8, 9 y 10). A estas placas se les había incorporado antígeno A purificado por cromatografía de afinidad. El resto de las placas no mostró halo de precipitación en la inmunodifusión radial.

Las placas de gel con anticuerpos anti-antígeno A incorporado mostraron las inmunodifusiones siguientes:

- 1.- Placas de gel con anticuerpos humanos anti-A incorporados: Los pozos se llenaron con antígeno A soluble y puro, los halos de precipitación se formaron solo en la periferia de los pozos que habían sido llenados con el antígeno A soluble; los pozos que se llenaron con el antígeno A purificado por cromatografía de afinidad no mostraron halo de precipitación.
- 2.- Placas de gel con anticuerpos del conejo No. 007: Los pozos se llenaron con antígeno A soluble y purificado; el resultado a las 24 horas de incubación mostró regiones periféricas de precipitación solo en los pozos que se llenaron con el antígeno A soluble, los demás pozos no mostraron evidencia de reacción antígeno-anticuerpo.
- 3.- En las placas de gel con anticuerpos del conejo No. 50, - los doce pozos se llenaron con el antígeno A soluble y -- purificado y los resultados de inmunodifusiones radiales -- fueron positivos únicamente en los pozos que se habían -- llenado con el antígeno A purificado por la columna cro-- matográfica de afinidad. Los resultados fueron los mis--

mos en las placas de gel a las que se les incorporaron -- los anticuerpos del conejo No. 61. Esto quiere decir que solo hubo halo de precipitación radial en los pozos donde se aplicó el antígeno A purificado por cromatografía de afinidad.

D I S C U S I O N

El antígeno A del sistema ABQ, en forma soluble es un proteoglicano de un rango de peso molecular bastante amplio (desde 20,000 hasta varios millones de daltones). Los métodos de filtración convencionales para esterilizar el antígeno A (membranas de 0.25 micras) dan como resultado:

- 1).- Mas homogeneidad.
- 2).- Disminución en 10 órdenes o más de la capacidad del antígeno A de inhibir la hemaglutinación.
- 3).- Disminución considerable o desaparición de la inmunogenicidad del antígeno A soluble filtrado.

Debido a lo anterior existe la necesidad de contar con un método efectivo para la obtención de un antígeno A "estandarizado" - por su actividad inhibitoria de la hemaglutinación.

La cromatografía de afinidad es un método ampliamente utilizado para purificar antígenos, anticuerpos, enzimas, hormonas, etc.

En este trabajo nosotros utilizamos la cromatografía de afinidad con un soporte de anticuerpos anti-antígeno A, del sistema ABO, para purificar el antígeno A soluble a partir de un extracto "crudo". Encontramos que las gammaglobulinas utilizadas como soporte, dieron mejor resultado en cuanto al título de inhibición de la hemaglutinación del antígeno A que el título obtenido por filtración del antígeno A.

Cuando utilizamos anticuerpos anti-A purificados a su vez por afinidad con eritrocitos humanos A, el resultado en la purificación tuvo incremento cualitativo en cuanto al título de inhibición de la hemaglutinación hasta 1:1024-2048 (por filtración el título máximo de inhibición de la hemaglutinación que se logró fue de 1:256-512).

En la comparación de la inmunogenicidad entre: Los antígenos A solubles y los antígenos A purificados por cromatografía de afinidad, se encontró que estos últimos son más inmunogénicos, pues los sueros hiperinmunes inducidos alcanzaron títulos más altos de hemaglutinación al ponerlos en contacto con glóbulos rojos A. Esto probablemente se debe a un incremento en la homogeneidad y pureza del antígeno A.

Los anticuerpos sintetizados por los conejos en respuesta a las inmunizaciones con el antígeno A del sistema ABO "reconocen" mejor al antígeno que los induce y en las inmunodifusiones-

radiales se comprobó que los anticuerpos anti-antígeno A purificado migraron mejor en los geles a los que se les incluyó el antígeno A purificado que en los geles con antígeno A soluble (no purificado). Lo anterior se explica al considerar que el antígeno A soluble (no purificado) posee el determinante antigénico "reconocido" por el suero hiperinmune anti-antígeno A puro, y otros elementos sin relación con el antígeno A y cabe la posibilidad de que tales elementos pudieran interferir con la reacción antígeno-anticuerpo.

Estos resultados son similares a los obtenidos en las inmunodifusiones de los anticuerpos humanos (inducidos por el antígeno A soluble), estos sueros humanos migraron mejor en las placas de gel con antígeno A soluble incluido que en las placas de gel con antígeno A puro incluido, esto se debió a que solamente una fracción de los anticuerpos humanos "reconoció" el antígeno A puro, el resto de los anticuerpos iba dirigido contra otros elementos de la mezcla en la que se halla el antígeno A.

Por lo anterior la cromatografía de afinidad representa un buen método para la purificación del antígeno A del sistema ABO y permite tener antígeno A puro que esté disponible para análisis in vitro e in vivo de la influencia que tiene la estructura química sobre la inmunogenicidad.

Se sabe que la inmunogenicidad de los polisacáridos, como el antígeno A, depende estrechamente del peso molecular (Ref. Heil---

delberger con polisacáridos de pneumococos y Kabat con dextrán de diferentes pesos moleculares). En el presente trabajo no se estudió la influencia del peso molecular en la inmunogenicidad del antígeno A purificado por cromatografía de afinidad; esto necesita ser estudiado purificando antígeno A y separándolo en un gradiente de sacarosa para diferenciar el antígeno A en pesos moleculares -- con una ultracentrífuga, con esto se mejorará el conocimiento de -- la relación que existe entre la estructura química y la inmunoge-- nicidad.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Las condiciones óptimas para insolubilizar anticuerpos para cromatografía de afinidad es de glutaraldehído al 1.5% para proteínas en concentración de 25 mg/ml.
- 2.- Los anticuerpos anti-A para la cromatografía de afinidad dan un mejor rendimiento si a su vez son obtenidos por afinidad (adsorción sobre glóbulos rojos A y elución).
- 3.- El antígeno A del sistema ABO purificado por cromatografía de afinidad puede ser estandarizado por su actividad inhibitoria de la hemaglutinación y por su capacidad inmunogénica.
- 4.- La cromatografía de afinidad es una herramienta útil para la purificación de antígenos, su manejo es sencillo y fácil de repetir.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- ABRAMOFF, P.: LA VIA, M. BIOLOGY OF THE IMMUNE RESPONSE
YOUNG JAMES AND MOBLEY SALLY EDITORS, BY MAPLE PRESS CO.
1970. pp. 21-24.
- 2.- AVRAMEAS, S. AND TERNYNCK, T. THE CROSS LINKING OF PRO-
TEINS WITH GLUTARALDEHYDE AND ITS USE FOR THE PREPARATION
OF IMMUNOADSORBENTS. IMMUNOCHEMISTRY 6, 1969. pp. 53-56.
- 3.- BACH, J.F. INMUNOLOGIA. EDITORIAL LIMUSA. 1984.
- 4.- BELLANTI, J.A. INMUNOLOGIA. W.B. SANDERS CO. 1986.
- 5.- BENACERRAF, B. Y UNANUE, E.R. INMUNOLOGIA. EDITORIAL MEDI
CA PANAMERICANA, 1986. pp. 29-31.
- 6.- ROJAS, W. INMUNOLOGIA. ADDISON- WESLEY IBEROAMERICANA,
S.A. EDITOR DR. JULIO CEITLIN. 1986. pp. 146-149.
- 7.- SELL, S.A. INMUNOLOGIA, INMUNOPATOLOGIA E INMUNIDAD. -
HARPER AND ROW PUBLISHERS, INC. 1975. pp. 140-144.
- 8.- FAIRBANKS, G.; STECK, T.H.; WALLACH, D. ELECTROPHORETIC
ANALYSIS OF THE MAJOR POLIPEPTIDES OF THE HUMAN ERYTHROCYTE
MEMBRANE. BIOCHEMISTRY, VOL. 10, NO. 13. pp. 2606-2617 .
1971.
- 9.- FUDENBERG, H.H.; STITES, D.R.; STOBO, D.J.; WELLS, V.J.
INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA. ED. MANUAL MODERNO. 1983.
pp. 394-400.

- 10.- HAKOMORI, S.; STRYCHARZ, G.D. ISOLATION AND CHEMICAL COMPOSITION OF BLOOD GROUPS SUBSTANCES ABH AND Le ISO-- ANTIGENS OF SPHINGOLIPID NATURE. BIOCHEMISTRY 10. 1968. pp. 1279-1285.
- 11.- HOWE, C.; KABAT, E.A. IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON BLOOD GROUPS. "FRACTIONATION OF HOG GASTRIC MUCIN AND INDIVIDUAL HOG STOMAC LININGS". ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS. 60. 1955. pp. 244-254.
- 12.- KABAT, E.A.; BEZER, A.E. IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON BLOOD GROUPS. "ESTIMATION OF A AND B ISOANTIBODIES IN HUMAN SERUM BY THE CUANTITATIVE PRECIPITIN METHOD." ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 1947. pp. 207-215.
- 13.- KAY, L.A. CELLULAR BASIS OF THE IMMUNE RESPONSE TO ANTIGENS OF ABO BLOOD GROUP SUBSTANCES. THE LANCET. DEC. 1984. pp. 1369-1371.
- 14.- LEFKOVITZ, I; PERNIS, B. IMMUNOLOGICAL METHODS. BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD. 1979. pp. 58-59.
- 15.- MORGAN, W.T.J.; HEYNINGE, R.van. THE OCURRENCE OF A, B AND O BLOOD GROUP SUBSTANCES IN PSEUDO MUCINOUS OVARIAN CYST FLUIDS. BIOCHEMISTRY. 1944. pp. 5-15.
- 16.- MORGAN, W.T.J.; PUSZTAT, A. STUDIES IN IMMUNOCHEMISTRY. "SOME OBSERVATIONS ON THE HETEROGENEITY OF PREPARATIONS OF HUMAN BLOOD GROUPS SPECIFIC SUBSTANCES." BIOCHEMISTRY JOURNAL 80. 1961. pp. 362-372.

- 17.- MORGAN,W.T.J.; PUSZTAT,A. STUDIES IN IMMUNOCHEMISTRY.
"FURTHER OBSERVATIONS ON THE PREPARATION AND PROPERTIES OF HUMAN BLOOD GROUP SPECIFIC MUCOPOLYSACCHARIDES." BIOCHEMICAL JOURNAL **80**. 1961. pp. 107-121.
- 18.- ROITT,I.; BROSTOFF,J.; MALE,D. IMMUNOLOGY. GOWEL MEDICAL PUBLISHING LTD, LONDON,ENGLAND. 1985. pp. 20.4
20.5.
- 19.- SELA,M. THE ANTIGENS, VOL.II. ACADEMIC PRESS, NEW YORK. 1974. pp.80-113.
- 20.- WATKINS, W.M. BLOOD GROUP SUBSTANCES. SCIENCE, VOL - 152, APRIL-1966. pp. 172-181.
- 21.- WEIR, D.M. HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY. VOL. I. IMMUNOCHEMISTRY. BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS. 1973.
- 22.- CHASE,M.W. AND WILLIAMS,C.A. (EDS.) METHODS IN IMMUNOLOGY AND IMMUNOCHEMISTRY 1:(1967); 2:(1968); 3: -- (1971). ACADEMIC PRESS, NEW YORK.
- 23.- PUSZTAT,A.; MORGAN,W.T.J. STUDIES IN IMMUNOCHEMISTRY "SOME OBSERVATIONS OF PREPARATIONS OF HUMAN BLOOD -- GROUP SPECIFIC SUBSTANCES." BIOCHEMISTRY,**93**. 1964.
- 24.- REITHERMAN,R.W.; ROSEN,S.D.; BARONDES,S.H. LECTIN - PURIFICATION USING FORMALINIZED ERYTHROCYTES AS A GENERAL AFFINITY ADSORBENT. NATURE **248**. 1974. pp.599-600.

- 25.- AVRAMEAS,S. AND TERNYNK,T. BIOLOGICALLY ACTIVE WATER INSOLUBLE PROTEIN POLYMERS.I. THEIR USE FOR ISOLATION OF ANTIGENS AND ANTIBODIES . JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **242**. 1967. pp. 1651-1659.
- 26.- PIAO,K.T.; KOCHOUMIAN,L. A COMPARISON OF DIFFERENT ENZYME-ANTIBODY CONJUGATES FOR ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY. J. OF IMMUNOL. METH. VOL. 28. 1979 - pp. 201-210.

