

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



\* 5 3 0 9 5 7 5 8 4 1 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y ANTIGÉNICO DE LAS INMUNOGLOBULINAS DE  
LA TRUCHA ARCOIRIS, Oncorhynchus mykiss

Director de la tesis:

Dr. Francisco Javier Domínguez Juncal

M<sup>a</sup> Carmen Sánchez Torres

Madrid, 1992



ARCHIVO

## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral se ha llevado a cabo en el Dpto. de Sanidad Animal del CIT-INIA, bajo la dirección del Dr. Fco. Javier Domínguez, a quien quiero expresar mi agradecimiento por su dedicación y por el interés que ha demostrado en mi formación. Asimismo, quiero agradecer al jefe de este Dpto., Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno, y a la Fundación para el Desarrollo de la Investigación en Biología Animal, su constante apoyo y colaboración para la finalización de esta tesis.

Desearía también expresar mi agradecimiento al Dr. Agustín G. Zapata (Dpto. de Biología Celular, Facultad de Biología, UCM), por su inestimable ayuda a lo largo de estos años, así como a Alberto Álvarez, del Centro de Citometría de Flujo de la UCM, donde se han realizado todos los experimentos de citometría de flujo de este trabajo.

Al Dr. Rafael Pulido (Dpto. de Inmunología, Hospital de la Princesa) y a mi amiga Susana de Pedro quiero agradecerles las largas charlas de inmunoquímica que han soportado, la discusión y corrección de gran parte de este trabajo y, sobretodo, el haberme proporcionado su amistad.

Agradezco al Dr. Gregory W. Warr (Dpto. Bioquímica, Universidad Médica de Carolina del Sur, USA), a los Drs. Alberto Villena y Ana Castillo (Dpto. Biología Celular y Anatomía, Facultad de Biología, Universidad de León) y a mis compañeros de los Dptos. de Toxicología e Ictiopatología del CIT-INIA, la generosa cesión de parte del material utilizado en esta tesis.

A mis compañeros del Dpto. de Inmunología del CIT-INIA les agradezco sus consejos y su apoyo constante, especialmente a Carmen Hernández, Fernando Alonso y Javier Tomillo, quienes han colaborado muy directamente en este trabajo.

Finalmente, mi agradecimiento más especial para Miguel de la Fuente, quien ha trabajado muchas tardes de calor para conseguir una gran parte de la bibliografía de esta tesis, y me ha levantado el ánimo en los momentos más bajos.

A mi familia

A Miguel

## ABREVIATURAS

**ABF:** Azul de Bromofenol  
**ACF:** Adyuvante Completo de Freund  
**AcM:** Anticuerpo monoclonal  
**AIF:** Adyuvante Incompleto de Freund  
**BSA:** Seroalbúmina bovina  
**C:** Región, dominio o segmento génico constante de las Igs  
**Cadena H:** Cadena pesada de las Igs  
**Cadena L:** Cadena ligera de las Igs  
**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario  
**CDR:** Región determinante de complementariedad del dominio variable de las Igs  
**cpm:** Cuentas por minuto  
**CS:** Componente secretor  
**D:** Segmento génico de diversidad de las Igs  
**DAG:** Diacilglicerol  
**DNP:** Dinitrofenilato  
**D.O.:** Densidad óptica  
**DTT:** Ditiotreitól  
**ELISA:** Enzimoimmunoensayo  
**ELISA DAS:** ELISA de doble anticuerpo  
**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína  
**FR:** Región armazón del dominio variable de las Igs  
**Ig:** Inmunoglobulina  
**IPNV:** Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa  
**J:** Segmento génico de unión de las Igs  
**Kb:** Kilobases  
**kDa:** Kilodaltons  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**mIg:** Ig de membrana  
**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero  
**NIP:** Ácido 4-hidroxi, 3-iodo, 5-nitrofenil acético  
**OPD:** o-fenilendiamina  
**OVA:** Ovalbúmina  
**pb:** Pares de bases

**PB:** Tampón fosfato  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**PKC:** Proteína quinasa C  
**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
**PWM:** Mitógeno de Phytolacca americana, "pokeweed"  
**RAM:** Antisuero de conejo anti-Igs de ratón  
**SAS:** Sulfato amónico saturado  
**SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia  
de dodecil sulfato sódico  
**SSR:** Secuencias señales de recombinación  
**TBS:** Tampón Tris salino  
**TCR:** Receptor de los linfocitos T  
**TFMS:** Ácido trifluorometano sulfónico  
**TNP:** Trinitrofenilato  
**V:** Región, dominio o segmento génico variable de las Igs

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1. Estructura de las inmunoglobulinas	3
2. Regiones constantes de las inmunoglobulinas	6
3. Regiones variables de las inmunoglobulinas	7
4. Carbohidratos	8
5. Funciones de las inmunoglobulinas	10
6. Estructura y función del receptor de los linfocitos B	12
7. Biosíntesis, ensamblaje y transporte de las inmunoglobulinas	14
8. Heterogeneidad de las inmunoglobulinas	16
9. Estructura de las inmunoglobulinas en los peces	17
10. Estructura de las inmunoglobulinas en otros vertebrados	25
11. Organización genética de las inmunoglobulinas en la evolución	27
12. Diversidad de anticuerpos en los vertebrados	38
<b>II. OBJETIVOS</b>	41
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	44
1. Peces	45
2. Sueros	45
3. Purificación de las inmunoglobulinas séricas de la trucha	45
4. Obtención de antisueros policlonales anti-Igs de trucha	48
5. Valoración de la concentración de proteína total en una muestra	49
6. Obtención de antisueros policlonales en trucha	50
7. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-Igs de trucha	50
8. Purificación de los ACM a partir de líquido ascítico	52

9. Marcaje con biotina de los anticuerpos monoclonales	53
10. Marcaje con <sup>125</sup> I de Ig soluble	53
11. Inmunoprecipitaciones	54
12. Inmunoadsorciones	54
13. Técnicas inmunoenzimáticas	55
13.1. Enzimoimmunoensayo (ELISA)	55
13.1.1. ELISA indirecto	56
13.1.2. ELISA de doble anticuerpo (DAS)	57
13.1.3. ELISA de competición	57
13.2. Inmunoelctrotransferencia	58
14. Reducción y alquilación de las Igs de trucha	59
15. Tratamiento de las Igs de trucha con metaperiodato	60
16. Tratamiento de las Igs de trucha con ácido trifluorometano sulfónico (TFMS)	61
17. Digestiones con la proteasa V8 de <u>Staphylococcus aureus</u>	61
18. Cultivos de linfocitos de trucha	62
18.1. Purificación de linfocitos de sangre periférica y de órganos linfoides	62
18.2. Producción "in vitro" de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos estimulados con mitógenos	63
18.3. Tratamiento con tunicamicina de cultivos de linfocitos de trucha	64
19. Técnicas inmunocitológicas	65
19.1. Ensayos de citometría de flujo	65
19.2. Ensayos de doble marcaje con peroxidasa y fosfatasa alcalina	66
20. Ensayos de cuantificación de Igs de trucha	67
<b>IV. RESULTADOS</b>	68
1. Purificación de Igs de trucha	69
1.1. Purificación de Igs por cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico	69
1.2. Purificación de Igs de trucha con el AcM 1G7	74
2. Características estructurales de las Igs de trucha	74

2.1. Análisis de las Igs por SDS-PAGE en condiciones reductoras	76
2.2. Análisis de las Igs por SDS-PAGE en condiciones no reductoras	80
2.3. Análisis del porcentaje de hidratos de carbono de las Igs	80
3. Determinación de los niveles séricos de Igs en la trucha arcoiris	81
4. Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-Igs de trucha	84
4.1. Determinación de la unión simultánea de pares de AcM sobre la molécula de Ig	87
4.2. Análisis de la reactividad de los AcM frente a cadenas pesadas o ligeras	90
4.3. Reactividad de los AcM frente a determinantes azucarados de las Igs de trucha	94
4.4. Reactividad de los AcM frente a determinantes alotípicos de las Igs de trucha	94
4.5. Reactividad de los AcM frente a determinantes idiotípicos de las Igs de trucha	97
4.6. Análisis epitópico	100
4.7. Reactividad de los AcM con diferentes especies de salmónidos	100
4.8. Análisis del porcentaje de células con Igs de superficie en distintos órganos linfoides de la trucha	104
5. Análisis de la heterogeneidad de cadenas L en las Igs de trucha	106
6. Caracterización de las Igs reconocidas por el AcM 3F7	113
7. Cinética de producción de Igs	119
7.1. Cinética de producción de Igs "in vitro"	119
7.2. Cinética de producción de Igs "in vivo"	125
8. Análisis de la concentración de Igs en embriones y alevines de trucha	128

<b>V. DISCUSIÓN</b>	132
. Estructura de las Igs de la trucha arcoiris	133
. Estructura covalente de las Igs	138
. Concentración de Igs séricas	140
. Caracterización de los AcM anti-Igs de trucha.	
Heterogeneidad estructural y antigénica de las Igs	142
. Reactividad de los AcM frente a determinantes alotípicos	144
. Reactividad de los AcM frente a determinantes idiotípicos	146
. Determinación de la unión simultánea de pares de AcM sobre la molécula de Ig	149
. Análisis epitópico de las Igs	151
. Reactividad de los AcM con Igs de distintos salmónidos	152
. Análisis de la heterogeneidad en las cadenas L de las Igs	153
. Análisis de la heterogeneidad en las cadenas H de las Igs	159
. Análisis del porcentaje de células con Igs de superficie en los órganos linfoides	163
. Producción "in vitro" de Igs en respuesta a mitógenos	166
. Producción "in vivo" de Igs en respuesta al hapteno FITC	170
. Producción de Igs en el desarrollo ontogénico de la trucha	174
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	177
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	181
<b>APÉNDICE</b>	213

## I. INTRODUCCION

La producción intensiva de peces, desarrollada gracias a los avances técnicos conseguidos en acuicultura, favorece la aparición de diversas patologías infecciosas que merman de forma significativa la rentabilidad de estas explotaciones.

Entre las medidas propuestas para la prevención y control de estos procesos infecciosos, el desarrollo de vacunas contra los agentes patógenos constituye una de las más importantes. Sin embargo, ello requiere un adecuado conocimiento de los mecanismos inmunitarios implicados en la adquisición de resistencia, y la disponibilidad de métodos que permitan valorar la capacidad inmunológica de estos animales. Aunque se ha prestado una gran atención a los aspectos básicos y aplicados de la inmunidad en los animales endotermos, en los animales ectotermos, y especialmente en los peces teleósteos, muchos de estos aspectos permanecen aún oscuros.

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio estructural y antigénico de las inmunoglobulinas (Igs) de una de las especies de teleósteos más cultivadas en nuestro país, la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Dentro de este estudio, se ha analizado asimismo la cinética de producción de Igs que presentan estos peces en la respuesta inmune frente a diversos antígenos.

Clásicamente se ha considerado que los salmónidos, al igual que otros peces teleósteos, poseen un solo tipo de Igs, con características similares a la IgM de los mamíferos, de acuerdo con su estructura polimérica, su masa molecular y su contenido en carbohidratos (Voss et al., 1980). Sin embargo, en estos últimos años, se ha demostrado la existencia de una mayor heterogeneidad estructural y/o antigénica en las Igs de distintos peces teleósteos (Lobb y Clem, 1981a; Lobb et al., 1984; Lobb y Olson, 1988). Además de su valor filogenético, la importancia de estos análisis estructurales radica en la diferente expresión de

estos tipos de Igs a lo largo de la respuesta inmune frente a antígenos timo-dependientes y timo-independientes.

En esta introducción se analizarán diversos aspectos generales de las Igs, basados principalmente en estudios llevados a cabo en los mamíferos, y se centrará posteriormente en el análisis estructural y genético de las Igs desde un punto de vista filogenético.

## 1. ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Las Igs son los miembros prototípicos de la denominada superfamilia de las inmunoglobulinas (Hunkapiller y Hood, 1986). Dichas moléculas comparten una estructura proteica conservada, el dominio. Los distintos dominios existentes han evolucionado por duplicación a partir de un segmento génico ancestral.

La combinación de dos o más dominios forman una cadena pesada o ligera de una Ig. Un dominio comprende aproximadamente 110 aminoácidos, y presenta dos cisteínas, en posiciones muy conservadas, que forman un enlace disulfuro dentro del dominio, el cual es esencial para mantener la estructura terciaria de la molécula (Edmunson et al., 1975). Básicamente, un dominio tiene una conformación globular compacta, formada por dos estructuras  $\beta$ -laminares antiparalelas unidas por el enlace disulfuro. Hay tres aminoácidos invariables en los dominios: las dos cisteínas que forman el enlace dentro del dominio y un triptófano que parece proteger este enlace de la reducción por solventes. Los aminoácidos más conservados entre las distintas clases de Igs se localizan en las láminas  $\beta$  (Williams y Barclay, 1988).

En líneas generales, una molécula de Ig está compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos de alto peso molecular (50-70 kDa; cadenas pesadas, H) y dos cadenas de bajo peso molecular (23

kDa; cadenas ligeras, L). La estructura básica de la molécula está formada por dos cadenas L idénticas y dos cadenas H idénticas. Cada una de las cadenas consta de una zona variable y de una región constante. Las zonas variables se sitúan en el extremo N-terminal de la molécula, y la combinación de las zonas variables de las cadenas H y L da lugar a la formación del sitio de unión para el antígeno. Una Ig tipo contiene dos sitios de unión para el antígeno. En las regiones constantes residen las funciones efectoras de las Igs. Las características antigénicas de estas regiones constantes sirven para definir cinco clases de cadenas H ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\alpha$ ) y dos tipos de cadenas L ( $\kappa$  y  $\lambda$ ). Las cadenas ligeras junto con las pesadas determinan la especificidad de la molécula, pero todas las funciones efectoras de las Igs residen en sus cadenas H.

Las cadenas L constan de dos dominios, uno variable ( $V_L$ ) y otro constante ( $C_L$ ). Las cadenas H contienen un dominio variable ( $V_H$ ) y tres o cuatro dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ ), dependiendo de la clase de cadena. Algunas clases tienen una región adicional, denominada región bisagra, que no presenta estructura de dominio, y que está localizada entre  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ . Los dominios variables y constantes están codificados en el genoma por genes separados (Tonegawa, 1983), por lo que la capacidad de reconocer un determinado antígeno (propiedad de la región V), puede asociarse a cualquiera de las distintas funciones efectoras (propiedad de la región C).

La estructura cuaternaria de las Igs está mantenida fundamentalmente por enlaces covalentes (puentes disulfuro) (Hasemann y Capra, 1989). La cadena L se une generalmente a la H por un puente disulfuro y las cadenas H están unidas covalentemente una a otra por uno o varios enlaces disulfuro entre las regiones bisagra. Además, dicha estructura está estabilizada por fuertes uniones no covalentes (enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, etc). Las interacciones no covalentes se

dan entre pares  $V_H-V_L$ ,  $C_L-C_H1$  y  $C_H3-C_H3$ , pero nunca entre pares  $C_H1-C_H1$  o  $C_H2-C_H2$  (Huber et al., 1976).

Las clases IgM e IgA se presentan como polímeros de la unidad básica monomérica (pentámero y dímero respectivamente), y están mantenidos igualmente a través de enlaces disulfuro. Ambas macromoléculas están asociadas a una proteína denominada cadena J (Koshland, 1985). Este polipéptido tiene 137 aminoácidos, de los cuales un alto porcentaje son aminoácidos ácidos; posee 8 cisteínas implicadas en puentes disulfuro intra e intercatenarios. Su secuencia no está significativamente relacionada con los dominios de las Igs. Aunque su papel es todavía desconocido (Davis y Schulman, 1989), se ha implicado a la cadena J en la polimerización de IgM e IgA, con la función de evitar polimerizaciones incontroladas, cerrando la estructura (Koshland, 1989).

Las IgA presentes en secreciones están unidas a una molécula denominada componente secretor (CS) (Mullock y Hinton, 1981), que es el dominio de unión de un receptor transmembranal para las Igs poliméricas (IgM e IgA), expresado en la membrana basal de muchos epitelios glandulares (Kühn y Kraehenbuhl, 1981). El CS es un miembro de la superfamilia de las Igs, con 6 dominios similares a los de las Igs y un séptimo no relacionado. Cuando el receptor capta una Ig polimérica, el complejo es endocitado y transportado en vesículas intracelulares a la superficie apical de la célula, donde se exocita. Durante este movimiento, el receptor se rompe en dos subunidades (el CS y el extremo C-terminal asociado a membrana), quedando el CS unido a la Ig con una función de transporte y protección de ésta frente a la degradación.

## 2. REGIONES CONSTANTES DE LAS INMUNOGLOBULINAS

La homología de secuencia entre las regiones constantes de las distintas clases de Igs es aproximadamente del 30%, aunque los diferentes dominios muestran distintas homologías entre las clases. Los dominios  $C_{\mu}1$  tienen una homología del 33%, reflejo probablemente de su función común de unirse a las cadenas L. Los dominios carboxiterminales de las cadenas  $\mu$ ,  $\alpha$  y  $\gamma$  presentan un 41% de identidad. Entre  $\mu$  y  $\alpha$  esta conservación de secuencia se debe probablemente a su papel común en la formación de polímeros (Hasemann y Capra, 1989).

Las regiones bisagra presentan la mayor variabilidad entre las clases. Las cadenas  $\mu$  y  $\epsilon$  no tienen región bisagra, sino un dominio adicional designado  $C_{\mu}2$  y  $C_{\epsilon}2$  respectivamente. Se cree que las regiones bisagra se desarrollaron, por evolución, a partir del dominio  $C_{\mu}2$ , reduciéndose profundamente de tamaño (Parvari et al., 1988).

Las diferencias estructurales entre los dominios parecen jugar un papel determinante en las distintas funciones biológicas de las cinco clases de Igs. Un dato que apoya esta idea es que la homología interespecie entre las clases es mayor que las homologías interclase dentro de la misma especie (Hasemann y Capra, 1989).

Con respecto a las cadenas L,  $\kappa$  tiene una única región constante y  $\lambda$  tiene entre 4-6 regiones distintas, productos de genes separados.  $C_{\kappa}$  y  $C_{\lambda}$  son particularmente similares, al igual que los dominios  $C_{\mu}1$ , ya que es probablemente el apareamiento con la cadena H lo que restringe su variabilidad. En general,  $\kappa$  y  $\lambda$  están más relacionadas entre sí y más conservadas entre las especies que las cadenas H.

La proporción  $\kappa/\lambda$  varía según las especies (por ejemplo, 70/30 en humanos, 95/5 en ratón) (Goding, 1983a), desconociéndose hasta el momento el mecanismo exacto para la expresión preferencial de estas cadenas.

### 3. REGIONES VARIABLES DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Las regiones variables (V) presentan una estructura típica de dominio, aunque su alta variabilidad y el gran número de genes que las codifican (alrededor de 1000) las diferencian de las regiones constantes.

Las regiones variables contienen cuatro zonas más conservadas denominadas regiones armazón (FR) y tres zonas hipervariables denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). El dominio está plegado de tal manera que las tres regiones CDR, que están separadas en la estructura primaria por las regiones FR, coinciden en el espacio, formando conjuntamente el sitio de unión para el antígeno tanto en las cadenas H como en las L.

Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  se pueden agrupar en familias. Dentro de cada familia hay más de un 75% de homología en la secuencia proteica. Entre las distintas familias suele haber una identidad del 50%. La existencia de familias y subfamilias es consecuencia de duplicaciones genéticas de genes ancestrales. Estas duplicaciones son más recientes en el caso de las subfamilias, en una situación análoga a lo que ocurre con las clases y subclases de las regiones constantes.

#### 4. CARBOHIDRATOS

Las Igs son glicoproteínas y, con algunas excepciones, la glicosilación está restringida a la región constante de la cadena pesada, aunque aproximadamente el 15% de las regiones  $V_H$  y algunas cadenas L están glicosiladas. La mayoría de los carbohidratos se encuentran adosados a la región bisagra y al dominio  $C_H2$  (Leatherbarrow et al., 1985).

En las Igs se encuentran grupos carbohidrato tipo N- y tipo O-. En la célula, el primer estadio de la glicosilación se produce cuando la cadena que está siendo sintetizada emerge al lumen del retículo endoplásmico. Los azúcares son añadidos en bloque a las asparraginas (unión tipo N-) por un donante dolicol-fosfato. La secuencia para la adición del azúcar a la asparragina es Asn-X-Ser/Thr. La unión de azúcares en N- es un proceso común a todas las glicoproteínas, que implica la adición de unidades preformadas de aproximadamente 1500 kDa de peso molecular ricas en manosas, que contienen también glucosa y N-acetil-glucosamina (Toraño et al., 1977; Goding, 1986).

La glicosilación en serina y treonina (tipo O-) no es común en las Igs, pero ocurre en la IgA, IgD e IgG<sub>2b</sub> (Toraño et al., 1977; Vasilov y Ploegh, 1982).

Los carbohidratos ricos en manosa suelen sufrir modificaciones en el aparato de Golgi, con la eliminación de glucosas y manosas y la adición de galactosa, fucosa y ácido siálico, por un conjunto de enzimas glicosil transferasas. Estas modificaciones son fenómenos bastante tardíos, que suceden previamente a la secreción de las Igs (Tartakoff y Vassalli, 1979).

El papel exacto de los carbohidratos en las Igs se desconoce. El hecho de que las clases homólogas de cadenas H

entre las especies hayan conservado una gran cantidad de los sustituyentes azucarados, está a favor de un importante papel estructural o funcional. En las Igs que presentan un mayor contenido de azúcares (IgE, IgM e IgA), éstos son importantes para su secreción y expresión en la membrana, mientras que, por ejemplo, la secreción de IgG, que contiene un único oligosacárido, no se altera prácticamente con inhibidores de la glicosilación (Hickman y Kornfeld, 1978).

En algunos casos, la inhibición de la glicosilación aumenta el grado de catabolismo intracelular de las cadenas H (Dulis et al., 1982). Se ha postulado que una de las principales funciones de la glicosilación es estabilizar las proteínas contra el ataque proteolítico (Olden et al., 1982). Así, por ejemplo, la región bisagra de la cadena  $\alpha 1$  contiene cinco sitios de glicosilación en una región de 27 aminoácidos (Putnam et al., 1979), lo cual le hace excepcionalmente resistente a la digestión por proteasas intestinales.

La eliminación de los carbohidratos en las Igs altera algunas funciones de estas moléculas. Se ha comprobado que las IgG deglicosiladas conservan su especificidad por el antígeno y la capacidad de unirse a la proteína A de Staphylococcus aureus, fenómeno este último que requiere la integridad de los dominios  $C_H2$  y  $C_H3$ . Sin embargo, estas Igs pierden o disminuyen su capacidad para unirse a los receptores Fc de los macrófagos, para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y para activar el complemento (parece que pueden unirse al componente C1q, pero disminuye mucho su capacidad de activación). Además, los complejos antígeno-anticuerpo que forman las Igs deglicosiladas se eliminan más tarde de la circulación que los formados con Igs glicosiladas (Koide et al., 1977; Nose y Wigzell, 1983; Leatherbarrow et al., 1985).

Los carbohidratos regulan también el catabolismo de las Igs; su eliminación del suero es modulada por la interacción de sus

porciones azucaradas con receptores específicos en el hígado (Winkelhake y Nicolson, 1976; Peppard et al., 1981).

## 5. FUNCIONES DE LAS INMUNOGLOBULINAS

La IgM es la Ig más primitiva filogenéticamente y es también la primera que aparece durante la ontogenia. Constituye alrededor del 5% de las Igs del suero adulto, y presenta un catabolismo rápido (Spiegelberg, 1974). La IgM tiene una forma monomérica como Ig de membrana y una forma polimérica como Ig de secreción. Como molécula de membrana en la superficie de las células B maduras, actúa formando parte del receptor para el antígeno, transmitiendo diversas señales de activación para estos linfocitos. La IgM sérica actúa como primera defensa en la inmunidad humoral, siendo el anticuerpo predominante en la respuesta inmune primaria. Esta IgM no exhibe un incremento de afinidad en el curso de la respuesta inmune (Gearhart et al., 1981), y su afinidad específica por el antígeno es relativamente baja, pero el hecho de que sea un pentámero permite interacciones múltiples con antígenos polivalentes con una alta avidéz. Los complejos antígeno-anticuerpo de este tipo activan la vía clásica del complemento muy eficientemente. Además, los complejos antígeno-anticuerpo-complemento son fagocitados por los macrófagos, principalmente a través de los receptores específicos para el componente C3b del complemento.

La IgD está presente fundamentalmente como receptor de superficie de las células B maduras junto con la IgM. Cuando estas dos Igs se coexpresan en una célula B, ambas presentan la misma región variable (Goding y Layton, 1976). Su principal función parece ser la de receptor del antígeno en los linfocitos B. La vida media de la IgD en suero es muy corta, y sus concentraciones bajísimas. Se ha sugerido que este fenómeno es

consecuencia de su extremadamente larga región bisagra, muy susceptible a la digestión proteolítica (Takahashi et al., 1982).

La IgG representa el 75% de las Igs séricas y es el anticuerpo predominante en la respuesta inmune secundaria. En algunas especies existen cuatro subclases de IgG, y todas pueden activar la vía clásica del complemento, aunque con distinta eficiencia. En los macrófagos, los mastocitos, los leucocitos polimorfonucleares y los linfocitos, hay receptores Fc específicos para las cuatro subclases de IgG (Kölsch et al., 1980), los cuales regulan varias funciones en estas células, como fagocitosis (Unkeless, 1977), liberación de factores solubles (Ishizaka et al., 1971) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La IgG es el único anticuerpo que atraviesa la placenta, a través de un receptor específico.

La IgA es el anticuerpo más abundante en las secreciones corporales. En ellas se presenta como un dímero, mientras que en el suero (10-15% de las Igs séricas) lo hace como un monómero. Es la primera línea de defensa frente a organismos que invaden a través de las mucosas. Su presencia en grandes cantidades en el calostro hace que sea una Ig básica en la transferencia de inmunidad materna al recién nacido (Underdown y Schiff, 1986).

La IgE representa menos del 0,01% del total de los anticuerpos circulantes, aunque en individuos atópicos o parasitados se incrementa su concentración. Los mastocitos y los basófilos expresan receptores de alta afinidad para las IgE (Metzger y Kinet, 1988). Ambos tipos celulares intervienen en los procesos alérgicos y en la inmunidad frente a los parásitos, liberando potentes factores quimiotácticos e inflamatorios.

## 6. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR DE LOS LINFOCITOS B

Los receptores específicos de antígeno en la superficie de los linfocitos B son estructuralmente casi idénticos a las moléculas de anticuerpo secretadas por la progenie de células B diferenciadas. Difieren de éstas en una región extra de aminoácidos en la cadena H que, desde el extremo más N-terminal, consta de una zona extracelular de aminoácidos ácidos, una región transmembranal y un segmento intracitoplásmico.

La expresión y la funcionalidad de las Igs de membrana (mIg) requieren la participación de moléculas accesorias (Hombach et al., 1990b). El transporte de la mIgM a la superficie de la célula B requiere la expresión de una proteína de 34 kDa (IgM- $\alpha$ ) (Hombach et al., 1988). También se ha demostrado la asociación de la mIgD con una proteína ligeramente mayor, de 35 kDa (IgD- $\alpha$ ) (Wienands et al., 1990). Las IgM- $\alpha$  e IgD- $\alpha$  son proteínas muy relacionadas que pueden ser productos de genes recientemente duplicados o el resultado de un procesamiento alternativo del gen *mb-1*, que codifica la IgM- $\alpha$  (Hombach et al., 1990a). Ambas moléculas tienen especificidad de isotipo, pero se desconocen las secuencias implicadas en esta especificidad.

Estas proteínas están unidas covalentemente a otros dos polipéptidos denominados Ig- $\beta$  e Ig- $\gamma$ , formando heterodímeros  $\alpha/\beta$  y  $\alpha/\gamma$  (Campbell y Cambier, 1990), aunque estos últimos se encuentran con menor frecuencia. Hay dos dímeros  $\alpha-\beta/\gamma$  por cada molécula de mIg. Sólo el dominio proximal a la membrana y la región transmembranal de la cadena H intervienen en la unión con el heterodímero, a través de enlaces no covalentes (Hombach et al., 1990b).

Las proteínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  pertenecen a la superfamilia de las Igs. Son moléculas transmembranales, con unas porciones intracitoplásmicas relativamente grandes. En estas zonas hay

varias serinas, treoninas y tirosinas susceptibles de ser fosforiladas. En los esplenocitos se ha comprobado la fosforilación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (Hombach et al., 1990b). Se ha sugerido que algunas tirosinas podrían ser los sustratos de la tirosina quinasa Lyn, la cual estaría asociada a los complejos  $\alpha$ - $\beta$ / $\gamma$  y se activaría por la unión de la mIg al antígeno. Los dímeros  $\alpha$ - $\beta$ / $\gamma$  actuarían acoplado físicamente la mIg a la quinasa o a otras estructuras citoplásmicas (Cambier, 1991).

Cuando se produce un entrecruzamiento de las mIgs en la membrana de la célula B en reposo por efecto del antígeno o de anticuerpos anti-Igs, se generan unas señales químicas intracelulares que normalmente conducen a la activación de la célula. La proliferación y diferenciación de los linfocitos B requiere, en la mayoría de los casos, la existencia de otras señales, que le llegan a través de un contacto directo con las células T y a través de factores solubles producidos por estos linfocitos T (Noelle y Snow, 1990).

El entrecruzamiento en la membrana de las mIgs va seguido de la activación de una fosfodiesterasa citosólica específica de fosfatidilinositoles (Harris y Cambier, 1987), la cual hidroliza un fosfolípido de membrana, produciendo inositol polifosfato y diacilglicerol (DAG). Estas moléculas actúan como segundos mensajeros dentro de la célula (Cambier y Ransom, 1987), mediando el aumento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la activación de la proteína quinasa C (PKC). El inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) estimula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares. La PKC citosólica, por acción del DAG y del  $\text{Ca}^{2+}$ , se trasloca a la membrana, donde fosforila diversos sustratos. Posteriormente, su actividad decrece en la membrana y aumenta en la fracción detergente-insoluble de la célula, actuando sobre sustratos nucleares y citoplasmáticos.

Se ha sugerido que las proteínas G están implicadas en la conexión funcional de la mIg con la fosfodiesterasa citosólica

(Campbell et al., 1990). Sin embargo, el hecho de que todas las subunidades asociadas a las mIgs ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y otras proteínas se fosforilen en tirosina inmediatamente después de producirse el entrecruzamiento de las mIg en la membrana (Gallagher y Cambier, 1990), cuestiona la primacía de las proteínas G y el metabolismo de los fosfatidilinositoles en la activación de las células B, y afianza la idea de la activación a través de proteínas tirosina quinasas.

## 7. BIOSÍNTESIS, ENSAMBLAJE Y TRANSPORTE DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Las cadenas H y L nacientes contienen una secuencia señal en la zona N-terminal que les permite ser traslocadas desde el ribosoma al retículo endoplásmico rugoso (RER). La forma de membrana de las cadenas H se inserta en la membrana del RER, mientras que las formas de secreción de las cadenas H, así como las cadenas L, se secretan en la cisterna del RER. La adición de los oligosacáridos ricos en manosa a las cadenas H ocurre durante esta traslocación (Tartakoff y Vassalli, 1979). Muy pronto, las cadenas H y L empiezan a ensamblarse en el RER y forman puentes disulfuro intercatenarios, probablemente a través de un proceso enzimático. En algunos casos, el ensamblaje es HH $\rightarrow$ HHL $\rightarrow$ LHHL, y en otros, HL $\rightarrow$ LHHL. La mayoría de las células productoras de anticuerpos producen un exceso de cadenas L, lo cual favorece su unión con las cadenas H (Goding, 1983a).

Cuando las cadenas se ensamblan completamente en forma de monómeros, la molécula de Ig se transporta al aparato de Golgi, donde sus carbohidratos sufren un procesamiento (Tartakoff y Vassalli, 1979), y posteriormente son enviadas a la membrana plasmática para su secreción. La polimerización de la IgM y la IgA se produce previamente a su secreción (Cattaneo y Neuberger, 1987), y se desconoce el momento en que se unen con la cadena J (Davis y Schulman, 1989). La glicosilación de las cadenas  $\mu$

parece ser fundamental para la polimerización, y alteraciones en el procesamiento terminal de los oligosacáridos en el aparato de Golgi o en la adición de azúcares en N-, conducen a la formación de IgM monomérica (Davis et al., 1989; Muraoka y Schulman, 1989).

Otros autores han sugerido que la polimerización de la IgM se lleva a cabo en el RER, y es mediada por receptores que reconocen específicamente la forma secretora del monómero y la cadena J, situados en el lumen del RER (Koshland, 1989). Se cree que este receptor podría ser la sulfidril oxidasa que catalizaría la polimerización. Estudios citológicos han identificado IgM pentamérica en el RER, y se ha demostrado que la polimerización no es bloqueada por drogas que interfieren el tránsito de proteínas desde el RER al aparato de Golgi, o el tránsito a través del aparato de Golgi. Este esquema, sin embargo, no explica los bajos niveles de IgM pentaméricas intracelulares encontradas en las células plasmáticas, en proporción con el número de moléculas secretadas.

El transporte de proteínas desde el RER al aparato de Golgi es regulado por señales de transporte inherentes a la molécula (Lodish et al., 1983). Se ha sugerido que las señales de transporte de las Igs son las cadenas L, ya que las cadenas L libres son secretadas, mientras que las cadenas H no lo son hasta que no se combinan con las cadenas L (McCune y Fu, 1981).

Cuando las cadenas H están siendo sintetizadas y secretadas al lumen del RER, se combinan por su dominio C<sub>H</sub>1 con una proteína de 78 kDa denominada BiP. Esta proteína fue descrita inicialmente en una línea de mieloma como una molécula asociada a las cadenas H, pero posteriormente ha sido identificada como un miembro de la familia de las proteínas reguladas por glucosa, las cuales se unen transitoriamente, a través de enlaces no covalentes, con un gran número de proteínas de secreción, en un amplio rango de tipos celulares (Hendershot et al., 1987).

Las cadenas H asociadas a BiP permanecen en el RER y no son secretadas ni incorporadas a la membrana plasmática hasta que no se encuentran totalmente ensambladas con las cadenas L, que desplazan a BiP en su unión con las cadenas H. BiP se ha encontrado asociada a formas parcialmente ensambladas de Igs ( $H_2$ ,  $H_2L$ , HL). En ausencia de síntesis o ensamblaje de las cadenas L, las cadenas H permanecen asociadas a BiP y pueden, ocasionalmente, ser degradadas (Hendershot et al., 1987).

## **8. HETEROGENEIDAD DE LAS INMUNOGLOBULINAS**

La variabilidad genética de las Igs se puede clasificar en tres tipos: variantes isotípicas, alotípicas e idiotípicas.

Las variantes isotípicas están codificadas por genes presentes en todos los miembros sanos de una especie. Los epítomos que definen los isotipos se localizan generalmente en las regiones constantes de las cadenas H y L. El isotipo de una Ig viene determinado por la clase o subclase de su cadena pesada ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ó  $\alpha$ ) y por el tipo o subtipo de su cadena ligera ( $\kappa$  ó  $\lambda$ ). Dentro de las regiones variables de las cadenas H y L, hay zonas altamente conservadas en sus regiones FR, y variaciones en estas zonas también definen isotipos en ambas cadenas.

Un alotipo es un marcador alélico para un locus determinado de una Ig que segrega de forma mendeliana. Los determinantes alotípicos se encuentran sólo en las Igs de algunos individuos dentro de una especie. Estas variantes se localizan fundamentalmente en las regiones constantes de las cadenas H y L, aunque también se han descrito alotipos en las regiones variables.

Los idiotipos son marcadores antigénicos localizados en las regiones hipervariables de las Igs (en el sitio de combinación

Tesis presentada por M<sup>a</sup> Carmen Sánchez  
Torres para optar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas por la Universidad  
Complutense de Madrid.

*Carmen Sánchez*

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el  
Departamento de Sanidad Animal del Centro de  
Investigación y Tecnología del Instituto  
Nacional de Investigaciones Agrarias, bajo la  
dirección del Dr. Francisco Javier Domínguez  
Juncal.

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup>

*F. J. Domínguez Juncal*

molecular (160-210 kDa), aunque en el suero puedan existir como formas de alto peso molecular (Raison et al., 1978a). En general, se considera que el sistema inmune humoral en los ciclóstomos está poco desarrollado. Los niveles de Igs séricas son muy bajos, y se necesitan largos períodos de inmunización para inducir anticuerpos específicos, incluso a elevadas temperaturas, si bien son capaces de producir anticuerpos frente a una gran variedad de antígenos (Raison et al., 1978b).

Dentro de los ciclóstomos, se ha descrito con mayor detalle la estructura de las Igs de dos especies del género Eptatretus.

En E. burgeri, Kobayashi et al. (1985a) han descrito Igs de bajo peso molecular (150-160 kDa), que contienen un tipo de cadenas H y dos cadenas L con diferente peso molecular. Estas Igs tienen una estructura muy lábil, y en SDS-PAGE en condiciones no reductoras se disocia en varios componentes con un peso molecular heterogéneo.

En la especie E. stoutii, Hanley et al. (1990) han descrito Igs en forma de monómeros de 210 kDa, las cuales contienen dos subclases de cadenas H ( $H_1 = 77$  kDa y  $H_2 = 70$  kDa). Estas cadenas difieren antigénicamente, en sus mapas peptídicos y en su secuencia N-terminal. Curiosamente, ninguna de ellas está glicosilada. Esta especie posee un solo tipo de cadenas L, de 30 kDa. Sólo un pequeño porcentaje de todos los monómeros está completamente unido por enlaces covalentes. Las uniones covalentes predominantes son HHL y HL. Dentro de los monómeros, se encuentran a veces heterodímeros  $H_1-H_2$ , lo que sugiere una carencia o una reducida eficiencia de exclusión alélica en los linfocitos B. E. stoutii es el vertebrado más primitivo donde se ha propuesto la existencia de subclases de cadenas H.

## Condriictios

La mayoría de los peces cartilaginosos poseen dos formas de Igs séricas: una forma de alto peso molecular, semejante a la IgM de mamíferos, y una forma de bajo peso molecular, monomérica, que no se diferencia antigénicamente de la primera. Hay, sin embargo, algunas excepciones interesantes.

En el pez rata, Callorhinchus callorhinchus, un representante de los holocéfalos, sólo se ha descrito la forma de alto peso molecular, con una estructura pentamérica que posee las propiedades básicas de una IgM. Contiene una cadena H de 71 kDa, una cadena L de 22 kDa y una cadena J de 16 kDa (Sánchez et al., 1980). La cadena L tiene un 75% de homología en su secuencia con la cadena  $\lambda$  del pollo (De Ioannes y Águila, 1989).

Dentro de los elasmobranquios, en todas las especies de rajiformes analizadas se ha descrito la existencia de dos isotipos de Igs. Una de ellas presenta una estructura pentamérica, con 840 kDa de peso molecular y un coeficiente de sedimentación 18S. Su cadena H (71 kDa) tiene las características de la cadena  $\mu$  de mamíferos. La otra Ig es dimérica; tiene 320 kDa de peso molecular y un coeficiente de sedimentación 9S. Su cadena H tiene un peso molecular de 45-50 kDa, y es antigénicamente distinta de la cadena de 70 kDa (Kobayashi et al., 1984). Se ha propuesto el nombre de IgR para esta Ig, ya que está presente en todos los rajiformes estudiados y no se tienen datos de secuencia como para equipararla con ninguna clase de mamíferos (Kobayashi y Tomonaga, 1988). Las dos Igs comparten un mismo tipo de cadenas L, de 23 kDa. Sólo en la forma de alto peso molecular se ha descrito la existencia de una cadena J, de 17,5 kDa (Tomonaga y Kobayashi, 1985; Hagiwara et al., 1985).

Estas dos Igs están producidas por poblaciones celulares distintas en todos los órganos linfoides. La proporción de estas poblaciones en dichos órganos es 1:1, mientras que en la sangre,

la proporción 18S:9S es de 5:1 (Tomonaga et al., 1984). En bazos de embriones de Bathyrāja aleutica, se ha encontrado una alta proporción de células dobles positivas para los dos tipos de Igs, cuyo número disminuye notablemente con el desarrollo, y de las cuales se desconoce su significado (Tomonaga y Kobayashi, 1985; Kobayashi et al., 1985b).

El resto de las especies de elasmobranquios analizadas presentan grandes similitudes en la estructura de sus Igs. Contienen dos Igs séricas: una pentamérica 18-19S y una monomérica 7S. Las dos parecen compartir la misma cadena H, que tiene un peso molecular de 68-76 kDa (Frommel et al., 1971; Klapper y Clem, 1977; Morrow et al., 1983; Rosenshein y Marchalonis, 1987). En el tiburón nodriza, Ginglymostoma cirratum, se han descrito dos cadenas H para las Igs 7S: una de 70 kDa y otra de 50 kDa (Fuller et al., 1978), pero esta última no ha sido caracterizada posteriormente.

Tanto las Igs 19S como las Igs 7S comparten un solo tipo de cadenas L, cuyo peso molecular varía entre 18-25 kDa según las especies (Litman et al., 1980; Marchalonis et al., 1988), aunque en el tiburón Heterodontus japonicus se han descrito dos cadenas L con diferente peso molecular (Tomonaga et al., 1985).

Se ha desechado la posibilidad de que la forma 7S sea un producto del metabolismo de la forma 19S (Klapper y Clem, 1977), y no se conoce una función específica para esta Ig.

### Osteictios

En el suero de todos los peces de esqueleto óseo estudiados hasta la fecha se han detectado Igs de alto peso molecular (Trump, 1970; Ingram y Alexander, 1979; Voss et al., 1980; Kobayashi et al., 1982; Håvarstein et al., 1988; Fuda et al., 1989). En los peces teleósteos son Igs tetraméricas, que contienen cadenas pesadas con las mismas características de

movilidad electroforética que las cadenas  $\mu$  de mamíferos. Estas cadenas H suelen estar muy glicosiladas, y su peso molecular varía, según las especies, entre 68-79 kDa. El peso molecular de las cadenas L oscila entre 22-27 kDa.

En algunas especies, se ha demostrado que estas Igs de alto peso molecular no siempre tienen unidas covalentemente sus subunidades, y en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, las Igs tetraméricas se resuelven en varias bandas, con distintos patrones según la especie analizada. En el salmón chum (*Oncorhynchus keta*), el tetrámero se disocia en cuatro bandas con pesos moleculares correspondientes a un tetrámero, trímero, dímero y monómero de una Ig (Kobayashi et al., 1982). En un teleosteo marino, el sargo (*Archosargus probatocephalus*), se ha descrito la existencia de Igs tetraméricas, diméricas y monoméricas, y los tres tipos se disocian en las condiciones arriba mencionadas; las Igs tetraméricas producen tetrámeros, dímeros y monómeros; las Igs diméricas producen monómeros y las Igs monoméricas se disocian en pares H-L (Lobb y Clem, 1981a,b,c). En el pez gato (*Ictalurus punctatus*), las Igs tetraméricas se disocian en ocho subpoblaciones, formadas por combinaciones de uniones no covalentes entre pares H-L, que siempre se encuentran covalentemente unidos (Lobb y Clem, 1983).

No está clara la existencia de Igs de bajo peso molecular en los peces teleosteos. En especies como el pez gato, se ha sugerido su existencia (Acton et al., 1972), pero no ha sido confirmada en estudios posteriores (Lobb y Clem, 1983). En algunos ciprínidos (carpa -*Cyprinus carpio*-, carpín -*Carassius auratus*- y tenca -*Tinca tinca*-) y salmónidos (trucha arcoiris), se ha descrito la existencia de hemaglutininas de bajo peso molecular que no han sido bien caracterizadas (Hodgins et al., 1967; Vilain et al., 1984), aunque en el caso de la trucha arcoiris, trabajos posteriores parecen confirmar la presencia de Igs monoméricas (Elcombe et al., 1985). En otras especies, la existencia de Igs monoméricas se ha demostrado claramente, como

en el mero (Epinephalus itaira) (Clem, 1971), el corocoro (Haemulon album) (Clem y McLean, 1975), el sargo (Lobb y Clem, 1981a), el pez globo (Spheroides glaber) (Warr, 1983) o en un representante de la subclase de los dipnoos, Protopterus aethiopicus (Litman et al., 1971). En general se considera que esta Ig de bajo peso molecular no es un precursor ni un producto de degradación de la Ig tetramérica (Clem y McLean, 1975; Lobb y Clem, 1981d).

En el pez gato, mediante el uso de anticuerpos monoclonales (ACM), se ha podido demostrar la existencia de, al menos, cuatro isotipos de cadenas pesadas y dos de cadenas ligeras (Lobb et al., 1984; Lobb y Olson, 1988).

Las cadenas L se han designado como F y G. La primera comprende un 60% de la población total de cadenas ligeras, y aparece como dos bandas de 22 y 24 kDa. La segunda comprende el 40% restante y tiene un peso molecular de 26 kDa. Se ha comprobado que algunos antígenos potencian la expresión de una cadena sobre la otra. Los anticuerpos producidos en el pez gato frente al hapteno dinitrofenil (DNP), contienen preferentemente cadenas L del tipo F, mientras que otros haptenos, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), no potencian la expresión de ninguna cadena L en particular (Lobb, 1986).

En el salmón del Atlántico (Salmo salar), se han descrito también dos cadenas L con diferentes pesos moleculares (Håvarstein et al., 1988), pero no se han realizado estudios antigénicos suficientes como para designarlas tipos distintos de cadenas L.

Los cuatro isotipos de cadenas H en el pez gato tienen los mismos pesos moleculares y, hasta el momento, no se ha descrito en qué zonas de la molécula residen las diferencias antigénicas (Lobb y Olson, 1988). Tres de los isotipos se han identificado con ACM, y representan cada uno alrededor del 20% de la población

total de Igs. El porcentaje restante de cadenas H, que no es reconocido por ningún AcM determinado, se considera que contiene, al menos, un cuarto isotipo. Los autores no descartan que las diferencias isotópicas reconocidas por los tres anticuerpos puedan residir en la región variable, ya que las regiones FR1 de las tres cadenas presentan diferencias considerables. Los tres isotipos no se diferencian en su capacidad para fijar complemento (Lobb y Hayman, 1989), pero sí parecen expresarse diferencialmente, al igual que las cadenas L, en respuesta a determinados antígenos. Se ha comprobado que uno de los isotipos es predominante en la respuesta inmune anti-DNP, aunque se expresan también las otras dos cadenas (Lobb y Olson, 1988).

En el salmón del Atlántico, se ha propuesto también la existencia de isotipos de cadenas H debido a la distinta reactividad de un panel de AcM frente a anticuerpos específicos anti-NIP (ácido 4-hidroxi, 3-Iodo, 5-nitrofenil acético) (Killie et al., 1991).

La existencia de cadenas pesadas distintas de las cadenas  $\mu$  ha sido descrita en algunos trabajos. Algunas especies pertenecientes a la subclase de los dipnoos tienen Igs 7S cuyas cadenas H son antigénicamente distintas a las de sus Igs de alto peso molecular 19S (Litman et al., 1971). En el sargo, las Igs monoméricas contienen una cadena H de 45 kDa, que es antigénicamente similar a la cadena  $\mu$  asociada a las Igs tetraméricas (Lobb y Clem, 1981a). En este mismo teleosteo marino, se han encontrado Igs diméricas en la bilis, cuyas cadenas H tienen distintas propiedades de peso molecular (55 kDa) y de unión a la proteína A que la cadena  $\mu$  sérica (Lobb y Clem, 1981c). Las Igs monoméricas del pez globo contienen dos cadenas H, una de 70 kDa, y otra que presenta una movilidad electroforética más lenta (el autor no detalla su peso molecular), aunque ambas presentan reacción cruzada con la cadena  $\mu$  de sus Igs tetraméricas (Warr, 1983). En la trucha arcoiris, Elcombe et al. (1985) han definido la existencia de Igs

monoméricas cuyas cadenas H presentan diferencias en su peso molecular, mapas peptídicos y reactividad frente a antisueros de conejo, con respecto a las cadenas  $\mu$  de las Igs tetraméricas.

La existencia de cadena J en las Igs tetraméricas de los teleósteos se ha descrito en algunas especies, como el pez gato (Mestecky et al., 1975) o el sargo (Lobb y Clem, 1981a). En ambos casos, se trata de una molécula de bajo peso molecular, con una rápida movilidad anódica en electroforesis en presencia de urea, característica de la cadena J de los vertebrados superiores. En especies como el pez de pico (*Lepisosteus osseus*; Condrósteo), el pez espátula (*Polyodon spathula*; Holósteo) o el salmón chum, no se ha encontrado una molécula con estas características (Weinheimer et al., 1971; Kobayasi et al., 1982), aunque los autores no descartan la existencia de cadenas J con distintos patrones electroforéticos.

En algunas especies de peces se han encontrado Igs presentes en secreciones, como el mucus cutáneo, el mucus intestinal y la bilis. En algunos casos, estas Igs tienen una estructura muy similar a las Igs tetraméricas del suero. En el pez gato, Ourth (1980) ha descrito una Ig 14S en el mucus cutáneo, con actividad aglutinante y bactericida. También en el mucus cutáneo del sargo se han encontrado Igs tetraméricas, así como una subpoblación de Igs diméricas, algunas de las cuales parecen llevar unida una molécula de 95 kDa, que los autores describen como un posible componente secretor. Las dos poblaciones de Igs (tetrámeros y dímeros) contienen cadenas H y L idénticas a las observadas en las IgM séricas (Lobb y Clem, 1981b). En las secreciones biliares de este mismo pez, se han encontrado exclusivamente Igs diméricas; no llevan ninguna molécula asociada que pudiera considerarse un componente secretor, pero sus cadenas H difieren en peso molecular (55 kDa) de las Igs séricas, así como en su capacidad de unirse a células de *Staphylococcus aureus* (Lobb y Clem, 1981c).

## 10. ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN OTROS VERTEBRADOS

En el nivel filogenético de los anfibios, con la transición de la vida acuática a la terrestre, aparece un tipo de Ig de bajo peso molecular, la cual también está presente en los reptiles y las aves, denominada IgY. Dicha denominación fue originalmente usada por Leslie y Clem (1969) para designar la Ig 7S del pollo. La IgY se considera precursora de la IgA de mamíferos por sus similitudes en la secuencia de aminoácidos (Hädge y Ambrosius, 1984; Hädge y Ambrosius, 1986).

La IgY es una Ig monomérica, cuya cadena pesada ( $\nu$ ) tiene un peso molecular similar al de la cadena  $\alpha$  de la IgA (60-69 kDa), pero conserva la estructura de cuatro dominios constantes (las Igs con tres dominios constantes y una región bisagra se encuentran sólo en los mamíferos). La cadena  $\nu$  está muy poco glicosilada, al igual que las cadenas  $\gamma$  de las IgG de los mamíferos. A pesar de su similitud estructural con la IgA, la IgY no es una Ig predominante en las secreciones. A nivel fisiológico, la IgY se considera el equivalente a la IgG de los mamíferos, ya que se produce principalmente en las respuestas inmunes secundarias, su síntesis es timo-dependiente y no aparece en las secreciones (Hadji-Azimi y Parrinello, 1978; Du Pasquier et al., 1989). La IgY tiene algunas características peculiares en anfibios y reptiles. Aunque se produce principalmente en la respuesta inmune secundaria, nunca reemplaza a la IgM como principal anticuerpo, y ambas se coexpresan durante este tipo de respuesta (Hadji-Azimi y Parrinello, 1978). Además, una alta proporción de células expresan los dos isotipos conjuntamente (Hadji-Azimi y Parrinello, 1978; Du Pasquier et al., 1989; Andreas y Ambrosius, 1989).

En los anfibios urodelos donde se ha descrito, la IgY no es una Ig timo-dependiente, y parece que es sintetizada por una

subpoblación de células B que está permanentemente activada (Fellah y Charlemagne, 1988).

En algunas especies, además de la IgY, se han descrito otros isotipos de Igs. En el anfibio anuro Xenopus laevis, este tercer isotipo se ha designado como IgX (Hsu et al., 1985). Es una Ig polimérica, muy glicosilada, con un peso molecular mayor que el de la IgM, probablemente debido al mayor peso de su cadena H (80 kDa). Se sintetiza en las células esplénicas y en las células de la mucosa intestinal y, aunque sus características funcionales están más próximas a las de la IgM que a las de la IgY (Hsu et al., 1985), su contribución a la respuesta inmune es hasta el momento desconocida (Du Pasquier et al., 1989).

En las aves galliformes, se ha descrito una Ig predominante en las secreciones, designada como IgB (Kobayashi e Hirai, 1980; Hädige y Ambrosius, 1984; Hädige y Ambrosius, 1986; Hädige y Ambrosius, 1988). Sus cadenas H tienen un peso molecular de 64-67 kDa, y se presenta siempre como un trímero que lleva unida una cadena J. La presencia del componente secretor no se ha confirmado de forma concluyente (Kobayashi e Hirai, 1980). La IgB no presenta similitudes antigénicas con la IgA de los mamíferos (Hädige y Ambrosius, 1984).

Algunos miembros de las aves anseriformes, como el ánade real (Anas platyrhynchos), poseen dos formas moleculares de IgY. Una es homóloga a la IgY del pollo (7,8S), y su cadena pesada tiene probablemente cuatro dominios constantes. La segunda forma es la predominante en el suero; su coeficiente de sedimentación es de 5,7S, y su cadena pesada tiene un peso molecular de 37 kDa, lo cual sugiere que contiene sólo tres dominios, uno variable y dos constantes (Higgins et al., 1991).

En algunas especies de reptiles y aves se han encontrado otras Igs monoméricas, antigénicamente distintas de la IgY, pero

no han sido suficientemente caracterizadas (Hädge y Ambrosius, 1984).

La existencia de distintos tipos de cadenas L ha sido claramente demostrada en algunas especies de anfibios, reptiles y aves (Saluk et al., 1970; Leslie, 1977; Du Pasquier et al., 1989). En ciertos casos, se han encontrado cadenas L asociadas preferentemente con determinadas clases de cadenas H (Hsu y Du Pasquier, 1984).

## 11. ORGANIZACION GENETICA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN LA EVOLUCIÓN

Las Igs están codificadas por un extenso y complejo sistema multigénico que experimenta fenómenos de reorganización somática en los linfocitos B (Tonegawa, 1983). Este proceso de reordenamiento somático parece restringirse únicamente a las familias multigénicas de las Igs y de los receptores de los linfocitos T (TCR).

La organización de los genes de los mamíferos que codifican las cadenas H de las Igs está bien caracterizada (Tonegawa, 1983). En las células de la línea germinal, los segmentos génicos variables ( $V_H$ ), de unión ( $J_H$ ), de diversidad (D) y constantes ( $C_H$ ) están organizados en tándem, siguiendo el patrón  $V_{H1}-V_{Hn}----D_1-D_m--$   
 $-J_{H1}-J_{Hx}-----C\mu-C\delta-C\gamma-C\epsilon-C\alpha$ . El locus IgH comprende varios millones de pares de bases, siendo los segmentos V los más numerosos (normalmente existen varios cientos de genes  $V_H$ ), mientras que hay pocos genes J, D y C. Las regiones determinantes de complementariedad 1 y 2 (CDR1 y CDR2), y las tres primeras regiones FR están codificadas por los segmentos V, mientras que CDR3 es producto de la unión de los tres segmentos V, D y J. FR4 está codificada por los genes J.

En los mamíferos hay dos loci para las cadenas L. Sus regiones variables están codificadas por segmentos V y J. Para las cadenas  $\kappa$  hay un solo segmento C y varios para las cadenas  $\lambda$ , aunque este locus está menos estudiado, y estas características pueden variar según las especies analizadas.

Durante el desarrollo de los linfocitos B, elementos individuales  $V_H$ , D y  $J_H$  se recombinan mediante un proceso en el que intervienen unas secuencias cortas de nucleótidos, denominadas secuencias señales de recombinación (SSR), y una recombinasa. Las combinaciones en las uniones entre los diferentes segmentos amplifican enormemente la diversidad de la respuesta inmune primaria, que es expandida posteriormente por uniones imprecisas entre los segmentos recombinados, por la adición de nucleótidos en esta misma zona en una forma independiente de templete, y por mutaciones somáticas (Tonegawa, 1983; Blackwell y Alt, 1988). El primer segmento C que se utiliza para formar la cadena pesada es el  $\mu$ , seguido del  $\delta$ . Durante la respuesta inmune secundaria se suele producir un cambio de isotipo, y las Igs unen su región variable reordenada a otro segmento C, normalmente por un proceso de recombinación (Esser y Radbruch, 1990).

Los vertebrados más primitivos en los que se han identificado los genes que codifican sus Igs son los elasmobranquios. Estos estudios se extienden a representantes de todas las clases de vertebrados existentes con excepción de los vertebrados agnatos. En este último grupo, se ha demostrado que sus Igs están compuestas por dos tipos de polipéptidos, comparables en masa a las cadenas L y  $\mu$  de las Igs (Raison et al., 1978a; Kobayashi et al., 1985a). Además, estas cadenas expresan una heterogeneidad de carga comparable a las Igs de los elasmobranquios (Marchalonis et al., 1988) y de los mamíferos (Marchalonis y Schluter, 1989a). La composición de aminoácidos de las cadenas H y L y los datos de secuencia parcial de aminoácidos indican que las Igs de los vertebrados agnatos están

formadas probablemente por el reordenamiento de segmentos V, J y C (Marchalonis y Schluter, 1989a).

En los elasmobranquios, se ha descrito un ordenamiento de los genes para el locus H distinto del encontrado en los mamíferos (Hinds y Litman, 1986). En el tiburón astado (Heterodontus francisci), los segmentos génicos se disponen en agrupamientos discretos  $V_H$ -D- $J_H$ - $C_H$ . Cada agrupamiento o "cluster" ocupa alrededor de 16 Kb, y posiblemente existen cientos de "clusters" distintos. Tanto los segmentos  $V_H$ , como los  $C_H$ , están muy relacionados entre sí, mostrando homologías en la secuencia de nucleótidos del 86% para los  $V_H$  (Kokubu et al., 1988b) y del 90% para los  $C_H$  (Kokubu et al., 1988a). Debido al alto grado de homología en los segmentos  $V_H$ , se considera la existencia de una sola familia génica en Heterodontus. En cambio, a pesar de la alta homología existente entre los distintos segmentos  $C_H$ , se ha sugerido que existen dos familias principales de genes  $C_H$  en este tiburón (Litman et al., 1990).

La variabilidad de los segmentos  $J_H$  es también muy pequeña. Sin embargo, los segmentos D son una fuente muy importante de variabilidad en las Igs de Heterodontus. Es muy frecuente la presencia de dos elementos D dentro de un mismo "cluster". Pueden ser leídos potencialmente en las tres pautas de lectura, y parece que todas son utilizadas (Kokubu et al., 1988b). Además, las longitudes de los segmentos D que son retenidos en los genes reordenados son variables. En una gran parte de los "clusters", los segmentos  $V_H$  y D o los  $V_H$ , D y  $J_H$  aparecen unidos; estos genes pueden representar especificidades predeterminadas, utilizadas en diferentes estadios de desarrollo, o bien ser genes inactivos que podrían ser utilizados en procesos de conversión génica o de recombinación secundaria (Litman et al., 1990).

La organización de los genes  $C_H$  en Heterodontus es muy similar a la de los mamíferos. Cada uno de ellos contiene cuatro exones que codifican los cuatro dominios constantes de la cadena

pesada, y dos exones (TM1 y TM2) que codifican una secuencia de aminoácidos presente sólo en las Igs de membrana. Los mecanismos de procesamiento diferencial del mRNA, encargados de regular la transcripción de Ig secretora frente a la Ig de membrana, son muy similares a los de los mamíferos (Kokubu et al., 1988a).

Las cadenas H de Heterodontus contienen 8 sitios potenciales de N-glicosilación, dos de los cuales son únicos comparados con otras especies, por su situación en el extremo C-terminal del dominio C<sub>H</sub>4. La distribución de las cisteínas presenta diferencias significativas con respecto a la de los mamíferos en los exones 2 y 3, lo que sugiere la existencia de un patrón distinto de puentes disulfuro entre las cadenas H o entre los monómeros. Las cisteínas que unen covalentemente cadenas H y L y las que forman los puentes dentro del dominio están muy conservadas (Kokubu et al., 1988a).

La mayoría de las secuencias reguladoras de la recombinación y de la transcripción presentes en mamíferos, se encuentran también en los genes H de Heterodontus. Los segmentos V, D y J contienen secuencias SSR, los segmentos C incluyen sitios aceptores y donantes de procesamiento postranscripcional, señales de poliadenilación y codones de parada de la transcripción. Hay dos excepciones: 1) el locus H carece del octámero regulador localizado en posición 5' respecto al sitio del inicio de la transcripción, que se ha encontrado en todos los genes V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> caracterizados (Kokubu et al., 1988b), y 2) no se han encontrado secuencias de cambio de clase asociadas con los genes C<sub>H</sub>.

Las cadenas L en Heterodontus están organizadas en "clusters" de genes V<sub>L</sub>, J<sub>L</sub> y C<sub>L</sub>, con un tamaño < 2,7 Kb. Hasta el momento, sólo se han obtenido las secuencias completas de dos genes de las cadenas L (Shamblott y Litman, 1989a). Hay una alta homología entre ambos genes, tanto en las secuencias codificantes como en las no codificantes. Los segmentos V<sub>L</sub> están muy relacionados entre sí; las secuencias FR1 son idénticas a las

FR3, y hay tres nucleótidos de diferencia con FR2. Las secuencias  $J_L$  y  $C_L$  son idénticas en estos dos genes (Shamblott y Litman, 1989a), aunque no se descarta la existencia de una gran familia de genes L no relacionados con los segmentos  $V_L$  y  $C_L$  encontrados. Se ha sugerido que el sistema genético L es más moderno que el sistema H, ya que los genes L tienen el octámero regulador ausente en los genes H (Shamblott y Litman, 1989b).

Las secuencias de aminoácidos de los segmentos  $C_L$  de Heterodontus están más relacionados con las cadenas  $\lambda$  de vertebrados superiores que con las  $\kappa$ , aunque la mayor homología se ha observado con la cadena  $\beta$  del receptor de los linfocitos T de los mamíferos (Shamblott y Litman, 1989b). Este mismo fenómeno se da en los segmentos  $C_L$  secuenciados de otro tiburón, Carcharinus plumbeus (Warr et al., 1990)

El ordenamiento genómico de las cadenas H y L sugiere que la diversidad de anticuerpos en los los tiburones puede estar restringida a un reordenamiento combinatorio dentro de cada "cluster" individual, dejando abierta la posibilidad para reordenamientos ocasionales entre los "clusters". Las principales fuentes de diversidad de anticuerpos serían, por lo tanto, el gran número de genes presentes en la línea germinal y las imprecisiones en las uniones de los segmentos reordenados (diversidad en la región N).

A diferencia de la organización en "clusters" de los elasmobranquios, los peces teleósteos presentan los genes de las Igs como loci génicos extendidos de segmentos  $V_H$ ,  $J_H$  y, presumiblemente, D, dispuestos en tándem, y unidos a una o a varias regiones constantes. Por lo tanto, en los teleósteos, los reordenamientos combinatorios son una fuente fundamental de generación de diversidad (Amemiya y Litman, 1990). Los peces teleósteos son, además, los representantes filogenéticos más primitivos que han desarrollado extensas familias génicas para la región variable. En el pez gato, se ha descrito la existencia

de, al menos, cinco familias  $V_H$ , con más de 100 genes  $V_H$  diferentes (Ghaffari y Lobb, 1991). En el pez dama, Elops saurus, se han encontrado dos familias, con un 50% de identidad entre sus miembros (Amemiya y Litman, 1990). En la trucha arcoiris, se ha descrito recientemente una familia  $V_H$  que presenta una complejidad sustancial en la línea germinal (Matsunaga y Törmanén, 1990). En el bacalao del Atlántico (Gadus morhua), se han definido tres familias de genes  $V_H$  (Bengtén y Pilström, 1991).

Se ha descrito la existencia de cinco segmentos  $J_H$  en el pez gato y de dos en el pez dama. En ninguno de los casos se ha demostrado la presencia de genes  $D$ , pero se ha sugerido su existencia por la longitud de los espaciadores (23 pb) de las secuencias SSR en las posiciones 3' y 5' de los segmentos  $V_H$  y  $J_H$ , respectivamente, así como por la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR3.

En el pez gato, la diversidad de secuencia entre los miembros de las familias  $V_H$  es similar a la del hombre o el ratón (Ghaffari y Lobb, 1991). Entre miembros de distintas familias, la secuencia FR2 es la más conservada (60-93% de homología), y generalmente FR3 está más conservada que FR1. Las regiones CDR son, lógicamente, las que presentan mayor diversidad; CDR1 presenta una homología del 25-60% entre las distintas familias, mientras que CDR2 oscila entre el 35-64% (Ghaffari y Lobb, 1991). Las secuencias  $J_H$  identificadas, que codifican los 4 últimos aminoácidos de CDR3 y la región FR4, son altamente homólogas con los segmentos  $J_H$  de otros vertebrados. Comparten un 70% de homología en la secuencia de nucleótidos con los segmentos  $J_H$  del ratón, del hombre y de los tiburones.

Los segmentos  $C_H$  del pez gato, del pez dama y del bacalao del Atlántico, tienen la misma estructura genética que los de los mamíferos (Wilson et al., 1990; Amemiya y Litman, 1990; Bengtén y Pilström, 1991). En estas especies, sólo se ha detectado una

copia  $C_H$  en el genoma, aunque en el pez gato se ha sugerido la existencia de otro segmento  $C_H$  que comparte homología de secuencia con el dominio  $C_{H1}$  del gen  $C_H$  previamente descrito (Ghaffari y Lobb, 1989b).

Los segmentos  $C_H$  tienen cuatro exones que codifican los cuatro dominios de la cadena H secretora y dos exones (TM) que codifican las secuencias adicionales de la cadena H de membrana (Wilson et al., 1990). Las similitudes en la secuencia de aminoácidos de los distintos dominios  $C_H$  varían entre 21-36% para el pez gato y 25-42% para el pez dama, siendo siempre el dominio  $C_{H4}$  el más conservado. La mayor homología con el resto de los vertebrados se da en los exones TM1 y TM2, y, fundamentalmente, en este último. Las cadenas H de los peces óseos, al igual que las de los elasmobranchios, están muy relacionadas con las cadenas  $\mu$  de mamíferos por el número de dominios, la carencia de una región bisagra, su naturaleza polimérica y la similitud en sus regiones C-terminales. No obstante, los dominios  $C_H$  parecen sufrir una evolución independiente, por lo que es muy difícil la asignación de clases en las secuencias de vertebrados inferiores. Así, por ejemplo, la cadena H del pez gato comparte homologías significativas con la cadena  $\mu$  del pollo y del ratón, con la cadena  $\epsilon$  de la rata,  $\alpha$  del ratón, y del conejo y  $\lambda$  humana (Ghaffari y Lobb, 1989a).

Hay residuos muy conservados a lo largo de la filogenia, como las cisteínas que forman los puentes disulfuro dentro de los dominios, y ciertos triptófanos. En el pez gato, la distribución de las cisteínas que forman puentes disulfuro intercatenarios difiere considerablemente del patrón existente en mamíferos, lo que probablemente se refleja en su especial arquitectura covalente (Ghaffari y Lobb, 1989a). Sólo la cisteína implicada en la unión H-L, y una de las cisteínas de la región C-terminal, están filogenéticamente conservadas (Ghaffari y Lobb, 1989b).

Tanto el pez dama como el pez gato tienen en sus segmentos  $C_H$  cuatro sitios potenciales de N-glicosilación de los cuales, el único sitio altamente conservado en la evolución es el que se encuentra en la región C-terminal (Ghaffari y Lobb, 1989b; Amemiya y Litman, 1990).

La generación de cadenas H para las Igs de membrana parece ser distinta en las especies de teleósteos estudiadas que en el resto de los vertebrados. En el carpin y en el pez gato se ha descrito la existencia de una cadena  $\mu$  de membrana ( $\mu_m$ ), aproximadamente 10 kDa menor que la cadena  $\mu$  de las Igs séricas ( $\mu_s$ ) (Warr y Marchalonis, 1977; Wilson et al., 1990). En el pez gato, dicha diferencia parece ser debida a un procesamiento distinto del mRNA que codifica para  $\mu_m$ , que excluye el dominio  $C_{\mu 4}$  y une directamente el exón  $C_{\mu 3}$  con el exón TM1 (Wilson et al., 1990). El sitio de procesamiento en la posición 5' no está presente en el exón  $C_{\mu 4}$  en el pez gato (Wilson et al., 1990). Este mismo fenómeno ha sido descrito en el bacalao del Atlántico (Bengtén y Pilström, 1991). En el pez dama,  $C_{\mu 4}$  carece también de la secuencia interna donante para el procesamiento postranscripcional (Amemiya y Litman, 1990), por lo que es posible que esta característica sea común al resto de los peces óseos, si bien se desconoce el significado funcional de la pérdida de  $C_{\mu 4}$  en las Igs de membrana.

En los anfibios aumenta la complejidad de los genes que codifican las Igs en la línea germinal. En el sapo Xenopus laevis, se ha descrito hasta el momento la existencia de once familias de genes  $V_H$  (Litman et al., 1989b), de las cuales, las tres familias principales contienen entre 15-30 miembros, número comparable al de las mayores familias del ratón y del hombre (Schwager et al., 1989), aunque el número total de segmentos por genoma haploide es bajo, aproximadamente 100.

Los segmentos  $V_H$  en Xenopus presentan poca complejidad. La homología en las regiones CDR1 y CDR2 entre las distintas

familias es alta (Schwager et al., 1989). La mayor diversidad se presenta en las regiones CDR3 por imprecisión en las uniones de los segmentos recombinados, adición de nucleótidos independiente de template y por la probable existencia de elementos D de distinta longitud, que pueden ser leídos con distintas pautas de lectura (Schwager et al., 1988; Litman et al., 1989b). Con respecto a las regiones FR, FR4 (codificada por los segmentos  $J_H$ ) está muy conservada en Xenopus, al igual que en todas las clases de vertebrados.

En Xenopus, se han secuenciado los genes que codifican las regiones constantes de las tres isotipos de Igs previamente descritos (IgM, IgX e IgY) (Schwager et al., 1988; Haire et al., 1989; Amemiya et al., 1989), de los cuales parece existir una sola copia por genoma haploide. Estos genes se asocian a los mismos segmentos  $V_H$  y  $J_H$  (Schwager et al., 1988; Hsu et al., 1989), lo cual es la base genética que apoya la existencia del fenómeno de cambio de clase en las Igs de este anfibio.

Xenopus expresa varios tipos de cadenas L en sus Igs. Hasta el momento, se han analizado clones de cDNA para los isotipos  $C_{\rho}1$  y  $C_{\rho}2$ . Sus secuencias tienen menos del 33% de homología con el otro isotipo descrito ( $C_{\rho}$ ) o con los segmentos  $C_L$  del tiburón, del pollo y de los mamíferos, lo que sugiere que la divergencia entre los dos isotipos de Xenopus se produjo antes de la aparición de los anfibios en la evolución (Schwager y Wilson, 1990).

Se han descrito dos familias de genes  $V_{\rho}$  ( $V_{\rho}1$  y  $V_{\rho}2$ ). Cada una se recombina con su propio conjunto de genes  $J_L$  ( $J_{\rho}1$  y  $J_{\rho}2$ ), que difieren bastante de otros segmentos J conocidos. Hay muchos segmentos  $V_{\rho}1$ , unos pocos  $V_{\rho}2$  y sólo dos segmentos  $C_{\rho}$ . En Xenopus, sólo se expresan unos pocos elementos  $V_{\rho}$  que, además, muestran una alta similitud en sus regiones CDR1 y CDR2. Por otra parte, son frecuentes los reordenamientos abortivos en  $V_{\rho}1$ , lo que

sugiere que las cadenas L de Xenopus presentan una baja heterogeneidad (Schwager y Wilson, 1990).

Los reptiles parecen tener la misma organización genética en sus Igs que los mamíferos, aunque está muy poco caracterizada. En el caiman Caiman crocodylus, por medio de hibridaciones con una sonda  $V_H$  murina, se han detectado varios segmentos  $V_H$ , los cuales presentan poca homología con dicha sonda en las regiones CDR, siendo mayor en las regiones FR (FR2 es la de mayor similitud). Las secuencias reguladoras de la transcripción y de la recombinación son similares a las encontradas en los mamíferos, aunque en uno de los segmentos  $V_H$  secuenciados existe la posibilidad de una unión directa con un gen  $J_H$ , lo cual implicaría la ausencia de segmentos D (Litman et al., 1983; Litman et al., 1985b). La tortuga Chelydra serpentina tiene un número inusualmente grande de segmentos  $V_H$ , presentes, al menos, en cuatro cromosomas distintos, aunque un número muy alto podrían ser pseudogenes (Litman et al., 1989a).

En las aves, el locus L está bien caracterizado. Sus cadenas L presentan una alta homología con las cadenas  $\lambda$  de mamíferos y se considera que las aves son el primer grupo evolutivo donde aparecen claramente este tipo de cadenas.

El locus L en el pollo (Gallus gallus) contiene un solo subgrupo  $V_L$ , de 26 genes. El repertorio completo de cadenas L deriva de un reordenamiento simple  $V_L$ - $J_L$ , ya que hay un solo gen  $J_L$  y un solo gen funcional  $V_L$  ( $V_{L1}$ ), siendo el resto pseudogenes. Estos últimos sirven como donantes de secuencias para diversificar los genes  $V_{L1}$  reordenados, por un mecanismo de conversión génica (Reynaud et al., 1985; Reynaud et al., 1987). Esta organización ha sido demostrada también en otros grupos de aves: codorniz (Coturnix coturnix), paloma (Columba palumbus), pavo (Meleagris gallopavo), ánade real (Anas platyrhynchos), cormorán (Phalacrocorax carbo) y halcón (Falco peregrinus). Se han descrito, sin embargo, algunas excepciones, como la del locus

$\lambda$  del pato Cairina moschata, que es básicamente similar, pero presenta al menos dos genes funcionales  $V_{\lambda}$  (Litman et al., 1990).

En las aves se conoce con menor detalle el mecanismo de diversificación de las cadenas H. Los datos obtenidos de las proteínas, indican la existencia de tres clases de cadenas,  $\mu$ ,  $\gamma$  y  $\alpha$  (Kincade y Cooper, 1973), pero sólo se han clonado los cDNA de  $C_{\mu}$  (Dahan et al., 1983) y los que codifican las regiones variables y constantes de las cadenas  $\gamma$  del pollo (Parvari et al., 1988) y del ánade real (Higgins et al., 1991). En esta última especie, donde se han descrito dos formas de IgG (5,7S y 7,8S), han sido clonados los cDNA que codifican ambas moléculas, sugiriéndose que estas formas no son el resultado del procesamiento postranscripcional de un precursor único (Higgins et al., 1991).

La organización del locus H en el pollo es muy similar a la de las cadenas L, (Reynaud et al., 1989). Contiene una sola unidad  $J_H-C_{\mu}$ , un solo gen funcional  $V_H1$  y una familia de secuencias D. El gen  $V_H1$  está muy próximo al segmento  $J_H$  (15 Kb). En el extremo 5' de este gen funcional  $V_H$ , y separado por 60 Kb, se encuentra un conjunto de pseudogenes  $V_H$ , cuyo número es probablemente mayor que el del locus L. El reordenamiento de los genes  $V_H1$  con los segmentos D, J y C se produce en todos los linfocitos B, y la generación de diversidad en las cadenas H se obtiene por un mecanismo de conversión génica como el que ha sido sugerido para las cadenas L.

En una visión general, un análisis comparativo de la evolución de los segmentos V, J y C muestra, por una parte, una gran conservación en las secuencias V, fundamentalmente en sus regiones FR (Marchalonis y Schluter, 1989a), si bien la región más conservada es la codificada por los segmentos J (FR4). Son las regiones constantes las que exhiben una mayor variación, ya que no evolucionan como entidades simples, sino que cada dominio actúa como una unidad, diversificándose con distintos patrones

(Marchalonis y Schluter, 1989b). Dentro de los segmentos C<sub>1</sub> hay una gran similitud entre todas las especies y, desde el nivel filogenético de los elasmobranquios, las cadenas L se pueden asociar con las cadenas κ o λ (Marchalonis y Schluter, 1990).

Las cadenas H o L de las Igs muestran una conservación sustancial en la estructura de sus dominios, con algunas posiciones fundamentales en la conformación del dominio presentes en todas las especies de vertebrados estudiadas.

## 12. DIVERSIDAD DE ANTICUERPOS EN LOS VERTEBRADOS

Los vertebrados inferiores exhiben una restringida diversidad de anticuerpos (Du Pasquier, 1982). En los elasmobranquios y los teleósteos la afinidad de los anticuerpos específicos de haptenos no se incrementa prácticamente en el tiempo, ni siquiera tras inmunizaciones prolongadas (Richter y Ambrosius, 1979; Machulla et al., 1980; Mäkelä y Litman, 1980; Shankey y Clem, 1980; Litman et al., 1982; Vilain et al., 1984; Wetzel y Charlemagne, 1985; Cossarini-Dunier et al., 1986). Además, la especificidad fina de los anticuerpos anti-hapteno en los elasmobranquios es indistinguible entre individuos no relacionados (Mäkelä y Litman, 1980).

En el anfibio Xenopus laevis, los espectrotipos (bandas obtenidas por isoelectroenfoque) de anticuerpos anti-hapteno no son tan complejos como los encontrados en los vertebrados superiores, y son compartidos por animales isogénicos. Para Xenopus, se han calculado aproximadamente 10<sup>5</sup> especificidades de anticuerpos distintas (Du Pasquier et al., 1989), frente a las 10<sup>9</sup> estimadas para los mamíferos (Owen y Lamb, 1988).

En los reptiles y las aves también se produce, en general, una baja diversidad de anticuerpos y un escaso incremento en la

afinidad de los mismos (Grey, 1963; Voss y Watt, 1977). Este hecho no ocurre con todos los antígenos estudiados; así, por ejemplo, el repertorio de anticuerpos del pollo frente a los carbohidratos del grupo A estreptocócicos es tan grande como el del ratón (Pink et al., 1981).

La limitada diversidad de anticuerpos en los vertebrados inferiores puede ser explicada en parte por la presencia de un número bajo de los elementos  $V_H$  que codifican sus Igs (Schwager et al., 1988). Estos segmentos  $V_H$ , quizá por ser fruto de una reciente expansión, no son marcadamente divergentes, y existe poco polimorfismo en las regiones CDR entre los distintos animales y dentro del mismo individuo. Además, las familias  $V_H$  suelen presentar pseudogenes, a veces con una alta frecuencia (Litman et al., 1985a). Por otra parte, la expresión de las familias  $V_H$  puede producirse de una manera selectiva durante una respuesta inmune en particular o durante el desarrollo (Hsu y Du Pasquier, 1984); por ejemplo, en Xenopus, las distintas familias  $V_H$  están reguladas por promotores específicos (Schwager et al., 1989).

En diferentes especies de teleósteos, se encuentran altas concentraciones de anticuerpos naturales frente a haptenos, tales como el nitrofenilacetato o el dinitrofenilato (Wetzel y Charlemagne, 1985; Cossarini-Dunier et al., 1986); suelen ser de baja afinidad y, en algunos casos, su concentración no se incrementa tras la inmunización. La existencia de anticuerpos naturales se ha descrito en muchas clases de vertebrados, incluidos los mamíferos (Guilbert et al., 1982), pero las concentraciones de estos anticuerpos encontradas en los peces son inusualmente altas. En los vertebrados inferiores, la existencia de estos anticuerpos podría ser explicada por el limitado repertorio de genes  $V_H$  que poseen, lo que implicaría que muchos de los anticuerpos producidos tendrían una especificidad muy similar.

Un factor adicional para explicar la restringida diversidad de anticuerpos y los bajos niveles de mutaciones somáticas que presentan los vertebrados inferiores es el reducido grado de división celular que tienen los poiquilotermos (Du Pasquier, 1982). Además, el número relativo de linfocitos presentes en estos animales es inferior con respecto al de los mamíferos y, como consecuencia, los mecanismos para asegurar reordenamientos génicos apropiados de sus Igs y su expresión, pueden estar bajo una presión de selección más fuerte que en los mamíferos (Du Pasquier, 1982).

## II. OBJETIVOS

El estudio en profundidad de la inmunología en los peces teleósteos se ha restringido a ciertas especies, generalmente de interés económico, entre las que cabe destacar el pez gato. En esta especie, con el desarrollo de métodos de cultivos celulares apropiados y con la producción de AcM frente a diversos antígenos celulares, se han logrado caracterizar distintos tipos de células del sistema inmune (células T, B, accesorias y citotóxicas naturales), así como varios tipos de Igs (Clem et al., 1990).

El análisis de la heterogeneidad estructural de las Igs en los vertebrados ectotermos se ha visto facilitado, como hemos citado anteriormente, por el empleo de AcM, que reconocen distintas clases de cadenas pesadas y ligeras en las Igs (Lobb et al., 1984; Lobb y Olson, 1988). En la trucha arcoiris, son muy pocos los trabajos realizados en los que se describe la caracterización de AcM frente a sus Igs (DeLuca et al., 1983; Desvaux et al., 1987; Thuvander et al., 1990). Además, estos AcM se han utilizado fundamentalmente como marcadores de células B, así como en el análisis de la diversidad de anticuerpos en los peces, siendo muy escasas en estos trabajos las referencias sobre la estructura de las Igs reconocidas por los AcM.

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral se ha centrado en el análisis estructural de las Igs de la trucha arcoiris, y en la obtención de una colección de AcM frente a las mismas. Con esta colección de AcM se pretende:

- 1) Analizar la existencia de una posible heterogeneidad antigénica y estructural en las cadenas H y L de las Igs.

- 2) Estudiar la respuesta de producción de las Igs reconocidas por los AcM frente a diversos antígenos, tanto "in vitro" como "in vivo".

3) Analizar la expresión de las Igs de superficie en las poblaciones linfoides de distintos órganos: timo, bazo, pronefros, mesonefros y sangre periférica.

4) Estudiar las concentraciones de Igs séricas en distintas etapas del desarrollo de la trucha arcoiris.

### III. MATERIALES Y METODOS

## 1. PECES

Se utilizaron truchas arcoiris, Oncorhynchus mykiss (variedad "steelhead"), de 100-200 g de peso, que se mantuvieron en acuarios de vidrio de 200 l, con agua de clorada con tiosulfato sódico (1 mg/l), y con una temperatura media entre 10-12°C.

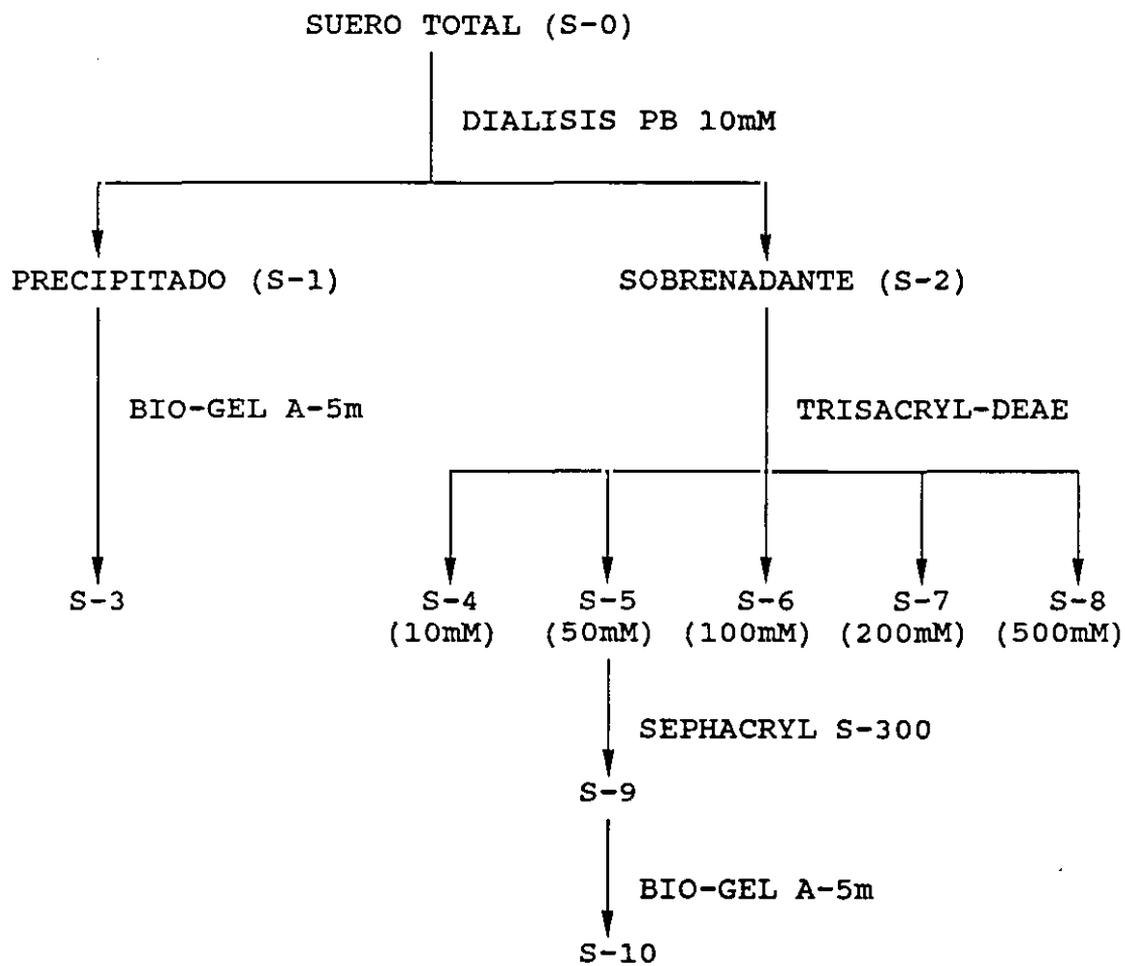
## 2. SUEROS

Los sueros de los distintos animales utilizados se obtuvieron por punción en la vena caudal en los peces y los ratones, y en la arteria central de la oreja en los conejos. La sangre se dejó coagular durante 2 h a 37°C y a continuación se mantuvo durante 24 h a 4°C. Pasado este tiempo se centrifugaron las muestras a 800 x g y se recogieron los sueros, que se almacenaron a -30°C hasta su utilización.

## 3. PURIFICACIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS SÉRICAS DE LA TRUCHA

Las Igs séricas de la trucha arcoiris se purificaron por cromatografías de intercambio iónico y de filtración en gel y, una vez obtenidos los ACM anti-Igs de trucha, por cromatografías de afinidad. En general, las muestras utilizadas consistieron en una mezcla de sueros de trucha procedentes de distintos individuos.

En las primeras etapas del trabajo se emplearon cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico (Esquema 1). El suero (fracción S-0) se dializó previamente frente a tampón fosfato (PB) 10 mM pH 7, obteniéndose un



ESQUEMA 1

precipitado (fracción S-1) de proteínas insolubles a baja fuerza iónica, y un sobrenadante (S-2).

El precipitado S-1 se redisolvió en 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se sometió a una cromatografía de filtración en gel en una columna de Bio-Gel A-5 m (Bio Rad, USA; rango de fraccionamiento:  $10.000-5 \times 10^6$ ) equilibrada en bicarbonato amónico 0,2 M pH 8. La actividad Ig en las distintas fracciones recogidas se analizó mediante un ELISA de doble anticuerpo, utilizando inicialmente un antisuero comercial anti-Igs de trucha (Seromed, Alemania) y, posteriormente, un antisuero de conejo obtenido en nuestro laboratorio. Las fracciones que contenían Igs se mezclaron y se liofilizaron, obteniéndose la fracción denominada S-3, que se alicuotó y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

El sobrenadante S-2, resultado de la diálisis del suero frente a PB 10 mM, fue sometido a una cromatografía de intercambio iónico sobre una matriz de Dietil-aminoetil-Trisacryl (DEAE-Trisacryl M, LKB, Suecia), previamente equilibrada en este mismo tampón. Las proteínas no adsorbidas a la columna se eliminaron con lavados sucesivos de PB 10 mM (fracción S-4). Las proteínas adsorbidas se eluyeron mediante un gradiente discontinuo de fuerza iónica. Para ello se utilizó PB pH 7 con distintas molaridades: 50, 100, 200 y 500 mM, denominándose a las fracciones de proteína resultantes S-5, S-6, S-7 y S-8 respectivamente.

El contenido de Igs de cada fracción se analizó con el ELISA antes mencionado, y las fracciones positivas se cromatografiaron a través de Sephacryl S-300 (Pharmacia, Suecia; rango de fraccionamiento:  $10.000-1,5 \times 10^6$ ), obteniéndose la fracción S-9, que se recromatografió sobre una columna de Bio-Gel A-5 m. Las Igs purificadas (fracción S-10) se alicuotaron y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

La purificación de Igs séricas también se llevó a cabo mediante cromatografías de afinidad, empleando los AcM 1G7, 2H9, 2A1 y 3F7 anti-Igs de trucha, acoplados a bolas de sefarosa (Sepharose CL-4B; Pharmacia). Los AcM se unieron a las bolas de sefarosa en tampón  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M- NaCl 0,5 M pH 8,3, en una proporción de 5 mg de proteína por cada ml de gel. La mezcla se mantuvo en rotación durante 4 h a temperatura ambiente, pasadas las cuales, los anticuerpos que no quedaron unidos a la sefarosa se eliminaron con varios lavados de PBS.

El suero de trucha, 1-2 ml, se pasó a través de estas columnas diluido en PBS, eliminándose las proteínas no adsorbidas con sucesivos lavados de este mismo tampón. Las proteínas unidas a las columnas se eluyeron con una solución de dietilamina 50 mM pH 11, neutralizándose inmediatamente las fracciones con un tampón Tris-HCl 2 M pH 2.

La pureza de las fracciones obtenidas en los distintos pasos del proceso de purificación se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), siguiendo los protocolos descritos por Weber y Osborn (1969) y por Laemmli (1970).

#### **4. OBTENCIÓN DE ANTISUEROS POLICLONALES ANTI-Igs DE TRUCHA**

Una vez purificadas las Igs de trucha, éstas se utilizaron para la inmunización de ratones con el fin de obtener un antisuero de ratón y AcM frente a ellas, y en la inmunización de un conejo para la obtención de un antisuero policlonal. El protocolo de inmunización del conejo fue el siguiente:

	CANTIDAD ANTIGENO	ADYUVANTE	VIA DE INOCULACION
DIA 0	300 $\mu$ g	ACF	Subcutanea
DIA 14	300 $\mu$ g	AIF	Subcutanea
DIA 28	300 $\mu$ g	AIF	Subcutanea
DIA 42	300 $\mu$ g	-	Intravenosa

En los días 49 y 63 se realizaron sangrías del animal por punción en la arteria central de la oreja. El antisuero se tituló por un ELISA indirecto frente a las Igs de trucha empleadas en la inmunización. Las Igs de este antisuero se purificaron por precipitación salina con sulfato amónico saturado al 40%. Un mg de estas Igs se marcó con peroxidasa, siguiendo el método descrito por Avrameas (1969).

#### 5. VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL EN UNA MUESTRA

Se realizó por el método de Bradford (1976). Para el establecimiento de la curva patrón se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) (Bio Rad), reconstituída en agua destilada a una concentración de 1,29 mg/ml. Se realizaron diluciones seriadas a 1/2 de esta proteína en agua destilada, partiendo de un volumen de muestra pura. Como blanco de la reacción se utilizó agua destilada. Se diluyeron también las muestras problema, siempre en agua destilada, siendo los volúmenes finales de todas las diluciones de 100  $\mu$ l, a los cuales se les añadió 5 ml de reactivo de Bradford (Bio Rad) diluido. Este reactivo está compuesto por Azul Brillante de Coomassie G-250 0,01%- ácido fosfórico 10%- metanol 85%. Se utilizó diluyendo 1 volumen de reactivo en 4 volúmenes de solución salina.

Una vez añadido el reactivo de Bradford sobre las muestras, se leyó la absorbancia a 595 nm. Tras obtener la curva patrón (concentración de BSA frente a las absorbancias), los valores de absorbancia de las muestras a analizar se llevaron a la recta donde, por interpolación, se determinó el contenido proteico.

## 6. OBTENCIÓN DE ANTISUEROS POLICLONALES EN TRUCHA

Para la inmunización de las truchas se utilizaron tres tipos de antígenos: lipopolisacárido de Salmonella typhimurium (LPS) (Difco, USA), hapteno trinitrofenil conjugado con ovalbúmina (TNP<sub>11</sub>-OVA) y hapteno isotiocianato de fluoresceína conjugado con LPS (FITC<sub>6</sub>-LPS). El conjugado TNP<sub>11</sub>-OVA fue preparado según el método descrito por Good et al. (1980), y el conjugado FITC<sub>6</sub>-LPS se preparó de acuerdo con el protocolo descrito por Goding (1983b).

Se inmunizaron un total de 16 truchas divididas en cuatro grupos. Un grupo fue inoculado con 1 mg de LPS en ACF, un segundo grupo con 250 µg de TNP<sub>11</sub>-OVA en ACF, el tercero con 500 µg de FITC<sub>6</sub>-LPS, también en ACF, y el cuarto quedó como grupo control al que se le inyectó PBS emulsionado con ACF. El día -2 previo a la inoculación todas las truchas fueron sangradas por punción en el seno caudal, conservándose sus sueros como controles negativos. Las truchas fueron sangradas tras un mes de inmunización, excepto las inyectadas con FITC<sub>6</sub>-LPS, que se sangraron semanalmente.

## 7. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-Igs DE TRUCHA

Los AcM anti-Igs de trucha se obtuvieron a partir de varias fusiones con células de bazo de ratones Balb/c, inmunizados con

Igs séricas de trucha arcoiris (fracción S-10 del proceso de purificación). La pauta de inoculación fue la siguiente:

	CANTIDAD ANTIGENO	ADYUVANTE	VIA DE INOCULACION
DIA 0	50 $\mu$ g	ACF	INTRAPERITONEAL
DIA 14	50 $\mu$ g	AIF	INTRAPERITONEAL
DIA 21	50 $\mu$ g	AIF	INTRAPERITONEAL

Sobre el día 26-27 se sangraron los animales por punción en la vena caudal, y se titularon sus sueros mediante un ELISA indirecto. Para la fusión se utilizaron los ratones que tenían los mejores títulos.

Los días -4, -3 y -2 anteriores a la fusión, los ratones fueron inyectados intraperitoneal (-4 y -2) e intravenosamente (-3) con 50  $\mu$ g de Igs en solución salina, siguiendo el protocolo de Stahli et al. (1983).

Las células de bazo fueron fusionadas con la línea no secretora de mieloma X63 Ag8.653, de acuerdo con el protocolo descrito por Köhler y Milstein (1975). La selección de los hibridomas positivos se realizó mediante un ELISA indirecto. Las placas fueron tapizadas con Igs de trucha a una concentración de 10  $\mu$ g/ml en PBS y a continuación se añadieron 75  $\mu$ l/pocillo de los sobrenadantes de cultivo a analizar. Tras esta incubación la reacción se reveló con un antisuero de conejo anti-Igs de ratón marcado con peroxidasa (Sigma, USA).

Los híbridos positivos se clonaron al menos dos veces por dilución límite, y se inyectaron en ratones con el fin de producir líquidos ascíticos. Los isotipos de los AcM se determinaron mediante un ELISA indirecto, utilizando antisueros

de conejo anti-isotipos de Igs de ratón (Bio Rad), siguiendo las instrucciones del manufacturador.

El AcM 5E10 anti-IPNV (IPNV= virus de la necrosis pancreática infecciosa) se utilizó como control negativo de los AcM anti-Igs de trucha en todos los ensayos. El AcM 1.14 anti-Igs de trucha arcoiris (DeLuca et al., 1983), cedido por el Dr. G. Warr (Dept. de Bioquímica, Universidad Médica de Carolina del Sur, Charleston, USA), se empleó en algunos ensayos como control positivo.

#### **8. PURIFICACIÓN DE LOS ACM A PARTIR DE LÍQUIDO ASCÍTICO**

Para realizar esta purificación se emplearon cromatografías de Proteína A-Sepharosa CL-4B (Pharmacia). La resina se rehidrató en tampón PBS, se montó en una columna y se mantuvo a 4°C hasta su utilización. En cada ensayo, se pasó 1 ml de ascitis por la columna, el cual fue previamente mezclado con 1 ml de tampón glicina 1,5 M- NaCl 3 M pH 8,9. Una vez equilibrada la columna con este tampón, se aplicó la muestra, eluyéndose la fracción de proteínas no adsorbidas con este mismo tampón glicina.

Las Igs adsorbidas a la matriz se eluyeron con una solución de ácido cítrico 0,1 M pH 3, recogándose fracciones de 2 ml, de las cuales se determinó su absorbancia a 280 nm.

Las fracciones que contenían Igs fueron mezcladas y dializadas frente a PBS o a bicarbonato sódico 0,1 M pH 8, según su utilización posterior.

## 9. MARCAJE CON BIOTINA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos, una vez purificados, fueron dializados frente a bicarbonato sódico 0,1 M pH 8,3, ajustándose su concentración a 1 mg/ml.

Un ml de cada AcM se mezcló con 125  $\mu$ l de una solución de éster de N-hidroxisuccinimida-biotina (Sigma), diluido en dimetilsulfóxido, a una concentración de 1 mg/ml. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 4 h a temperatura ambiente y posteriormente se dializó frente a PBS pH 7,2.

## 10. MARCAJE CON $^{125}\text{I}$ DE Ig SOLUBLE

Se llevó a cabo por el método de la Cloramina T, según el protocolo descrito por Johnstone y Thorpe (1982b).

Para realizar los marcajes se utilizaron Igs de trucha aisladas tanto por cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico, como por cromatografías de afinidad con el AcM 1G7.

En un vial que contenía 200  $\mu$ Ci de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (Amersham, Inglaterra) se añadieron 10  $\mu$ l de tampón fosfato 0,25 M pH 7,5 y 10  $\mu$ l de una solución de Igs, a una concentración de 1 mg/ml. A continuación se añadieron 10  $\mu$ l de una solución de Cloramina T (Merck, Alemania), a una concentración de 1 mg/ml, en tampón fosfato 0,05 M pH 7,5, y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 min, pasado el cual se frenó la reacción con 500  $\mu$ l de una solución de tirosina (Merck) a 0,1 mg/ml en PBS. A continuación, se añadieron 500  $\mu$ l de tampón PBS-BSA 0,1% que contenía 1 mg/ml de yoduro potásico. Esta mezcla se aplicó a una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia) de 0,7 x 15 cm, equilibrada

en PBS, en la que se habían cromatografiado previamente 100  $\mu$ l de una solución de BSA al 10%. Se recogieron 12 fracciones de 0,5 ml cada una y se midió su radiactividad en cuentas por minuto (cpm) en un contador de partículas gamma.

## 11. INMUNOPRECIPITACIONES

Para realizar las inmunoprecipitaciones, se incubaron 10  $\mu$ g de anticuerpo purificado o 10  $\mu$ l de líquido ascítico o suero con una cantidad de  $^{125}$ I-Ig equivalente a 100.000 cpm (aproximadamente 1,5 ng de Ig). Cuando las inmunoprecipitaciones se realizaron con dos AcM distintos se añadieron 5  $\mu$ l de líquido ascítico de cada uno de ellos sobre 100.000 cpm de Ig marcada.

Los inmunocomplejos se aislaron con un antisuero de conejo anti-Igs de ratón (Dakopatts, Dinamarca), en una proporción de 2  $\mu$ g de anticuerpo de conejo por cada  $\mu$ g de AcM, y células de Staphylococcus aureus al 10% (p/v) (Calbiochem, USA). Los inmunocomplejos formados con anticuerpos policlonales se aislaron utilizando exclusivamente las células de S. aureus.

El precipitado final se resuspendió en tampón Tris-HCl 0,062 M- SDS 0,2%- Glicerol 10%- Azul de bromofenol 0,001% pH 7, y se incubó durante 5 min a 60°C. Tras una centrifugación, los sobrenadantes fueron leídos en un contador de partículas gamma, siendo sometidos posteriormente a SDS-PAGE.

## 12. INMUNOADSORCIONES

Se realizaron siguiendo la técnica descrita por Melero y González-Rodríguez (1984).

Se utilizaron placas de polivinilo con fondo en U (Dynatech) de 96 pocillos, que fueron tapizadas con una solución de Proteína A (Sigma) en PBS, a una concentración de 50 µg/ml, incubándose durante 18 h a 37°C. A continuación, se bloqueó la placa con PBS- BSA 5% durante 2 h a 37°C. Pasado este tiempo, se añadió un antisuero de conejo anti-Igs de ratón (RAM) (Dakopatts) diluido 1/10 en tampón PBS- BSA 0,1%, manteniéndose la placa durante 1 h a 37°C.

A continuación se lavaron los pocillos, y se añadieron los ACM anti-Ig de trucha diluidos 1/20 en tampón PBS- BSA 0,1%. Como control positivo del ensayo se utilizó un antisuero de conejo anti-Igs de trucha. En este caso los pocillos no fueron incubados previamente con RAM. Las placas se mantuvieron durante 1 h a 37°C, y, tras varios lavados, se añadieron 200.000 cpm/pocillo de Ig marcada con <sup>125</sup>I o <sup>35</sup>S, según los casos, y se incubó durante 18 h a 4°C.

Pasado este tiempo, la placa se lavó y la Ig unida se recogió incubando cada pocillo con tampón Tris-HCl 0,062 M- SDS 0,2%- Glicerol 10%- Azul de bromofenol 0,001% pH 7 durante 2 min a 100°C, siendo analizada posteriormente por SDS-PAGE.

Se realizaron también inmunoadsorciones aditivas, añadiendo dos ACM sobre el mismo pocillo. En este caso, el ensayo se llevó a cabo de la forma antes descrita, pero los ACM se añadieron a una dilución 1/40.

### 13. TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS

#### 13.1. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Las características generales para todos los ensayos ELISA fueron las siguientes:

1) Las placas utilizadas fueron placas de poliestireno de 96 pocillos (Dynatech, Alemania).

2) Las placas se tapizaron con distintos antígenos a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  (1  $\mu\text{g/pocillo}$ ) en PBS y se incubaron durante 18 h a 4°C.

3) Las muestras y los conjugados enzimáticos fueron preparados en tampón de diluciones de ELISA (PBS- BSA 1%- Tween 20 0,05% pH 7,2). Después de las incubaciones, las placas se lavaron 3-4 veces con tampón de lavado de ELISA, consistente en una dilución 1/10 del tampón de diluciones.

4) El enzima utilizado fue en todos los casos peroxidasa, y se empleó como sustrato una solución de sustrato OPD (Tampón citrato 0,1 M- o-fenilendiamina 2 mg/ml-  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,03% pH 4,8), frenándose la reacción con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 N.

5) La lectura de las placas se realizó en un espectrofotómetro a 492 nm de longitud de onda.

#### 13.1.1. ELISA indirecto

Se tapizaron las placas con Igs de trucha, cadenas pesadas o cadenas ligeras aisladas a partir de estas Igs, según los casos, y se incubaron con diluciones seriadas de distintos anticuerpos monoclonales o policlonales durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se añadió un antisuero anti-Igs de ratón (Sigma), Proteína A (Sigma) o Avidina D (Vector, USA), según el caso, marcados con peroxidasa, y las placas se mantuvieron durante 45 min a temperatura ambiente, pasados los cuales la reacción se reveló con el sustrato OPD.

En los ensayos para la detección de anticuerpos en los sueros de las truchas, se tapizaron las placas con los distintos antígenos (LPS, TNP<sub>11</sub>-OVA o FITC conjugado con Igs de conejo) y se incubaron durante 1 h con diluciones de los sueros de las truchas, inmunizadas y controles. Posteriormente se añadieron los distintos AcM anti-Igs de trucha marcados con biotina, a una dilución óptima previamente determinada, manteniéndose durante 45 min, pasados los cuales las placas se incubaron con Avidina D conjugada con peroxidasa. Finalmente, la reacción se reveló con el sustrato OPD.

### 13.1.2. ELISA de doble anticuerpo (DAS)

Las placas fueron tapizadas con anticuerpos monoclonales o policlonales anti-Igs de trucha y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con diluciones de las distintas muestras a analizar. Posteriormente se añadió el mismo anticuerpo policlonal marcado con peroxidasa o bien diluciones de los distintos AcM, marcados con biotina, manteniéndose las placas durante 45 min. En este último caso se realizó un paso adicional que fue la incubación de las placas con Avidina D conjugada con peroxidasa, durante 45 min. Las reacciones se revelaron con el sustrato OPD.

### 13.1.3. ELISA de competición

Las placas fueron tapizadas con 2 µg/ml de Igs de trucha en PBS, y se incubaron durante 18 h a 4°C. A continuación se añadieron 180 µl/pocillo de una solución que contenía un AcM marcado con biotina, a una dilución óptima previamente ensayada, y cantidades crecientes del mismo AcM (control positivo del ensayo) o de otros AcM purificados: 3, 11, 33 y 100 µg/ml. Esta mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, pasada la

cual las placas se lavaron y se añadió una dilución 1/2000 de Avidina D marcada con peroxidasa. La reacción se incubó durante 45 min, pasados los cuales se añadió el sustrato OPD.

### **13.2. Inmunoelctrotransferencia**

Las proteínas de un suero total de trucha, o bien las Igs de trucha purificadas, se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras, transfiriéndose posteriormente a membranas de nitrocelulosa (Bio Rad). La transferencia de las proteínas se realizó con una intensidad de 500 mA, durante 2 h. Posteriormente, las membranas se cortaron en tiras longitudinales, y se bloquearon durante 2 h a 37°C con tampón TBS (Tris-HCl 20 mM- NaCl 500 mM pH 7,5) conteniendo un 2% de leche desnatada en polvo (Nestlé, Suiza).

A continuación, cada una de las tiras fue incubada 1 h a 37°C con un AcM, diluyendo la ascitis 1/20 en tampón TBS- leche desnatada en polvo 2%- Tween 20 0,05% (TTBS). Como control positivo se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-Igs de trucha, a una dilución 1/50. Las tiras se incubaron con agitación suave durante 1 h a 37°C, y posteriormente se lavaron con el mismo tampón de dilución (TTBS).

Se añadieron a continuación dos tipos de conjugados. En las tiras incubadas con los AcM, se añadió un antisuero de cabra anti-Igs de ratón marcado con fosfatasa alcalina (Bio Rad), diluido 1/1500 en TTBS. En las tiras incubadas con el antisuero policlonal, se añadió Proteína A marcada con peroxidasa (Sigma), diluida 1/500 en TTBS. Los conjugados se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación suave.

La actividad fosfatasa alcalina se reveló utilizando BCIP-NBT como sustrato (BCIP= 5'-Br, 4-Cl, 3-indolilfosfato de

toluidina; NBT= cloruro de p-nitro-azul de tetrazolio) (Bio Rad) y la actividad peroxidasa con el sustrato Cloronaftol (Sigma). El sustrato BCIP-NBT está compuesto por 1 ml de solución NBT (NBT 3%- dimetilformamida 70%), 1 ml de solución BCIP (BCIP al 1,5% en dimetilformamida) y 100 ml de tampón carbonato ( $\text{NaHCO}_3$  0,1 M- $\text{MgCl}_2$  1 mM pH 9,8). El sustrato Cloronaftol se compone de una solución de 4-Cl, 1-naftol (Sigma), a una concentración de 5 mg/ml en PBS, que contiene un 0,015% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reacción se dejó desarrollar con agitación suave a 37°C hasta la aparición de las bandas.

#### **14. REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN DE LAS Igs DE TRUCHA**

En este ensayo se emplearon Igs de trucha procedentes de la fracción S-10 del proceso de purificación. Se utilizaron 500  $\mu\text{l}$  de estas Igs, a una concentración de 1,36 mg/ml en tampón Tris-HCl 0,55 M pH 8,1, y se mezclaron con el agente reductor ditioneitol (DTT) (Sigma) 0,02 M, durante 30 min a temperatura ambiente.

Una vez terminada la reducción, se añadió a la mezcla iodacetamida 0,12 M, con el fin de alquilar los grupos sulfidrilos libres obtenidos. Esta reacción se mantuvo durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente, pasada la cual, la mezcla se cromatografió en una columna de Sephacryl S-300, equilibrada con ácido acético 1 M. Se recogieron fracciones de 3 ml y se determinó el perfil de elución por medida de la densidad óptica de cada fracción a 280 nm.

De cada una de las fracciones que contenían proteína se separó 1 ml, precipitándose estas proteínas mezclando la muestra con etanol, en una proporción muestra:alcohol de 1:9 (v/v), y añadiendo una cantidad de acetato sódico saturado equivalente a 1/50 del volumen de la muestra. Esta mezcla se mantuvo durante

dos días a  $-30^{\circ}\text{C}$ , pasados los cuales se centrifugó y los precipitados se resuspendieron en tampón Tris-HCl 0,062 M- SDS 0,2%- Glicerol 10%- 2 mercaptoetanol 5%- Azul de bromofenol 0,001% pH 7, siendo analizadas por SDS-PAGE.

Una vez comprobadas qué fracciones de la cromatografía contenían cadenas pesadas (H) y ligeras (L) aisladas, se separaron, se neutralizó su pH ácido y se centrifugaron, con el fin de eliminar los precipitados formados por la neutralización del pH, determinándose entonces su concentración por medida de la densidad óptica a 280 nm, considerando un coeficiente de extinción molar a 280 nm para ambas de 1,4. Finalmente, estas fracciones se analizaron de nuevo por SDS-PAGE.

#### **15. TRATAMIENTO DE LAS Igs DE TRUCHA CON METAPERIODATO**

Se realizó un tratamiento con metaperiodato de las Igs, adsorbidas sobre placas de ELISA, siguiendo el protocolo descrito por Woodward et al. (1985). Este tratamiento altera la estructura de los carbohidratos, mediante una oxidación suave, sin afectar a las cadenas polipeptídicas.

Las placas, una vez tapizadas, se lavaron con tampón acetato sódico 50 mM pH 4,5. A continuación se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de metaperiodato 20 mM en tampón acetato 50 mM pH 4,5, manteniéndose durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, después de un breve lavado con el tampón acetato, la placa se incubó con glicina al 1% en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente.

Paralelamente, otra placa control tapizada con Igs, fue sometida al mismo tratamiento, con la excepción de la no adición de metaperiodato.

Después de varios lavados, se realizó un ELISA indirecto con todos los AcM anti-Igs de trucha sobre las dos placas.

#### **16. TRATAMIENTO DE LAS Igs DE TRUCHA CON ÁCIDO TRIFLUOROMETANO SULFÓNICO (TFMS)**

Este tratamiento se realizó siguiendo el protocolo descrito por Snow et al. (1984), con el fin de eliminar la totalidad de los determinantes carbohidrato de las Igs.

Se incubaron 500  $\mu\text{g}$  de Igs con 100  $\mu\text{l}$  de una mezcla de TFMS:anisol 2:1 (v/v). Como control del experimento se utilizó una cantidad igual de Igs, a las cuales se le añadieron en este paso 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Las mezclas se incubaron a 0°C durante 2 h y, posteriormente, a -20°C durante otras 2 h. La reacción se neutralizó con 1 ml de tampón TEA/NaCl (Trietanolamina 0,01 M- NaCl 0,15 M- PMSF 1 mM- Inhibidor de tripsina 0,02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pH 7,8) y con 200  $\mu\text{l}$  de Trietanolamina (TEA) 1 M pH 7,8.

A continuación, las Igs tratadas con TFMS y las Igs controles, se precipitaron con la adición de ácido tricloroacético hasta una concentración final del 10% de la muestra. Se incubaron 1 h a 4°C, se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 min y a continuación los precipitados se lavaron dos veces con acetona fría, analizándose posteriormente por SDS-PAGE.

#### **17. DIGESTIONES CON LA PROTEASA V8 DE Staphylococcus aureus**

Las cadenas proteicas digeridas fueron en todos los casos cadenas H o L procedentes de Igs de trucha aisladas por cromatografías de afinidad con distintos AcM. El protocolo

utilizado fue el descrito por Cleveland et al. (1977), con ligeras modificaciones.

Una vez aisladas las Igs, éstas fueron sometidas a SDS-PAGE en condiciones reductoras. Tras la tinción de las bandas con el colorante Azul de Coomassie R-250, éstas fueron escindidas del gel y equilibradas durante 30 min con una solución de Tris-HCl 0,125 M- SDS 0,5% pH 6,8. Paralelamente, la proteasa V8 (Sigma) se resuspendió en un tampón de muestras de electroforesis que contenía urea (Tris-HCl 0,125 M- urea 4 M- SDS 0,1%- Azul de bromofenol 0,001% pH 6,8), a una concentración final de 50 µg/ml de enzima.

Las bandas, una vez equilibradas, se introdujeron en los pocillos de un nuevo gel, añadiéndose a cada pocillo 50 µl de la solución de proteasa V8. Cuando el azul de bromofenol (ABF) de las muestras penetró aproximadamente 2 cm en el gel concentrador, se paró la electroforesis, y se incubaron las muestras durante 1 h con el fin de que se realizara la digestión. A continuación, se reanudó la electroforesis, hasta que el ABF alcanzó el extremo inferior del gel separador. Una vez acabada la electroforesis, el gel se tiñó con un "kit" para tinciones de plata (Amersham).

## **18. CULTIVOS DE LINFOCITOS DE TRUCHA**

### **18.1. Purificación de linfocitos de sangre periférica y de órganos linfoides**

Los linfocitos de trucha se purificaron a partir de sangre periférica y de suspensiones celulares de pronefros y mesonefros, por medio de un gradiente de densidad de las muestras sobre Ficoll-Hypaque (Lymphoprep -Nyegaard, Noruega-, densidad: 1,077 g/ml). Las truchas de las cuales se extrajeron los órganos, cuyo

peso osciló en torno a los 120 g, fueron previamente anestesiadas con 2-fenoxietanol, a una concentración de 0,3 ml de anestésico/litro de agua. A continuación, se sangraron por punción en el seno caudal, con el fin de reducir la contaminación de eritrocitos en los macerados de los órganos.

Cuatro ml de sangre o de las suspensiones celulares de los órganos, se añadieron sobre 3 ml de Lymphoprep, y se centrifugaron durante 40 min a 400 x g, siguiendo el protocolo descrito por Blaxhall (1981). Las células que quedaron en la parte superior del Ficoll, tras 2-3 lavados, fueron resuspendidas en medio de cultivo, empleándose para distintos ensayos.

#### **18.2. Producción "in vitro" de inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos estimulados con mitógenos**

Se realizaron cultivos de linfocitos de trucha estimulados con dos tipos de mitógenos: lipopolisacárido de Salmonella typhimurium (LPS) (Difco) y mitógeno de Phytolacca americana (PWM, mitógeno "pokeweed") (Sigma).

Los linfocitos empleados en los cultivos se obtuvieron a partir de macerados de pronefros de trucha arcoiris. Los órganos fueron disgregados sobre un tamiz, en medio RPMI-1640 (Flow, Escocia) y, tras el recuento de la viabilidad celular con Azul Tripán, las células se sembraron en placas de 24 pocillos, a una concentración de 2.000.000 de células/pocillo. Se utilizó como medio base de cultivo RPMI-1640, suplementado con L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M, penicilina 100 UI/ml, gentamicina 30  $\mu$ g/ml y suero de ternera fetal al 10%. La mitad de la placa se dejó como control de la producción basal de Igs en cultivo, y a la otra mitad se le añadió el mitógeno correspondiente, a una concentración de 100  $\mu$ g/ml (LPS) ó 5  $\mu$ g/ml (PWM).

Los sobrenadantes de cultivo se recogieron cada dos días, manteniéndose los cultivos durante 14 días en una estufa de 20°C, con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los sobrenadantes se guardaron a -30°C hasta la realización del ensayo de cuantificación de sus Igs.

### 18.3. Tratamiento con tunicamicina de cultivos de linfocitos de trucha

Se utilizó este tratamiento con el fin de bloquear la unión de azúcares en N- a las Igs, mediante la inhibición de la transferencia de N-acetil-glucosamina 1-fosfato al dolicol-monofosfato (Tkacz y Lampen, 1975).

Los linfocitos empleados se purificaron a partir de macerados de pronefros y mesonefros de trucha, como se describe en el apartado 18.1., y se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos, conteniendo cada pocillo 2 x 10<sup>6</sup> células. Como medio de cultivo se utilizó MEM (Flow), conteniendo L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/ml, gentamicina 30 µg/ml y suero de ternera fetal al 5%.

Los linfocitos fueron estimulados con 100 µg/pocillo de lipopolisacárido de Salmonella typhimurium (Difco) y se les añadió 200 µCi/pocillo de <sup>35</sup>S-metionina (Amersham). La mitad de los pocillos se dejó como control del ensayo, y a la mitad restante se les añadió 10 µg/pocillo de tunicamicina (Sigma). El cultivo se mantuvo durante 8 días en una estufa de 20°C, con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Los sobrenadantes de cultivo fueron preincubados con 200 µl de células de S. aureus al 10% (p/v) (Calbiochem), con el fin de evitar reacciones inespecíficas en los posteriores ensayos de inmunoadsorción a los que fueron sometidos.

## 19. TÉCNICAS INMUNOCITOLÓGICAS

### 19.1. Ensayos de citometría de flujo

Para realizar los ensayos de citometría de flujo se emplearon poblaciones celulares obtenidas de distintos órganos linfoides de trucha (pronefros, mesonefros, bazo y timo) así como de sangre periférica.

Una vez extraídos los órganos, se separaron las células como se describe en el apartado 18.2., y se distribuyeron en varios viales, a razón de  $2 \times 10^6$  células/vial, en 100  $\mu$ l de PBS. Las células procedentes de sangre periférica fueron previamente purificadas según el protocolo descrito en el apartado 18.1.

Las células se incubaron con los líquidos ascíticos de los distintos AcM, diluidos 1/20 en PBS-  $\text{NaN}_3$  0,1% pH 7,2, durante 45 min a 4°C. En algunas ocasiones, las muestras se incubaron al mismo tiempo con dos AcM distintos, diluidos también 1/20.

A continuación, se lavaron las células y se incubaron en presencia de un antisuero de conejo anti-Igs de ratón conjugado con FITC (Dakopatts), durante 30 min a 4°C. Tras varios lavados, las células se fijaron con 1 ml de paraformaldehído al 0,3% en PBS.

El análisis del porcentaje de células marcadas se determinó en un citofluorímetro FACSTAR PLUS (Becton Dickinson, San José, CA). Dicho porcentaje se calculó sustrayendo el obtenido con el AcM control anti-IPNV 5E10 del porcentaje de células reconocidas por cada AcM anti-Igs de trucha.

## 19.2. Ensayos de doble marcaje con peroxidasa y fosfatasa alcalina

Los experimentos se realizaron sobre células procedentes de cultivos de pronefros de trucha, estimuladas con LPS durante 8 días y posteriormente citocentrifugadas y fijadas.

Las células se incubaron con una dilución 1/40 del primer AcM, en tampón Tris-HCl 0,2 M pH 7,6, durante 1 h a temperatura ambiente y, pasado este tiempo, se lavaron con el mismo tampón. Se añadió entonces un antisuero de conejo anti-Igs de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Dakopatts), diluido 1/20 en tampón Tris-HCl 0,2 M pH 7,6. Pasados 45 min, se lavó el conjugado de las células, y se añadió el sustrato de la fosfatasa alcalina, compuesto por tampón Tris-HCl 0,05 M pH 8,2 conteniendo naftol AS-MX fosfato 0,02% (p/v), dimetilformamida 2% (v/v), levamisol 0,24 mg/ml y "Fast Blue" 1 mg/ml. El sustrato se mantuvo sobre las células durante 25 min, pasados los cuales, éstas se lavaron dos veces con agua destilada y una vez con Tris-HCl 0,2 M pH 7,6.

A continuación, se añadió el segundo AcM biotinado, a una dilución 1/10 en tampón Tris-HCl 0,2 M pH 7,6 conteniendo un 20% de suero de ratón, con el fin de bloquear los restos del conjugado de conejo anti-Igs de ratón que pudieran unirse a este segundo AcM.

Las células se mantuvieron durante 1 h a temperatura ambiente, pasada la cual, se lavaron con el mismo tampón Tris-HCl, y se añadió un conjugado de Avidina D marcada con peroxidasa (Vector), a una dilución 1/100 en tampón Tris-HCl 0,2 M pH 7,6. Las células se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con este conjugado y, posteriormente, después de realizar varios lavados con el mismo tampón, se añadió el sustrato de la peroxidasa, compuesto por tampón Tris-HCl 0,048 M pH 7,6

conteniendo diaminobencidina 0,6 mg/ml y  $H_2O_2$  al 0,025%. El sustrato se incubó durante 12 min, pasados los cuales, las preparaciones se lavaron con agua destilada y se montaron con gelatina tamponada.

## 20. ENSAYOS DE CUANTIFICACIÓN DE Igs DE TRUCHA

Las Igs empleadas como patrón en el ensayo se obtuvieron mediante cromatografías de afinidad, empleando los ACM 1G7, 2H9, 2A1 y 3F7 anti-Igs de trucha acoplados a las columnas de sefarosa. Su concentración se determinó por absorbancia a 280 nm, considerando un coeficiente de extinción molar a esta longitud de onda de 1,5 (Olesen y Vestergard Jørgensen, 1986).

El ensayo de cuantificación se llevó a cabo mediante un ELISA DAS. Las placas se tapizaron con el anticuerpo monoclonal 1G7 en las condiciones empleadas habitualmente. Posteriormente se realizó la curva patrón, utilizando diluciones seriadas de las Igs de trucha a 2/3, empezando con una concentración de 25 ó 10  $\mu$ g/ml. Las muestras problema se añadieron a dos diluciones distintas y todo el ensayo se realizó por duplicado. Como control negativo de las muestras se utilizó el propio tampón de diluciones del ELISA.

Una vez incubadas las muestras, se añadió el segundo AcM biotinado (1G7, 2H9, 2A1 o 3F7 según los casos), a una dilución óptima previamente ensayada. Posteriormente se añadió Avidina D conjugada con peroxidasa, a una dilución 1/2000, y la reacción se reveló con el sustrato OPD.

Las concentraciones de las muestras problema se obtuvieron por interpolación de la medida de sus absorbancias a 492 nm sobre la curva patrón.

#### IV. RESULTADOS

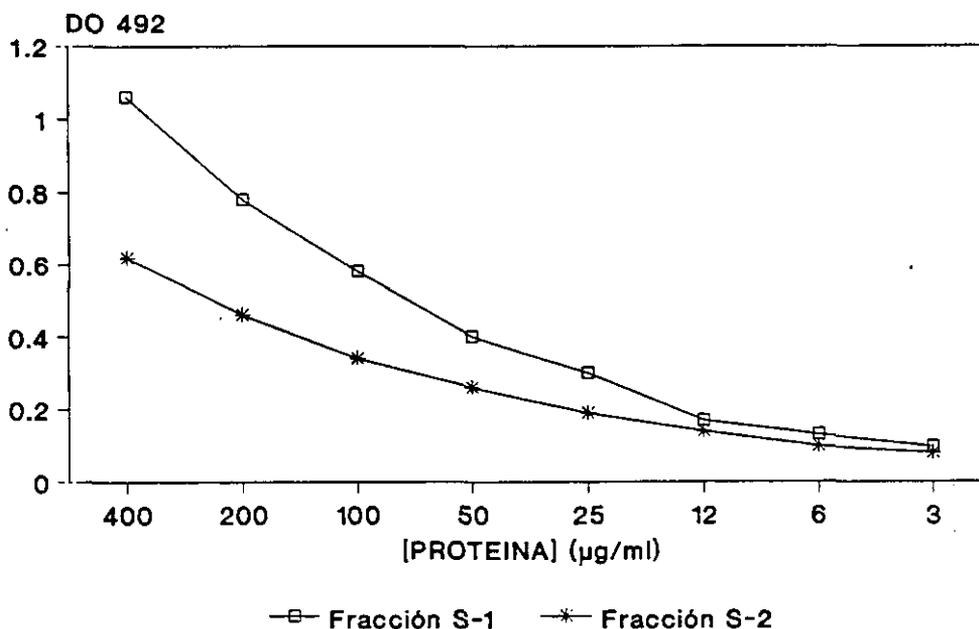
## 1. PURIFICACIÓN DE Igs DE TRUCHA

### 1.1. Purificación de Igs por cromatografías de filtración en gel e intercambio iónico

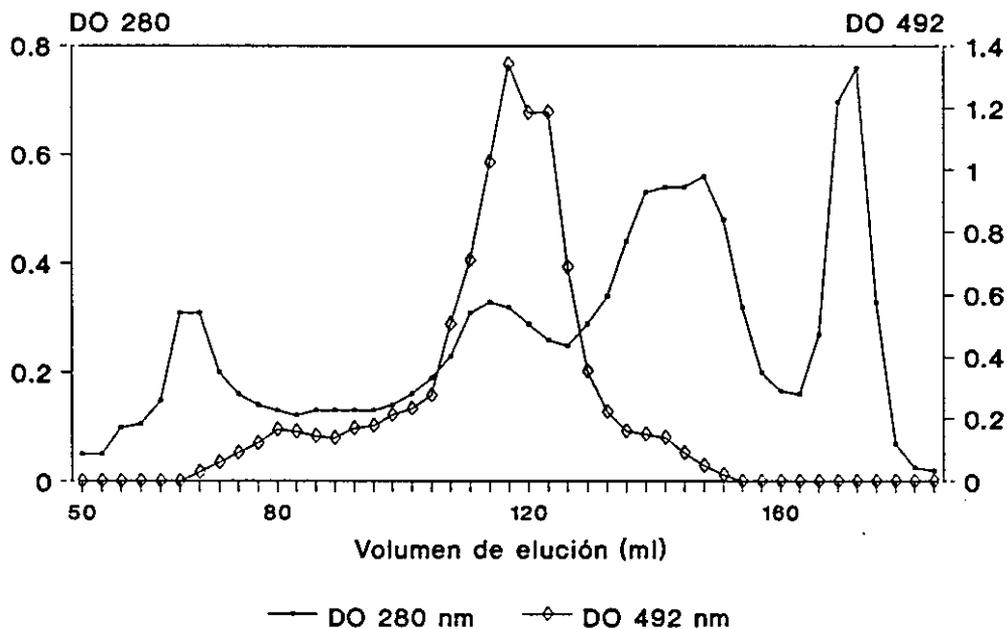
Se realizó a partir de una mezcla de sueros que fueron previamente dializados frente a PB 10 mM pH 7. Como resultado de esta diálisis, precipitaron alrededor de un 14% de las proteínas totales del suero, denominándose a esta fracción S-1, y al sobrenadante de proteínas no precipitadas, S-2. S-1 mostró estar enriquecida en Igs, ya que, a igualdad de concentración de proteínas con respecto a S-2, presentó una mayor actividad específica de Igs (Fig. 1). El contenido de Igs de cada una de las fracciones obtenidas se determinó mediante un ELISA de doble anticuerpo (DAS) utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-Igs de trucha. Este ensayo para la detección de Igs se empleó en todos los pasos de la purificación.

El precipitado S-1 se cromatografió a través de una columna de filtración en gel sobre Bio-Gel A-5 m, obteniéndose el perfil de elución mostrado en la Fig. 2. La actividad Ig se localizó en el segundo pico de proteínas eluido de la columna, denominándose a esta fracción S-3.

El sobrenadante S-2 se sometió a una cromatografía de intercambio iónico sobre una matriz de Trisacryl-DEAE equilibrada en PB 10 mM pH 7. Las proteínas adsorbidas a la columna se eluyeron con un gradiente discontinuo de fuerza iónica, utilizando PB 50, 100, 200 y 500 mM pH 7. La Fig. 3 muestra la actividad Ig de cada una de las fracciones. Sólo la fracción eluida con PB 50 mM presentó actividad Ig. Dicha fracción, denominada S-5, se sometió posteriormente a una cromatografía de filtración en gel sobre Sephacryl S-300 (Fig. 4A). Las fracciones con actividad Ig (primer pico de proteínas eluidas; fracción S-9)



**Fig. 1.-** Análisis de la actividad Ig contenida en las fracciones S-1 y S-2. El ensayo se realizó mediante un ELISA DAS, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-Igs de trucha. La concentración de proteínas totales en las fracciones S-1 y S-2 se determinó mediante la técnica de Bradford. La actividad Ig viene expresada como densidad óptica a 492 nm (DO 492).



**Fig. 2.-** Filtración en gel de la fracción S-1 sobre Bio-Gel A-5 m (5 x 100 cm). La columna fue equilibrada con bicarbonato amónico 0,2 M pH 8, y se recogieron fracciones de 3 ml. La cantidad de proteína eluida se expresa como densidad óptica a 280 nm (DO 280) y la actividad Ig como densidad óptica a 492 nm (DO 492). La actividad Ig de cada una de las fracciones se determinó mediante un ELISA DAS utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-Igs de trucha. Cada una de las fracciones se ensayó en este ELISA a una dilución 1/10.

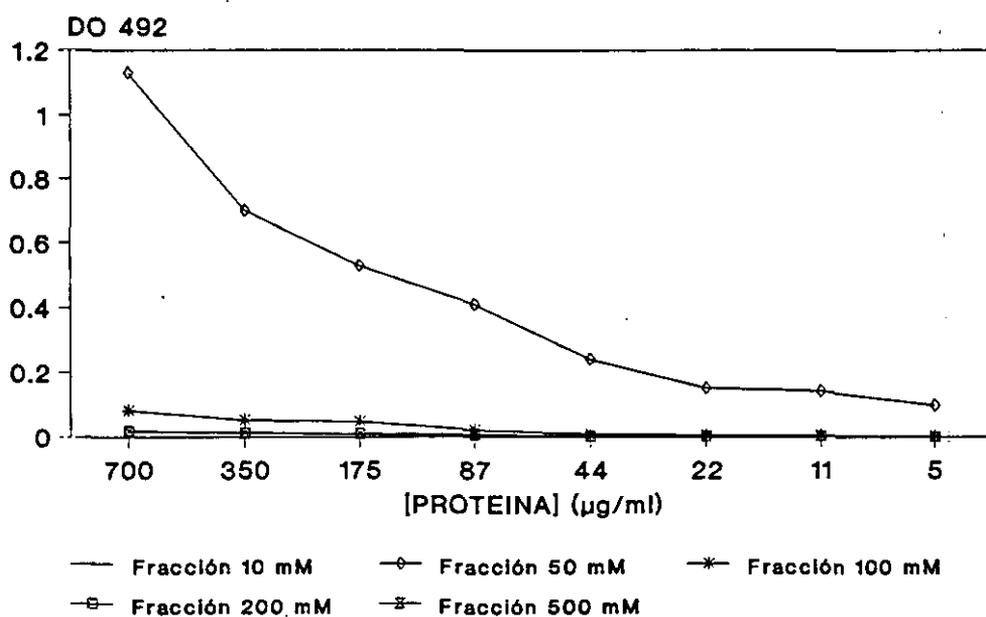


Fig. 3.- Análisis de la actividad Ig de las fracciones obtenidas por cromatografía sobre Trisacryl-DEAE a partir de la fracción S-2. La concentración de proteínas totales de las distintas fracciones se determinó mediante la técnica de Bradford.

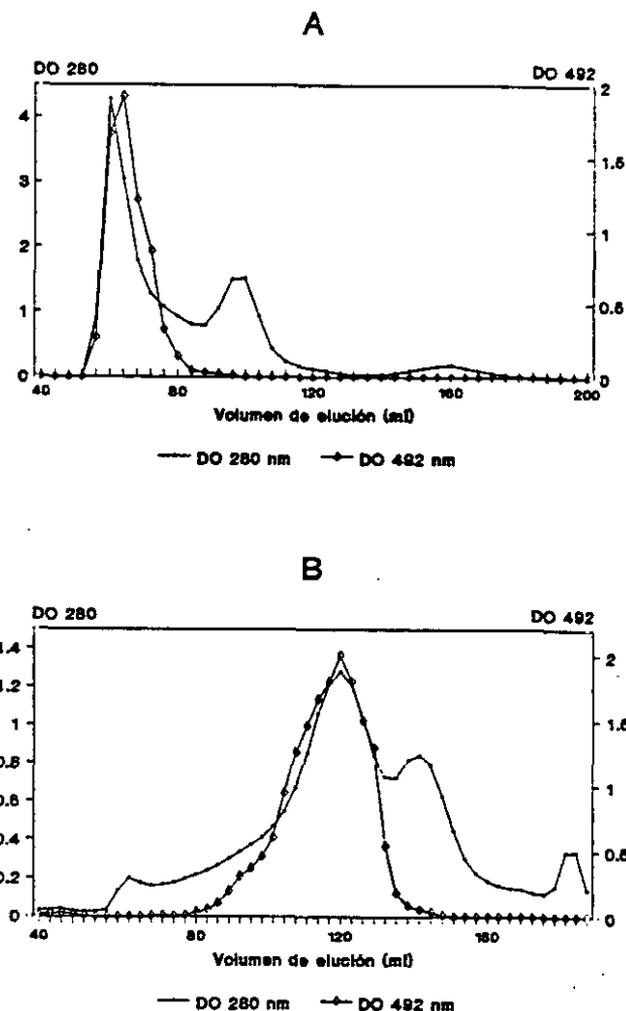


Fig. 4.- (A) Filtración en gel de la fracción S-5 sobre Sephacryl S-300 (5 x 100 cm) en bicarbonato amónico 0,2 M pH 8. La cantidad de proteína de las distintas fracciones se expresa como densidad óptica a 280 nm y la actividad Ig como densidad óptica a 492 nm. Se seleccionaron las fracciones comprendidas entre el volumen de elución 56-84 ml (fracción S-9), donde se obtuvo la mayor actividad Ig por ELISA, las cuales fueron recromatografiadas sobre Bio-Gel A-5 m. (B) Perfil de elución de la fracción S-9 cromatografiada sobre Bio-Gel A-5 m (5 x 100 cm) en bicarbonato amónico 0,2 M pH 8. Las fracciones seleccionadas fueron las comprendidas entre los volúmenes de elución 108-126 ml (fracción S-10). En (A) y (B), los valores de densidad óptica a 492 nm corresponden a una dilución 1/30 de las fracciones.

se recromatografiaron sobre Bio-Gel A-5 m, obteniéndose el perfil mostrado en la figura 4B. La actividad Ig se detectó en el segundo pico de proteínas (fracción S-10).

## 1.2. Purificación de Igs de trucha con el AcM 1G7

Una vez obtenidos los AcM anti-Igs de trucha, el AcM 1G7, cuyas características se definen en el apartado 4 de Resultados, se empleó para la purificación de Igs de trucha por cromatografías de afinidad. El análisis por SDS-PAGE de las Igs purificadas con este AcM a partir de un suero total de trucha, mostró, considerando el límite de detección del Azul Brillante de Coomassie, una pureza mayor del 95% para estas Igs (Fig. 5).

Las cromatografías de afinidad con el AcM 1G7 se emplearon también para la purificación de Igs de otros salmónidos, como el salmón chinook (Oncorhynchus tshawytscha) o el salmón coho (Oncorhynchus kisutch), obteniéndose Igs con el mismo grado de pureza que las de la trucha arcoiris (Fig. 5).

Debido a la gran especificidad y al alto porcentaje de Igs que reconoce el AcM 1G7 (apartado 4), se empleó también en distintos ensayos de cuantificación de Igs séricas totales, mediante un ELISA DAS, como se describe en Materiales y Métodos.

## 2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS Igs DE TRUCHA

La pureza de las distintas fracciones, obtenidas en el proceso de purificación descrito en el apartado 1.1., se analizó

a b c d e

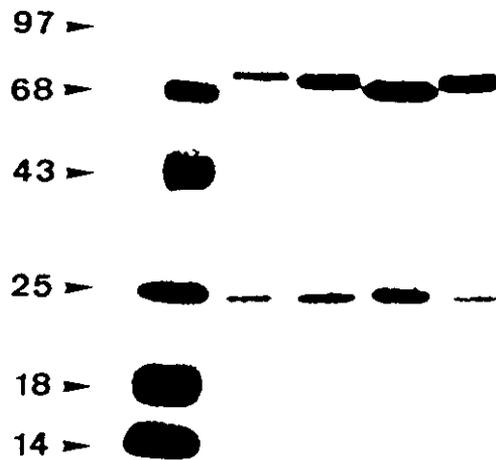


Fig. 5. SDS-PAGE (gradiente 17-20% de acrilamida) en condiciones reductoras de Igs de salmónidos purificadas por cromatografía de afinidad con el AcM 1G7. (a): Marcadores electroforéticos; (b): Igs de salmón chinook; (c): Igs de trucha arcoiris, variedad "shasta"; (d): Igs de salmón coho; (e): Igs de trucha arcoiris, variedad "steelhead". El gel está teñido con Azul Brillante de Coomassie. Los números del margen izquierdo corresponden a los pesos moleculares aparentes de los marcadores electroforéticos en kDa.

por SDS-PAGE. Las fracciones S-3 y S-10, en condiciones reductoras, sólo presentaron bandas correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras (Fig. 6A). Considerando el límite de detección del Azul Brillante de Coomassie, más del 95% de la proteína purificada era Ig. Las fracciones S-3 y S-10 se analizaron asimismo por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (Fig. 6B) y, al igual que en condiciones reductoras, no se observó ninguna diferencia estructural entre ambas.

### **2.1. Análisis de las Igs por SDS-PAGE en condiciones reductoras**

En condiciones reductoras, las Igs presentaron una banda de 70-75 kDa de peso molecular, correspondiente a la cadena pesada (H), y dos bandas de 26 y 24 kDa, correspondientes a las cadenas ligeras (L). En las electroforesis no siempre se identificaron las dos bandas de cadenas L, ya que la cadena de 26 kDa está en una proporción muy superior a la de 24 kDa, tanto en mezclas de sueros de distintos individuos, como en sueros individualizados de trucha (85% vs 15%). Sin embargo, en los sueros de algunos animales, estas proporciones estaban invertidas, siendo mayoritaria la cadena L de menor peso molecular (Fig. 7).

En ocasiones, tras el proceso de purificación de las Igs, se observó en las muestras una banda adicional de 55 kDa. Para comprobar si esta cadena estaba relacionada antigénicamente con las Igs de trucha, las fracciones de Ig que contenían esta banda fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa y se hicieron reaccionar con el antisuero policlonal de conejo anti-Igs de trucha, empleado en el proceso de purificación. El antisuero reaccionó con la banda correspondiente a la cadena H de las Igs y con la banda de 55 kDa (Fig. 8A), lo cual sugería que ambas cadenas compartían algunos determinantes antigénicos.

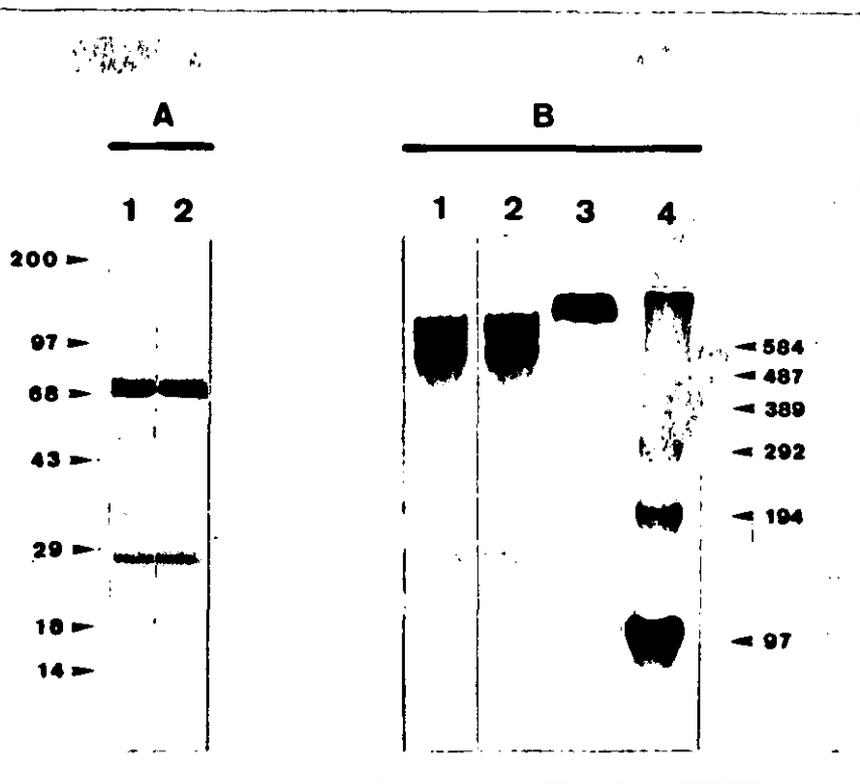
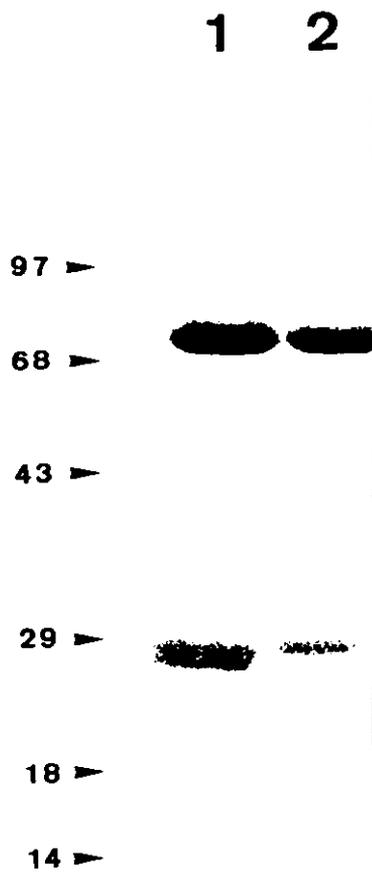
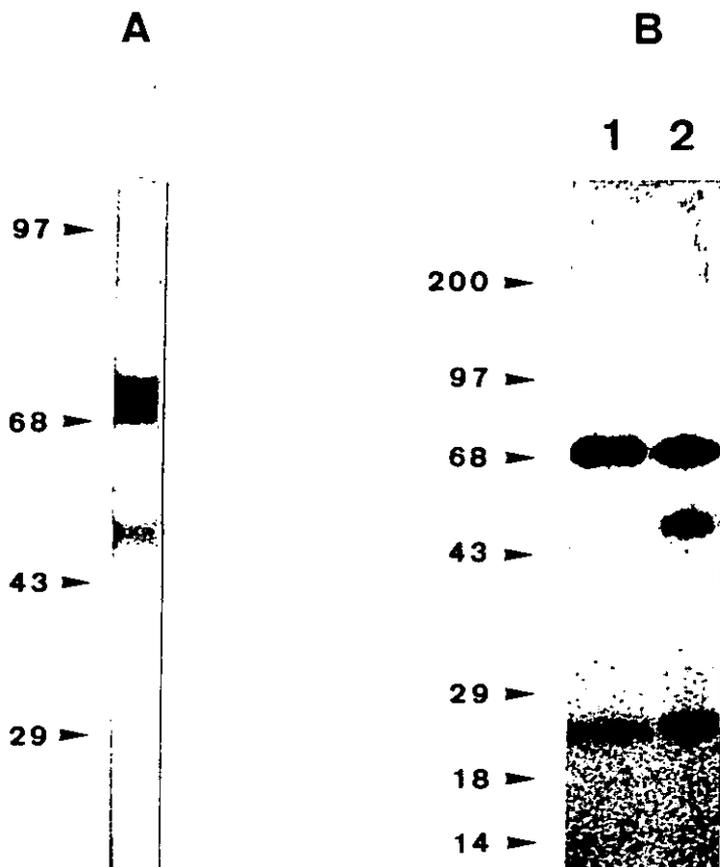


Fig. 6. Fracciones S-3 y S-10 analizadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. (A) SDS-PAGE (20% de acrilamida) de las fracciones S-3 (línea 1) y S-10 (línea 2) en condiciones reductoras. Los números del margen izquierdo corresponden a los pesos moleculares aparentes de los marcadores electroforéticos. (B) SDS-PAGE sobre un gel de poliacrilamida al 3,5% de las fracciones S-3 (línea 1) y S-10 (línea 2) en condiciones no reductoras. Como marcadores de peso molecular se utilizaron IgM murina (900 kDa) (línea 3) y diversos polímeros de fosforilasa B (línea 4). Los geles están teñidos con Azul Brillante de Coomassie.



**Fig. 7.** Análisis por SDS-PAGE (20% de acrilamida) en condiciones reductoras de Igs de trucha purificadas. (1) Igs procedentes de un suero individualizado de trucha, donde se observa la cadena L de 24 kDa como mayoritaria frente a la cadena de 26 kDa. (2) Igs purificadas a partir de una mezcla de sueros de trucha por cromatografía de afinidad con el AcM 1G7, que contienen principalmente cadenas L de 26 kDa. El gel está teñido con Azul Brillante de Coomassie.



**Fig. 8.** (A) Inmunoelectrotransferencia utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-Igs de trucha. Las Igs de trucha purificadas fueron sometidas a SDS-PAGE al 20% de acrilamida en condiciones reductoras y posteriormente transferidas a filtros de nitrocelulosa, donde se hicieron reaccionar con el antisuero policlonal. (B) Igs purificadas mediante cromatografías de afinidad con el AcM 1G7, a partir de un suero fresco de trucha. (1) Igs analizadas por SDS-PAGE (20% de acrilamida) en condiciones reductoras tras ser mantenidas durante un mes a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (2) Igs analizadas tras su almacenamiento durante 1 mes a  $4^{\circ}\text{C}$ . El gel está teñido con Azul Brillante de Coomassie.

Con objeto de determinar si la banda de 55 kDa correspondía a un producto de degradación de las cadenas H, se procedió al aislamiento de Igs a partir de suero fresco de trucha mediante cromatografías de afinidad con el AcM 1G7. Una parte de estas Igs se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un mes y otra parte se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$  ese mismo tiempo. En la Fig. 8B se muestra el patrón electroforético de ambas Igs. Se comprobó que la banda de 55 kDa sólo aparecía en las Igs almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ , lo cual indicaba que este polipéptido era un producto de degradación de las cadenas H de las Igs.

## **2.2. Análisis de las Igs por SDS-PAGE en condiciones no reductoras**

En condiciones no reductoras, en las electroforesis se observaron cuatro bandas, con pesos moleculares aproximados de 750, 570, 380 y 190 kDa (Fig. 6B). Este patrón se encontró tanto en Igs aisladas por cromatografías de intercambio iónico y de filtración en gel como por cromatografías de afinidad. Estos pesos moleculares coinciden, aproximadamente, con los correspondientes a un tetramero, trímero, dímero y monómero de una Ig. Densitométricamente, los porcentajes medios que se obtuvieron para cada uno fueron 60%, 30%, 6,5% y 3% respectivamente, aunque la proporción relativa varió con las distintas muestras analizadas.

## **2.3. Análisis del porcentaje de carbohidratos de las Igs**

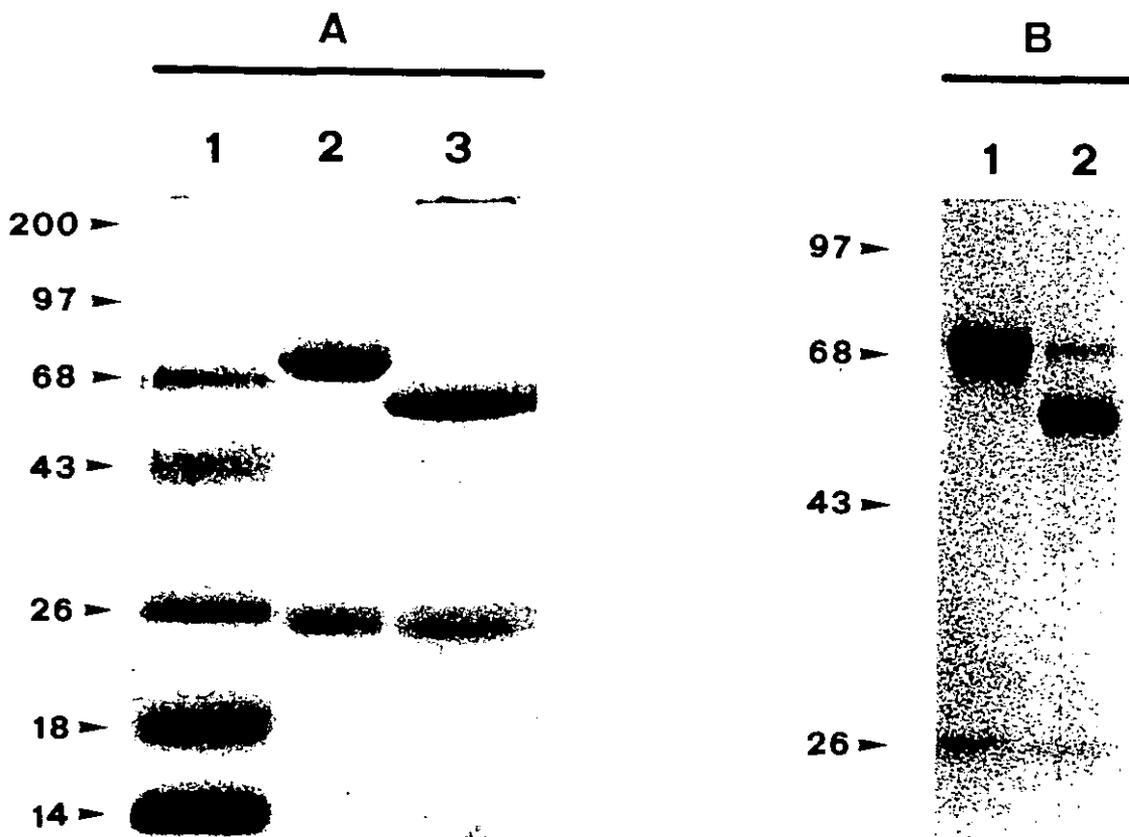
El porcentaje de carbohidratos contenido en las cadenas pesadas y en las cadenas ligeras de las Igs, se analizó mediante la eliminación química de los mismos con ácido trifluorometano sulfónico (TFMS). Los resultados comparativos de una Ig no

tratada, con respecto a una Ig deglicosilada, se muestran en la Fig. 9A. Las cadenas H deglicosiladas sufrieron un fuerte descenso de peso molecular, entre un 17-20% con respecto a las cadenas H no tratadas. No se observó ninguna reducción en el peso molecular de las cadenas L tras el tratamiento.

Asimismo, se analizaron las Igs procedentes de cultivos de linfocitos de trucha estimulados con LPS y tratados con tunicamicina, a las que se marcó metabólicamente con <sup>35</sup>S-metionina (Fig. 9B). Las Igs producidas en estos cultivos (línea 2), con respecto a las secretadas en un cultivo control (línea 1), muestran una reducción similar en peso molecular al observado en las Igs tratadas con TFMS. Como en el caso anterior, las cadenas L no experimentaron ninguna reducción de su peso molecular con el tratamiento.

### 3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE Igs EN TRUCHA ARCOIRIS

Se analizaron 49 sueros de truchas procedentes de una piscifactoría sin historia previa de enfermedades. Las muestras fueron recogidas tanto en invierno como en verano. Los sueros recogidos en verano correspondieron a tres grupos de peces de distintos tamaños: truchas de 20 g, de 125 g y truchas de más de 1 Kg de peso. En invierno, se recogieron sueros pertenecientes a truchas de más de 1 Kg de peso. Las temperaturas medias en esta piscifactoría oscilaron entre 17-21°C en verano y entre 6-8°C en invierno. Los resultados (Tabla I) muestran una clara diferencia en la concentración de Igs séricas entre las dos estaciones con respecto a las truchas de más de 1 Kg de peso ( $3,51 \pm 1,18$  mg/ml en invierno frente a  $9,36 \pm 2,78$  mg/ml en verano). Dentro de la misma estación, comparando truchas de distintas edades, no hubo diferencias significativas en los niveles de Igs entre las truchas de 125 g y las truchas de más de 1 Kg ( $9,1 \pm 4,1$  mg/ml y  $9,36 \pm 2,78$  mg/ml respectivamente), aunque la variabilidad en



**Fig. 9.** Análisis del porcentaje de carbohidratos de las Igs de trucha. (A) Tratamiento de las Igs con TFMS y análisis por SDS-PAGE (20% de acrilamida) en condiciones reductoras de las Igs no tratadas (línea 2) y tratadas (línea 3). Línea 1: Marcadores electroforéticos. El gel está teñido con Azul Brillante de Coomassie. (B) Autorradiografía de las Igs producidas en cultivos de linfocitos de pronefros estimulados con LPS, marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina. Los cultivos fueron tratados con tunicamicina y las Igs producidas fueron purificadas mediante la técnica de inmunoadsorción, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo. (1) Igs producidas en un cultivo control. (2) Igs producidas en cultivos tratados con tunicamicina. El gel es un gradiente del 17-20% de acrilamida. Los números del margen izquierdo en (A) y (B) corresponden al peso molecular de los marcadores en kDa.

**TABLA I**

Concentración de Igs séricas en cuatro grupos de truchas arcoiris.

GRUPO DE PECES	NÚMERO DE PECES	CONCENTRACIÓN Igs
TRUCHAS 20 g (VERANO)	10	0,67 ± 0,66
TRUCHAS 125 g (VERANO)	15	9,1 ± 4,17
TRUCHAS > 1 Kg (VERANO)	12	9,36 ± 2,78
TRUCHAS > 1 Kg (INVIERNO)	12	3,51 ± 1,18

La concentración de Igs se determinó mediante un ELISA DAS utilizando el AcM 1G7 anti-Igs de trucha y se expresa como la media de la concentración de las muestras (mg/ml) ± desviación estándar. Como patrón se emplearon Igs purificadas por cromatografía de afinidad sobre sefarosa 4B a la que se acopló el AcM 1G7.

las concentraciones fue mayor en los animales de menor peso. Las truchas de 20 g mostraron unos niveles de Igs apreciablemente menores que los anteriores grupos ( $0,67 \pm 0,66$  mg/ml).

#### **4. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-Igs DE TRUCHA**

Se inmunizaron ratones con Igs de trucha procedentes de la fracción S-10 del proceso de purificación. En las diferentes fusiones realizadas, se obtuvieron 40 AcM, de los cuales se seleccionaron 14, cuyo título e isotipo se muestran en la Tabla II.

Mediante experimentos de inmunoprecipitación con Igs de trucha purificadas y marcadas con  $^{125}\text{I}$ , se comprobó que sólo cuatro de estos AcM reconocieron porcentajes altos de Igs, entre un 85 y un 97% con respecto a los anticuerpos policlonales utilizados como controles positivos del ensayo (Tabla II). El resto de los AcM inmunoprecipitaron porcentajes de Igs que oscilaron entre 11-20%. En estos experimentos se utilizaron para el marcaje Igs purificadas tanto por cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico, como por cromatografías de afinidad, utilizando el AcM 1G7 acoplado a bolas de sefarosa. También se realizó el marcaje con Igs purificadas a partir de sueros de distintas procedencias, y en ningún caso los porcentajes obtenidos variaron más de un 5%.

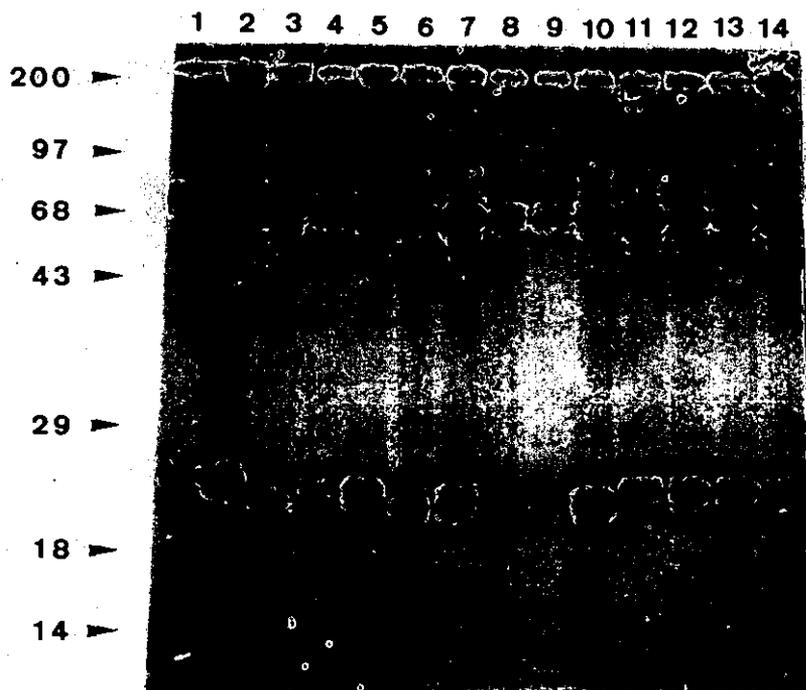
Cuando se analizó por SDS-PAGE la estructura de las Igs inmunoprecipitadas por cada uno de los AcM (Fig. 10), se observaron diferencias en el número y peso molecular de las cadenas L contenidas en ellas. Los AcM 1A6, 1B4, 1H2, 2D12, 2H9, 3F7 y 5G7 reconocieron Igs que contenían la cadena L de 26 kDa; 1A3, 1C6 y 2A1 reconocieron Igs que contenían la cadena L de 24 kDa y el resto reconocieron Igs que presentaban ambas cadenas.

**TABLA II**

<b>AcM</b>	<b>ISOTIPO</b>	<b>TITULO</b>	<b>PORCENTAJE Igs INMUNOPRECIPITADAS</b>
1A3	G <sub>2a</sub> , κ	10 <sup>-6</sup>	12,8 ± 0,84
1A6	G <sub>1</sub> , κ	10 <sup>-6</sup>	18,4 ± 3,5
1B4	G <sub>1</sub> , κ	> 10 <sup>-6</sup>	17 ± 2,6
1C6	G <sub>3</sub> , κ	10 <sup>-6</sup>	13,6 ± 1
1G7	G <sub>1</sub> , κ	10 <sup>-6</sup>	84,25 ± 3,5
1H2	G <sub>1</sub> , κ	10 <sup>-6</sup>	15,1 ± 1,3
2A1	G <sub>1</sub> , κ	> 10 <sup>-6</sup>	13,1 ± 3,02
2D12	M, κ	10 <sup>-4</sup>	11,3 ± 0,84
2H9	G <sub>1</sub> , κ	> 10 <sup>-6</sup>	17,5 ± 2,7
3B10	G <sub>2b</sub> , κ	> 10 <sup>-6</sup>	95 ± 2,5
3E4	G <sub>2a</sub> , κ	> 10 <sup>-6</sup>	93 ± 3,8
3F7	G <sub>1</sub> , κ	> 10 <sup>-6</sup>	17,6 ± 3
4D11	G <sub>1</sub> , κ	> 10 <sup>-6</sup>	97 ± 2,3
5G7	G <sub>2b</sub> , κ	> 10 <sup>-6</sup>	18 ± 4,8

El título e isotipo de los AcM se determinó mediante un ELISA indirecto. El título de los AcM corresponde a la menor concentración de AcM, expresada en mg/ml, con la que se obtuvieron valores superiores al control negativo del ensayo.

Los porcentajes de Igs inmunoprecipitadas con cada AcM corresponden a la media ± desviación estándar de tres experimentos con distintas fracciones de Igs marcadas con <sup>125</sup>I. Como controles de referencia del 100% de inmunoprecipitación se utilizaron antisueros policlonales de ratón y conejo anti-Igs de trucha. El control negativo utilizado en los distintos ensayos (AcM 5E10 anti-IPNV) osciló en un rango de inmunoprecipitación de 0,5-2%.



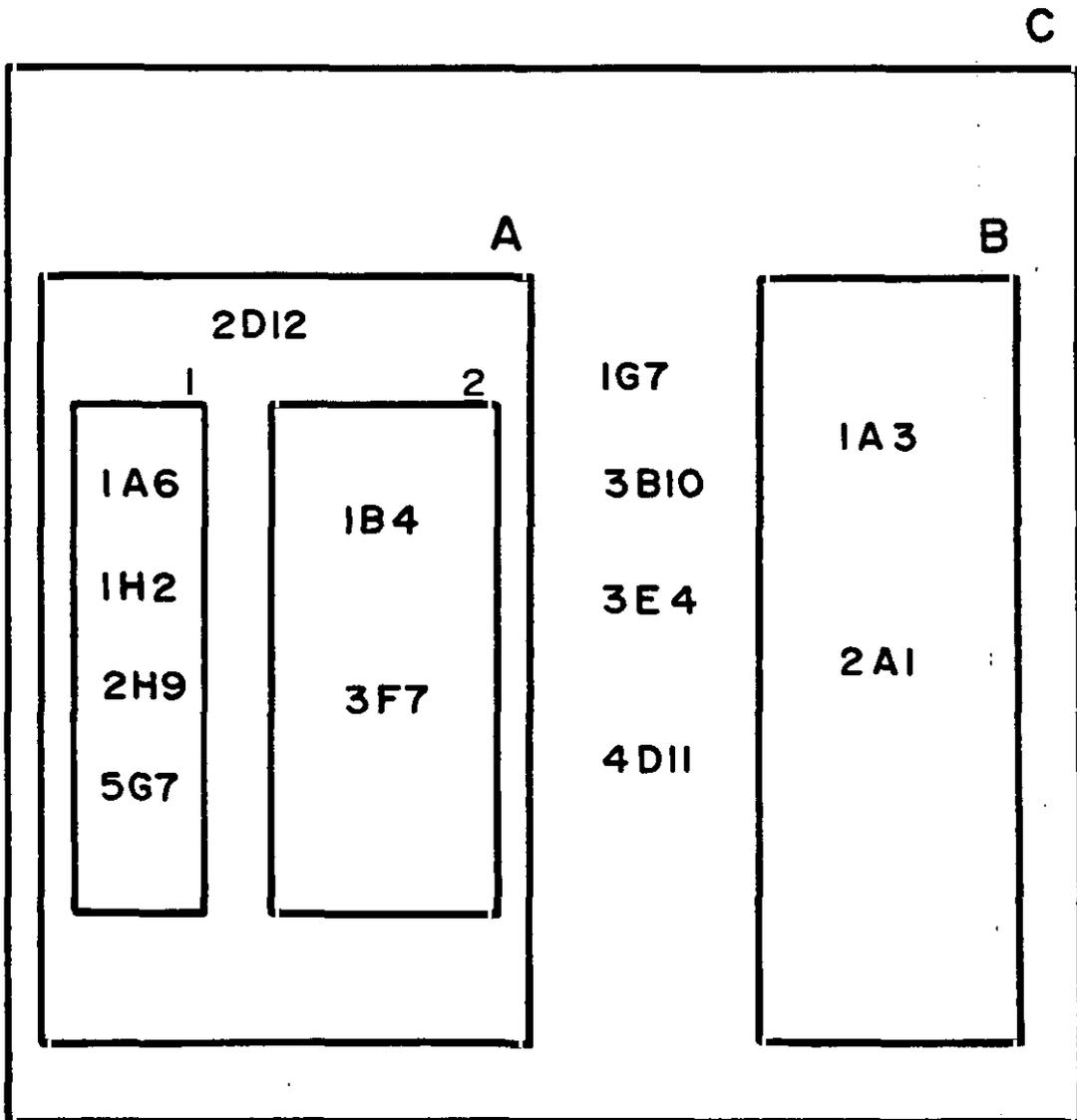
**Fig. 10.** Autorradiografía de SDS-PAGE en condiciones reductoras de Igs de trucha marcadas con  $^{125}\text{I}$  e inmunoprecipitadas con distintos AcM. (1) AcM 1A6. (2) AcM 1B4. (3) AcM 1A3. (4) AcM 1H2. (5) AcM 1G7. (6) AcM 2A1. (7) AcM 3B10. (8) AcM 3E4. (9) AcM 1C6. (10) AcM 4D11. (11) AcM 2H9. (12) AcM 3F7. (13) AcM 2D12. (14) AcM 5G7. El gel es un gradiente del 17-20% de acrilamida.

Los AcM pertenecientes a este último grupo fueron los que inmunoprecipitaron mayores porcentajes de Igs. En SDS-PAGE en condiciones no reductoras, las Igs reconocidas por cada AcM presentaron el mismo patrón electroforético que las Igs totales (Fig. 6B) (datos no mostrados).

#### **4.1. Determinación de la unión simultánea de pares de AcM sobre la molécula de Ig**

Se realizó este ensayo con el fin de detectar posibles variantes antigénicas en las moléculas de Igs de trucha reconocidas por los AcM. Para ello se utilizó un ELISA DAS, en el que las placas fueron tapizadas con cada uno de los AcM. Se añadió a continuación un suero total de trucha o bien Igs purificadas (como control negativo del ensayo se añadió en este paso tampón diluciones de ELISA), y se hizo reaccionar posteriormente cada AcM que tapizaba la placa con el resto de los AcM, marcados con biotina. Considerando que la molécula de Ig es un tetrámero y, por lo tanto, que todos sus epítomos están repetidos al menos ocho veces, todos los AcM deberían reaccionar entre sí, a menos que reconocieran distintos tipos de Igs. Los datos, mostrados en la Fig. 11, permitieron clasificar a los AcM en tres grupos de reactividad que se expresan en la Fig. 12. Los AcM del grupo A (1A6, 1B4, 1H2, 2D12, 2H9, 3F7 y 5G7) no reaccionaron con las Igs reconocidas por los AcM del grupo B (1A3 y 2A1), y viceversa, y ambos grupos reaccionaron con las Igs reconocidas por los AcM del grupo C (1G7, 3B10, 3E4 y 4D11). Dentro del grupo A, los AcM se dividieron en dos subgrupos (1= 1A6, 1H2, 2H9 y 5G7 y 2= 1B4 y 3F7). El subgrupo 1 no reaccionó con las Igs reconocidas por el subgrupo 2, y viceversa, pero ambos compartieron reactividad con las Igs reconocidas por el AcM 2D12.





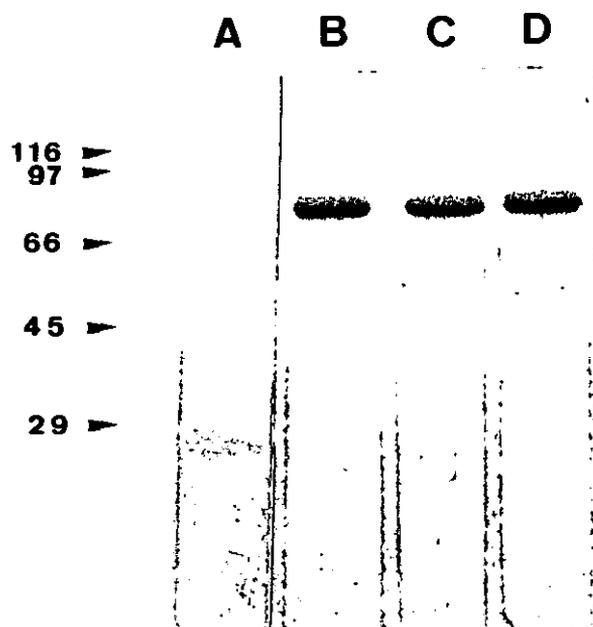
**Fig. 12.** Agrupamiento de los AcM anti-Igs de trucha según su reactividad con el mismo tipo de molécula de Ig. Los AcM pertenecientes a un mismo grupo reaccionan positivamente en un ELISA DAS con todos los miembros de su mismo grupo. De los tres agrupamientos formados, A y B son excluyentes y C comparte reactividades con ambos.

El AcM 1C6 no está incluido en ninguno de los grupos porque no reaccionó con el resto de los AcM en los ELISAs DAS o presentó reactividades dudosas.

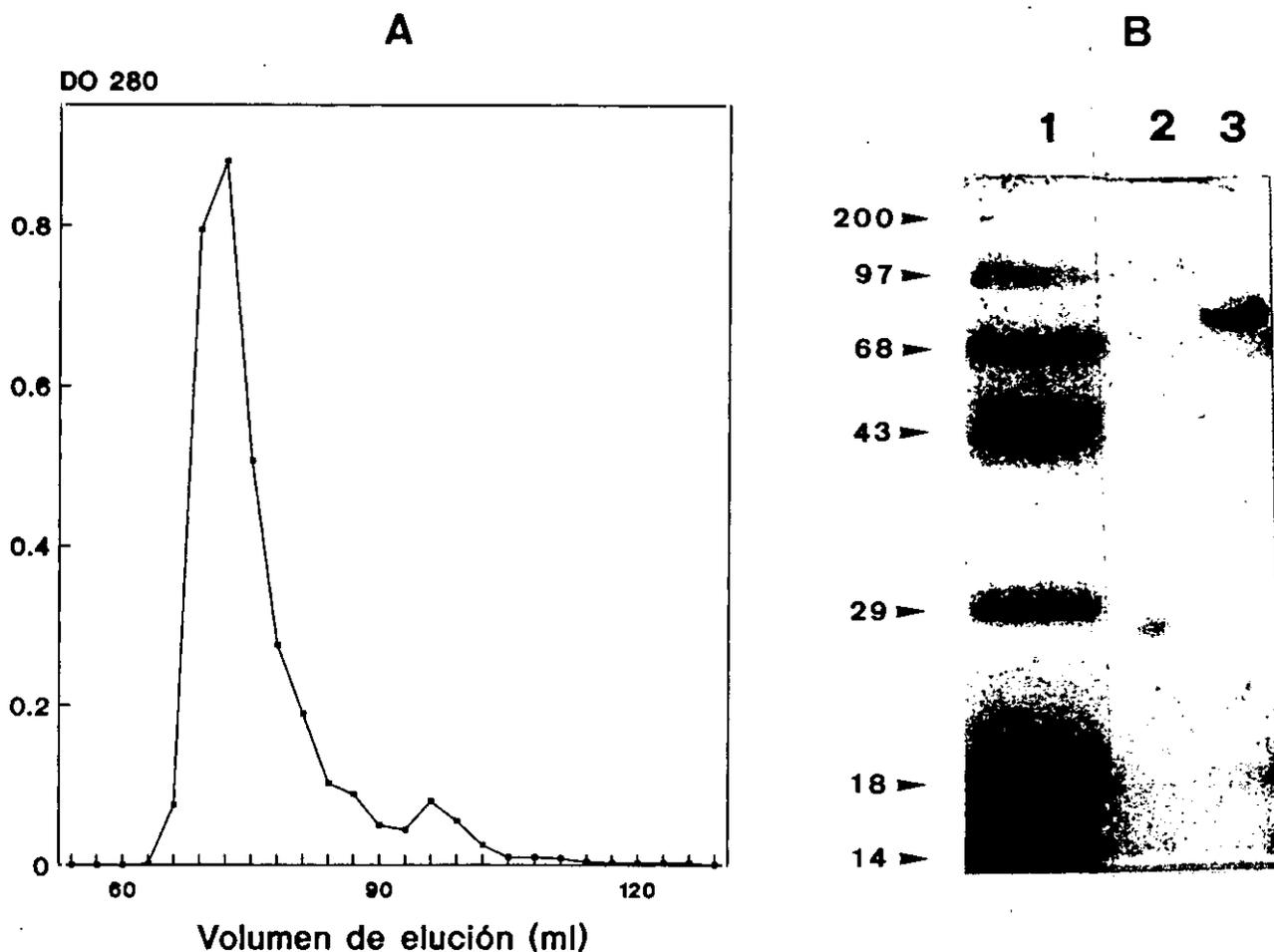
#### **4.2. Análisis de la reactividad de los AcM frente a cadenas pesadas o ligeras**

Se realizaron dos tipos de acercamientos. En primer lugar se realizó un ensayo de inmunolectrotransferencia con todos los AcM sobre filtros de nitrocelulosa a los que se transfirió suero total de trucha o Igs purificadas, tras separación electroforética en condiciones reductoras. Cuatro AcM reaccionaron positivamente con esta técnica. Los AcM 1G7, 3B10 y 4D11 reconocieron una banda sobre el filtro a la altura de las cadenas H de las Igs y el AcM 3E4 reconoció una banda a la altura de las cadenas L (Fig. 13).

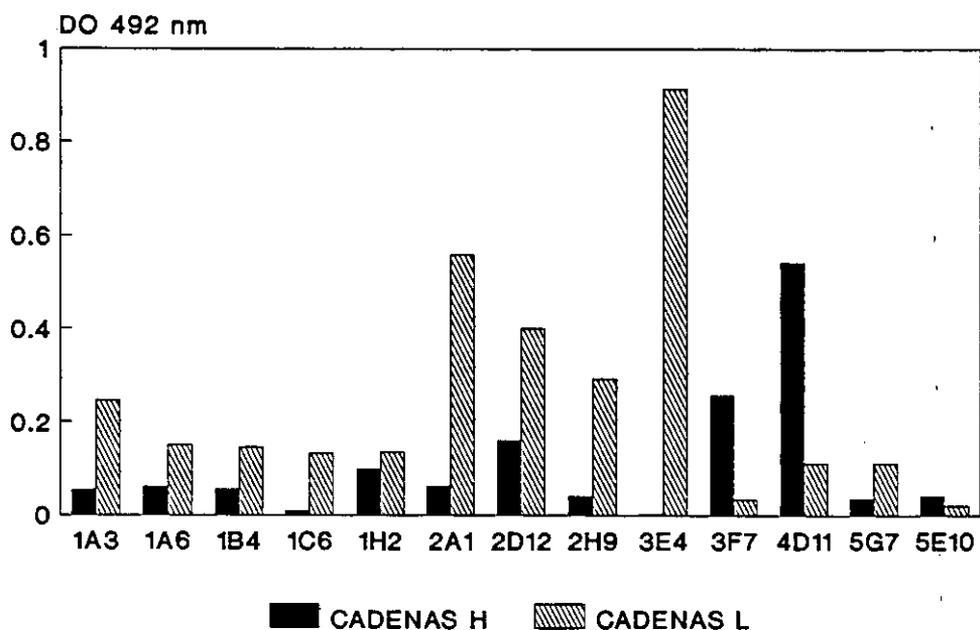
En un segundo abordaje, las Igs de trucha purificadas fueron reducidas con ditiotreitol y alquiladas con iodacetamida, y sus cadenas H y L fueron separadas por una cromatografía de filtración en gel, utilizando como agente disociante ácido acético 1 M (Fig. 14). El contenido de cada fracción obtenida en esta cromatografía fue analizado por SDS-PAGE en condiciones reductoras, escogiéndose las fracciones 31 y 35 (volúmenes de elución 93 y 105 ml), en las que se observó el mayor grado de purificación para las cadenas H y L, respectivamente (Fig. 14). A continuación se ensayó la reactividad de todos los AcM frente a ambas mediante un ELISA (Fig. 15). Como control positivo, se utilizaron los AcM 4D11 y 3E4, que reaccionaron con cadenas H y L, respectivamente, en el ensayo de inmunolectrotransferencia. Dos AcM (3F7 y 4D11) reaccionaron frente a las cadenas H y cinco (1A3, 1C6, 2A1, 2H9 y 3E4) frente a las cadenas L. La reactividad de los cinco AcM restantes (1A6, 1B4, 1H2, 2D12 y 5G7) fue dudosa, aunque reconocieron preferentemente cadenas L.



**Fig. 13.** Inmunoelectrotransferencia con los AcM 3E4 (A), 3B10 (B), 4D11 (C) y 1G7 (D) sobre filtros de nitrocelulosa, a los que se ha transferido un suero total de trucha, tras separación electroforética en un gel de gradiente de acrilamida del 7,5-15%.



**Fig. 14.** (A) Filtración en gel sobre Sephacryl S-300 (5 x 100 cm) de Igs de trucha reducidas con ditiotreitól 0,02 M y alquiladas con iodacetamida 0,12 M. La columna fue equilibrada previamente con ácido acético 1 M. El contenido de cada fracción fue analizado por SDS-PAGE. (B) SDS-PAGE (20% de acrilamida) en condiciones reductoras de las fracciones 35 (línea 2) y 31 (línea 3) de la cromatografía. Línea 1: marcadores electroforéticos de peso molecular. El gel está teñido con Azul Brillante de Coomassie.



**Fig. 15.** Reactividad de los AcM anti-Igs de trucha frente a cadenas pesadas y ligeras aisladas, ensayada mediante un ELISA indirecto. Las placas, tapizadas con  $0,2 \mu\text{g/pocillo}$  de cadenas H o cadenas L, fueron incubadas con una dilución  $1/20$  de los AcM (líquido ascítico) y los complejos proteína-AcM se revelaron con un antisuero de conejo anti-Igs de ratón conjugado con peroxidasa. Como control negativo de la reacción se utilizó la ascitis de un AcM irrelevante (5E10). Los valores corresponden a las absorbancias a 492 nm.

#### **4.3. Reactividad de los AcM frente a determinantes azucarados de las Igs de trucha**

Para determinar si los epítomos reconocidos por los AcM eran de naturaleza proteica o estaban constituidos por carbohidratos, se realizaron dos tipos de ensayos.

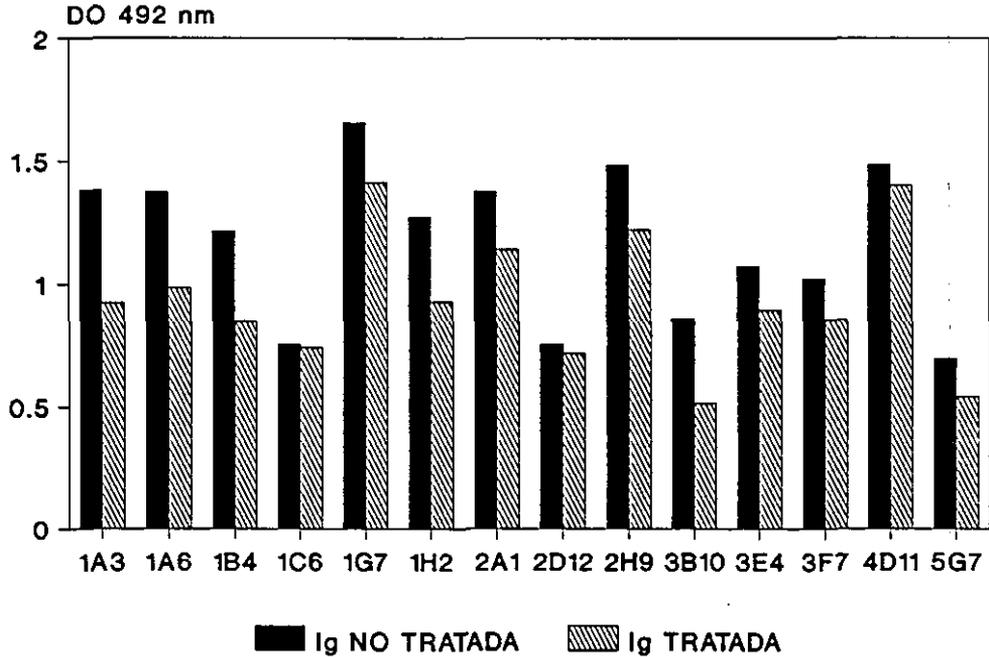
En primer lugar, las Igs, adsorbidas previamente sobre placas de ELISA, fueron sometidas a un tratamiento con metaperiodato, el cual, realiza una oxidación suave de los carbohidratos, alterando su estructura sin que el tratamiento afecte a las cadenas polipeptídicas. Posteriormente, se ensayó la reactividad de los AcM con las Igs, no observándose diferencias significativas entre la reactividad de dichos AcM frente a las Igs tratadas con metaperiodato y la reactividad frente a las no tratadas (Fig. 16).

Se realizaron asimismo inmunoadsorciones con los AcM 1G7, 2A1 y 2H9 de las Igs procedentes de sobrenadantes de cultivos de linfocitos tratados con tunicamicina (Fig. 17). Todos ellos reconocieron de igual forma las Igs procedentes de cultivos tratados con esta droga, que las Igs procedentes de un cultivo control.

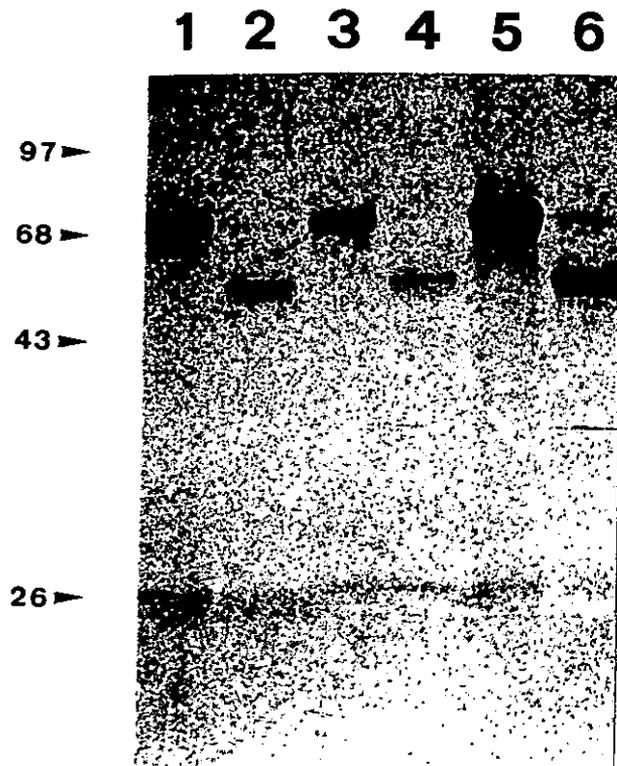
#### **4.4. Reactividad de los AcM frente a determinantes alotípicos de las Igs de trucha**

Con objeto de determinar si alguno de los AcM que precipitaban bajos porcentajes de Igs reconocían determinantes alotípicos de la molécula de Ig de trucha, se analizó su reactividad con, al menos, 20 sueros individualizados de trucha, mediante un ELISA DAS.

## METAPERIODATO



**Fig. 16.** Análisis de la reactividad de los AcM frente a determinantes azucarados de las Igs. Los ensayos se realizaron mediante un ELISA indirecto, en el que las placas se tapizaron con Igs tratadas con metaperiodato y con Igs no tratadas. Posteriormente fueron añadidos los distintos AcM anti-Igs biotinados, a varias diluciones, y la reacción se reveló con avidina conjugada con peroxidasa. Los resultados se expresan como la absorbancia a 492 nm obtenida a partir de una dilución 1/400 de cada uno de los AcM.



**Fig. 17.** Autorradiografía de SDS-PAGE (gradiente 17-20% de acrilamida) en condiciones reductoras de las Igs reconocidas por el AcM 2A1 (líneas 1 y 2), 2H9 (líneas 3 y 4) y 1G7 (líneas 5 y 6), obtenidas a partir de sobrenadantes de cultivos de linfocitos tratados con tunicamicina (líneas 2, 4 y 6) y de sobrenadantes de cultivos controles (líneas 1, 3 y 5).

Para realizar este ensayo se emplearon sueros obtenidos en piscifactorias de Teruel, Avila, Segovia, Guadalajara y La Coruña. En la Tabla III, se muestran las reactividades de algunos de los AcM frente a estos sueros.

Los AcM 1A3, 1B4 y 5G7 resultaron negativos para algunos de los sueros. Cada uno de estos tres AcM presentó reactividades altas con otros sueros ensayados; además, otros AcM que reconocen los mismos tipos de Igs que los AcM 1A3, 1B4 y 5G7, resultaron positivos para los sueros en los que éstos fueron negativos. Estos datos sugieren que los AcM 1A3, 1B4 y 5G7 podrían reconocer determinantes alotípicos en las Igs de trucha.

Los AcM 1G7, 3B10, 3E4 y 4D11 fueron analizados con más de 200 sueros en distintos tipos de ensayos y siempre resultaron positivos.

#### **4.5. Reactividad de los AcM frente a determinantes idiotípicos de las Igs de trucha**

Para descartar la posible reactividad frente a determinantes idiotípicos de los AcM que inmunoprecipitaban bajos porcentajes de Igs, se analizó su reactividad frente a anticuerpos de trucha específicos de dos tipos de antígenos: LPS de S. typhimurium y TNP<sub>11</sub>-OVA, considerando que los anticuerpos dirigidos frente a dos antígenos distintos poseen, en general, determinantes idiotípicos diferentes.

El ensayo se realizó mediante un ELISA indirecto. Todos los AcM, excepto el AcM 1C6, reconocieron las Igs anti-LPS y anti-TNP-OVA, lo que sugiere que los determinantes reconocidos por ellos no son de naturaleza idiotípica (Fig. 18). El AcM 1C6 presentó una baja reactividad frente a LPS, y muy ligera, aunque

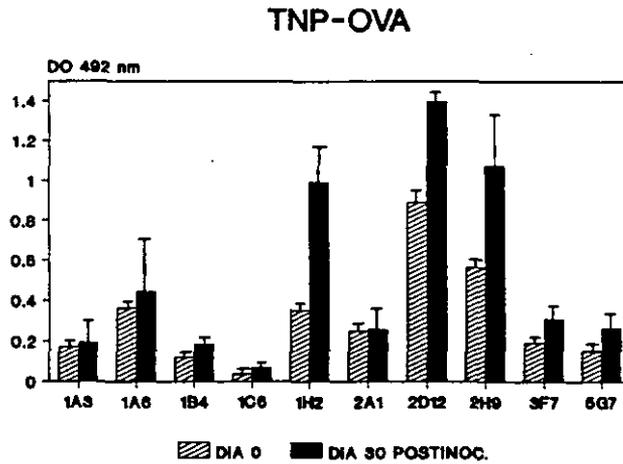
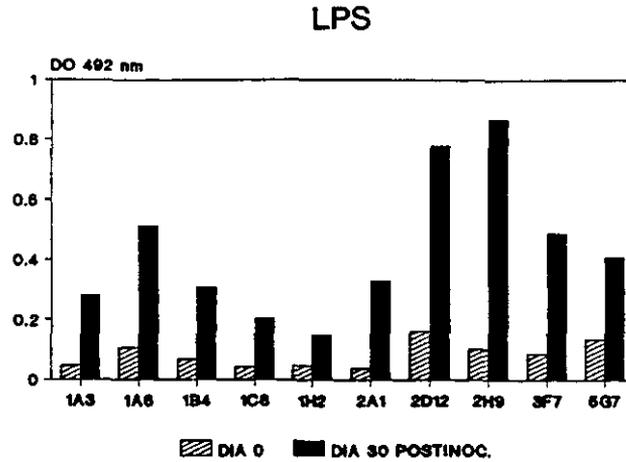
**TABLA III**

	<b>SUEROS</b>									
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>
1A3	0,25	0,57	1,09	0,07	0,33	0,27	0,19	0,16	0,19	0,27
1A6	0,33	0,37	0,30	0,34	0,34	0,32	0,39	0,35	0,33	0,33
1B4	0,06	0,11	0,41	0,10	0	nd*	0	0,32	0,24	0,38
1H2	0,37	0,50	1,02	0,66	0,23	0,41	0,50	0,69	0,34	0,21
2A1	0,49	0,60	1,67	1,20	0,85	0,34	0,47	0,25	0,33	0,41
2D12	1,85	1,69	0,91	1,85	1,54	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85
2H9	0,13	0,43	0,74	0,92	0,53	0,35	0,35	0,29	0,26	0,23
3F7	0,37	0,52	0,69	1,02	0,38	0,60	0,28	0,76	0,56	0,77
5G7	0,22	0,49	0,48	0,34	0,19	0,51	0,35	0,56	0,38	0,52

	<b>SUEROS</b>									
	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>
1A3	0,22	0,58	0,47	1,48	0,86	1,05	0,96	0,96	1,05	1,53
1A6	0,13	0,34	0,90	1,16	0,90	1,16	1,16	0,46	1,16	1,16
1B4	0,34	0,75	0,48	1,78	1,86	0,49	1,33	0,84	1,05	0,88
1H2	1,29	0,87	0,87	0,82	1,10	1,10	1,10	0,59	0,64	1,10
2A1	0,51	0,67	0,69	1,07	0,86	1,07	0,85	1,07	1,07	1,07
2D12	1,85	1,37	0,89	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85
2H9	0,59	0,98	0,74	0,98	0,98	0,98	0,98	0,31	0,82	0,98
3F7	0,62	0,96	0,74	1,84	1,64	0,63	1,39	0,58	0,68	0,86
5G7	0,13	0,28	0,32	1,22	1,40	0,08	1,63	0,03	0,18	1,63

Análisis de la reactividad de los AcM frente a los sueros de 20 truchas por ELISA DAS. Las placas se tapizaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Igs de trucha. A continuación se añadieron los distintos sueros a una dilución 1/100 y posteriormente se hizo reaccionar cada suero con todos los AcM biotinados. Los resultados se expresan en absorbancias a 492 nm.

nd\*: no determinado.



**Fig. 18.** Reactividad de los distintos AcM frente a Igs de trucha específicas, producidas tras su inmunización con LPS o TNP<sub>11</sub>-OVA, mediante un ELISA indirecto. Las placas fueron tapizadas con 10 µg/ml de ambos antígenos y a continuación se añadieron los sueros de trucha, obtenidos antes de la inmunización o tras un mes de la misma, a una dilución 1/100. Posteriormente, se añadieron los distintos AcM, y la reacción se reveló con un antisuero de conejo anti-Igs de ratón. Los valores corresponden a las absorbancias a 492 nm. Los datos, en el caso del LPS, corresponden al suero de un individuo, y en el caso del TNP, a la media ± desviación estándar de los sueros de tres animales.

por encima del control negativo, frente a TNP-OVA. También se observó que las truchas poseían anticuerpos naturales anti-TNP-OVA, ya que los AcM reaccionaron con Igs específicas frente a este antígeno en los sueros no inmunes.

#### **4.6. Análisis epitópico**

Los epítomos reconocidos por los AcM específicos de cadenas H o L fueron analizados mediante ensayos de competición. Las placas de ELISA fueron tapizadas con Igs de trucha purificadas, sobre las que se añadió una solución que contenía un AcM marcado con biotina, a una dilución óptima previamente ensayada, y cantidades crecientes del mismo AcM o de otros AcM purificados. Los perfiles de competición representativos, en los que la inhibición obtenida fue mayor del 10%, se muestran en la Fig. 19 A y B. El AcM 4D11 inhibió parcialmente la unión del AcM 1G7 biotinado a las Igs de trucha, aunque esta inhibición no fue recíproca. El AcM 2A1 compitió con el AcM 1A3 marcado con biotina. El AcM 2H9 inhibió la unión del AcM 5G7 biotinado a las Igs de trucha y los AcM 2D12 y 5G7 inhibieron esta unión para el AcM 1H2 biotinado, pero no recíprocamente. Los restantes AcM sólo fueron competidos por ellos mismos, lo cual indicaba que reconocían epítomos diferentes.

#### **4.7. Reactividad de los AcM con Igs de diferentes especies de salmónidos**

La reactividad de los AcM frente a las Igs de varias especies de salmónidos se muestran en la Tabla IV. Las especies utilizadas fueron: trucha arcoiris, trucha común (Salmo trutta), salmón coho (Oncorhynchus kisutch), salmón chinook (O. tshawytscha), salmón chum (O. keta) y salmón sockeye (O. nerka).

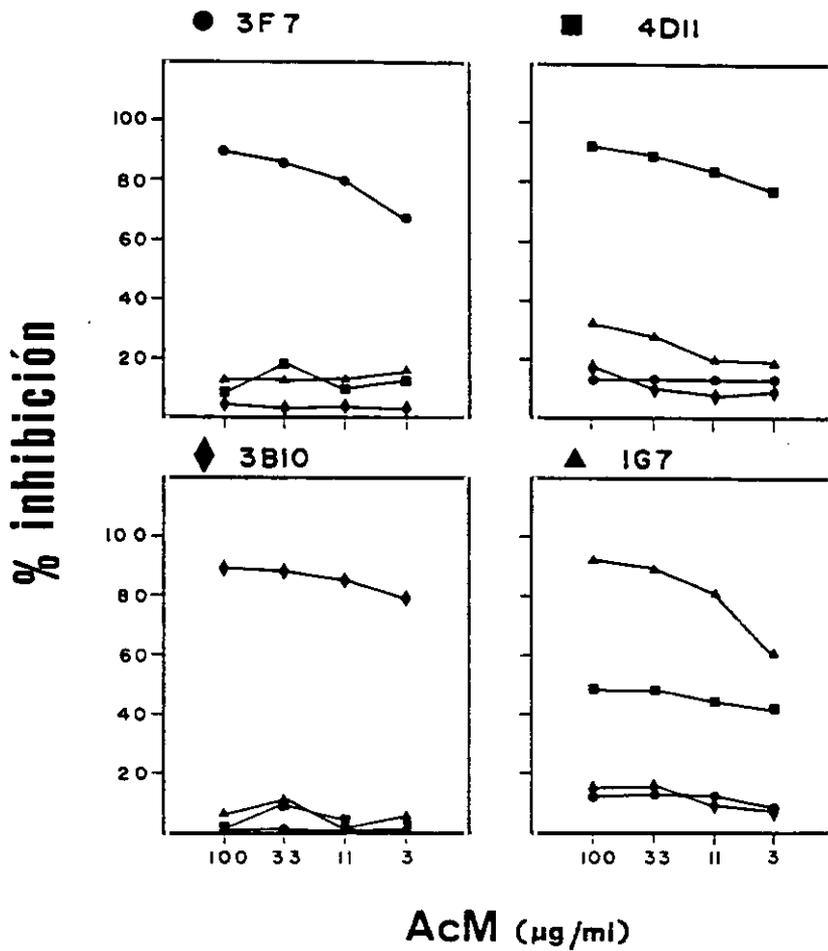


Fig. 19 A. Perfiles de competición de los AcM anti-cadenas H. La unión de los AcM marcados con biotina a las placas adsorbidas con Igs de trucha fue competida con diferentes cantidades de los AcM no marcados, purificados por cromatografía de afinidad sobre Proteína A-Sepharosa CL-4B. AcM 3F7 (●), 4D11 (■), 3B10 (◆) y 1G7 (▲).

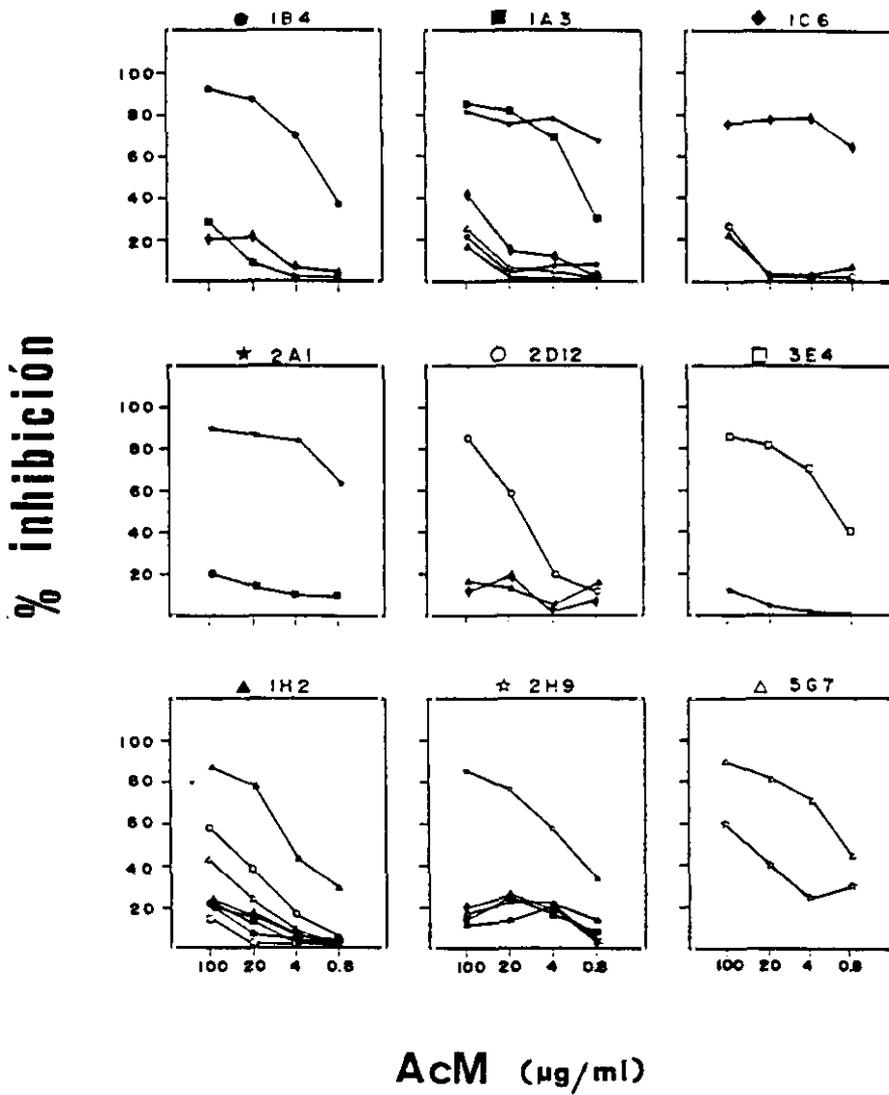


Fig. 19 B. Perfiles de competición de los AcM anti-cadenas L. AcM 1B4 (-●-), 1A3 (-■-), 1C6 (-◆-), 2A1 (-★-), 2D12 (-○-), 3E4 (-□-), 1H2 (-▲-), 2H9 (-☆-) y 5G7 (-△-).

TABLA IV

Reactividad de los AcM anti-Igs de trucha arcoiris frente a sueros de distintos salmónidos

ESPECIES	2H9	1B4	1A3	1H2	2A1	1A6	2D12	3F7	5G7	4D11	3E4	3B10
Trucha arcoiris	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trucha común	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salmón chinook	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Salmón coho	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Salmón sockeye	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Salmón chum	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

La reactividad se determinó mediante un ELISA DAS. Las placas fueron tapizadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de cada AcM; a continuación se añadieron los distintos sueros de salmónidos a una dilución 1/20 y la reacción fue revelada con el AcM 1G7 biotinado (dilución 1/400) y avidina conjugada con peroxidasa (dilución 1/2000). La reactividad del AcM 1G7 con todos los sueros de salmónidos analizados fue determinada previamente.

Cinco de los AcM específicos de cadenas L (1A6, 1B4, 2A1, 2D12 y 2H9) y tres de los AcM específicos de cadenas H (1G7, 3B10 y 4D11) reaccionaron con los sueros de todas las especies de salmónidos analizadas. Los restantes AcM reaccionaron sólo con algunas de las especies estudiadas. El AcM 3E4 fue el que presentó una reactividad más restringida, ya que sólo reconoció las Igs de las dos especies de trucha analizadas (trucha arcoiris y trucha común). La reactividad del AcM 1C6 con estos sueros de salmónidos no pudo ser determinada ya que no reacciona en ELISA DAS con las Igs de trucha arcoiris.

#### **4.8. Análisis del porcentaje de células con Igs de superficie en distintos órganos linfoides de la trucha**

Para realizar este análisis se emplearon suspensiones celulares de pronefros, mesonefros, bazo y timo de trucha, y linfocitos de sangre periférica purificados mediante un gradiente de Ficoll. Como control positivo para el marcaje de la población total de células con Igs de superficie se utilizó el AcM 1.14 (DeLuca et al., 1983).

El mayor porcentaje de células  $Ig^+$  se obtuvo en sangre periférica, con un 46% para el AcM 1.14, un 38% para el AcM 1G7 y un 41% para el AcM 3B10. Los AcM que reconocían bajos porcentajes de Igs séricas, también tiñeron un menor número de células en sangre periférica (5-20%) (Tabla V).

En los órganos, el mayor porcentaje de células con Igs de superficie se obtuvo en el bazo, con una media del 23% de células positivas, frente al 12% en el pronefros y al 14% en el mesonefros. Tanto en el pronefros como en sangre periférica, los porcentajes más altos se obtuvieron con el AcM 1.14, mientras que en el mesonefros y el bazo, el número de células teñidas con el AcM 1G7 fue similar al obtenido con el AcM 1.14 (Tabla V).

**TABLA V**

	PRONEFROS	MESONEFROS	BAZO	TIMO	SANGRE
1.14	18,1 ± 4,6	13 ± 6,5	25,8 ± 10	0,6 ± 0,1	46,5 ± 11
1G7	10,7 ± 4,7	17,6 ± 9,8	27,4 ± 13	0,85 ± 0,2	38,4 ± 7
4D11	9,6* (13)	8,9* (8)	17* (15,2)	28,1 ± 5,1	nd
3F7	3,2* (17)	12,3* (31)	6,1* (36)	1,4 ± 0,8	13,5 ± 11
3B10	nd	nd	nd	nd	41* (45)
3E4	9,7* (13)	8,6* (8,2)	22* (15,2)	nd	29 ± 0,8
2H9	6,3 ± 3,2	11,8 ± 0,5	8,2 ± 2,7	0,85 ± 0,8	14,6 ± 1
2A1	12,2 ± 4,4	19,9 ± 5,1	18,5 ± 6,5	1,1 ± 1	24,8 ± 2
1B4	nd	nd	nd	nd	22* (45)
1A3	nd	nd	nd	nd	9,2* (45)
1A6	nd	nd	nd	nd	5,7* (45)
5G7	nd	nd	nd	nd	7,8* (45)

Porcentaje de células Ig<sup>+</sup> reconocidas por distintos AcM en pronefros, mesonefros, bazo, timo y sangre periférica, expresada como la media ± desviación estándar de cinco (pronefros), tres (mesonefros, bazo y sangre periférica) o dos (timo) experimentos. El porcentaje de células fluorescentes específicas se calculó sustrayendo el obtenido con el AcM control anti-IPNV 5E10 del porcentaje de células reconocidas por los AcM.

\*: porcentaje obtenido en un solo experimento. El número entre paréntesis indica el porcentaje de células Ig<sup>+</sup> totales en ese experimento, obtenidas con el AcM 1.14.

nd: no determinado.

En el timo, todos los AcM reconocieron un bajo porcentaje de células (0,5-1,5%), a excepción del AcM 4D11, que tiñó un 28% de los timocitos.

## **5. ANÁLISIS DE LA HETEROGENEIDAD DE CADENAS L EN LAS Igs DE TRUCHA**

Este análisis se realizó con dos AcM, el 2H9 y el 2A1, que reconocían específicamente Igs que contenían cadenas ligeras de 26 kDa (2H9) y de 24 kDa (2A1) (Fig. 10). Además, ambos AcM reaccionaban preferentemente con cadenas L, como se determinó por ELISA usando cadenas H y L aisladas (Fig. 15).

Cuando los AcM 2A1 y 2H9, que separadamente inmunoprecipitaban un 11,5% y un 20,3% del total de Igs de trucha, fueron mezclados, se obtuvo un efecto aditivo (33,8%), indicando que reconocían dos poblaciones de Igs antigénicamente diferentes (Tabla VI). En la Fig. 20 se muestran los patrones electroforéticos en condiciones reductoras de las Igs reconocidas por los AcM 2H9 y 2A1. Cuando se mezclaron ambos AcM aparecieron en las inmunoprecipitaciones Igs que contenían las dos cadenas ligeras. Las Igs no reconocidas por ninguno de los dos AcM, que quedaban en los sobrenadantes de estos ensayos, contenían aparentemente sólo la cadena L de 26 kDa, que es la cadena mayoritaria en la trucha.

Cuando se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, no se observaron diferencias entre las Igs 2A1 y 2H9. Ambas presentaban una banda principal de 750 kDa y tres bandas adicionales de 570, 360 y 190 kDa (Fig. 20).

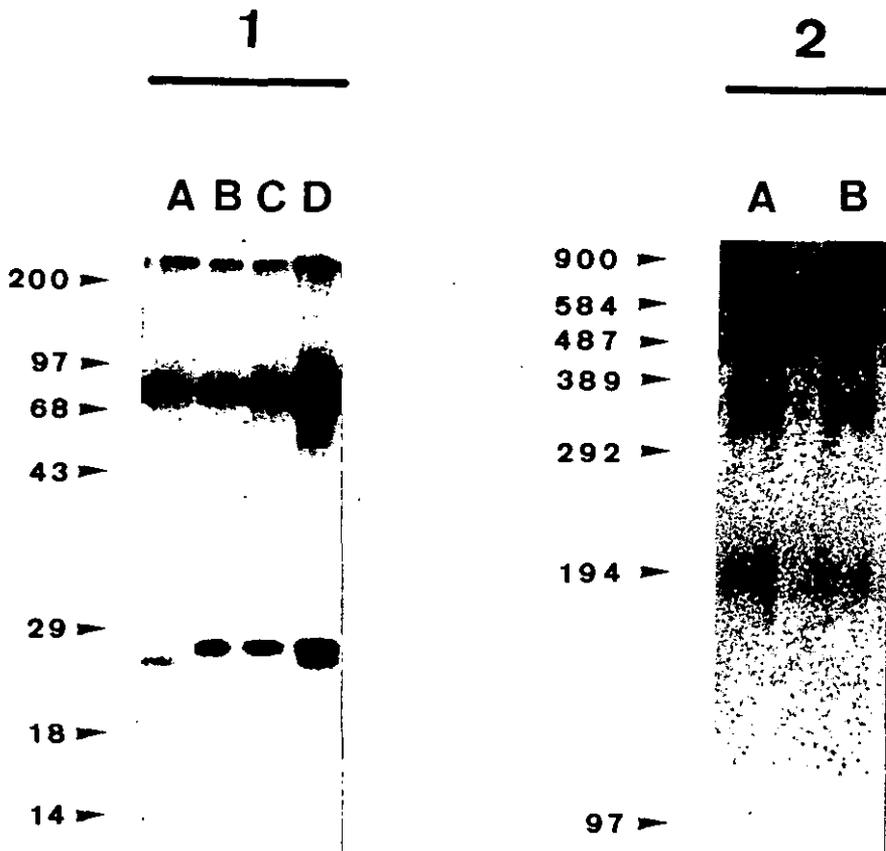
Para confirmar los porcentajes obtenidos en los experimentos de inmunoprecipitación, las Igs reconocidas por estos AcM fueron aisladas de una mezcla de sueros de trucha, por cromatografías

**TABLA VI**

Porcentaje de Ig de trucha marcada con <sup>125</sup>I e inmunoprecipitada con los AcM 1G7, 2H9 y 2A1.

<b>AcM</b>	<b>cpm</b>	<b>PORCENTAJE</b>
1G7 + 5E10	70.123	100
2H9 + 5E10	14.235	20,3
2A1 + 5E10	7.859	11,2
2H9 + 2A1	23.706	33,8

Se utilizó una alícuota de 100.000 cpm ( $\approx$  1,5 ng) de Ig de trucha marcada para cada AcM. Los porcentajes fueron calculados considerando como el 100% de Ig de trucha antigénicamente activa las cpm precipitadas por el AcM 1G7, usado para el aislamiento de las Igs de trucha por cromatografía de afinidad. En las inmunoprecipitaciones simples se mezclaron los AcM anti-Igs de trucha con un AcM irrelevante anti-IPNV (5E10).



**Fig. 20.** (1) Autorradiografía de SDS-PAGE en condiciones reductoras (gradiente del 17-20% de acrilamida) de Igs de trucha marcadas con  $^{125}\text{I}$ , obtenidas por ensayos de inmunoabsorción con los AcM 2A1 (línea A) y 2H9 (línea B). Línea C: Igs de trucha no reconocidas por los AcM 2A1 y 2H9. Línea D: Igs de trucha obtenidas con los AcM 2A1 y 2H9 mezclados. (2) Autorradiografía de SDS-PAGE (3,5% de acrilamida) de Igs de trucha marcadas con  $^{125}\text{I}$  en condiciones no reductoras, seleccionadas por ensayos de inmunoabsorción con los AcM 2H9 (A) y 2A1 (B). Los números del margen izquierdo en (1) y (2) corresponden al peso molecular aparente de los marcadores en kDa.

de afinidad sobre bolas de sefarosa, a las que se acoplaron cada uno de los AcM. Las Igs recuperadas de las columnas representaron un 10,1% (2A1) y un 16,7% (2H9) del total de Igs séricas. Estos porcentajes fueron determinados por un ELISA DAS, utilizando el AcM 1G7 para la cuantificación de las Igs de trucha totales. En las fracciones no adsorbidas a las respectivas columnas no se detectaron por ELISA Igs 2A1 o 2H9.

Para determinar si la diferencia en peso molecular de ambas cadenas L era debida a diferencias en la glicosilación, las Igs reconocidas por los AcM 2A1 y 2H9 se sometieron a un tratamiento con TFMS y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras (Fig. 21). De nuevo se observó una clara reducción en el peso molecular de las cadenas H ( $\approx 17\%$  de su masa molecular), mientras que no se encontraron diferencias de peso molecular entre las cadenas L de las Igs tratadas y no tratadas.

La digestión de las cadenas L de 26 y 24 kDa, aisladas por cromatografías de afinidad utilizando los AcM 2H9 y 2A1, con la proteasa V8 de S. aureus reflejó diferencias claras en las movilidades relativas de algunos de los péptidos obtenidos, así como en las cantidades relativas de varios de los péptidos compartidos por ambas cadenas (Fig. 22).

Con objeto de analizar la expresión celular de estas dos subpoblaciones de Igs, se realizaron ensayos de doble marcaje con los AcM 2H9 y 2A1. Las células utilizadas se obtuvieron a partir de cultivos de pronefros de trucha, estimulados durante ocho días con LPS. El AcM 2H9 se reveló con peroxidasa, y el AcM 2A1 con fosfatasa alcalina. En la Fig. 23 se observa la tinción diferencial de las células con ambos AcM, lo que sugiere que las dos cadenas L reconocidas por ellos son sintetizadas en poblaciones celulares distintas.

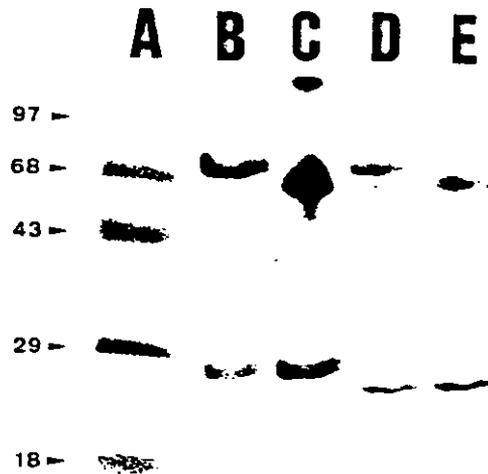


Fig. 21. SDS-PAGE (20% de acrilamida) en condiciones reductoras de las Igs 2H9 (líneas B y C) y 2A1 (líneas D y E), deglicosiladas químicamente por tratamiento con ácido trifluorometano sulfónico (TFMS). Líneas B y D: Igs no tratadas. Líneas C y E: Igs tratadas con TFMS. Los marcadores de peso molecular (línea A) están indicados en kDa. El gel fue teñido con Azul Brillante de Coomassie.

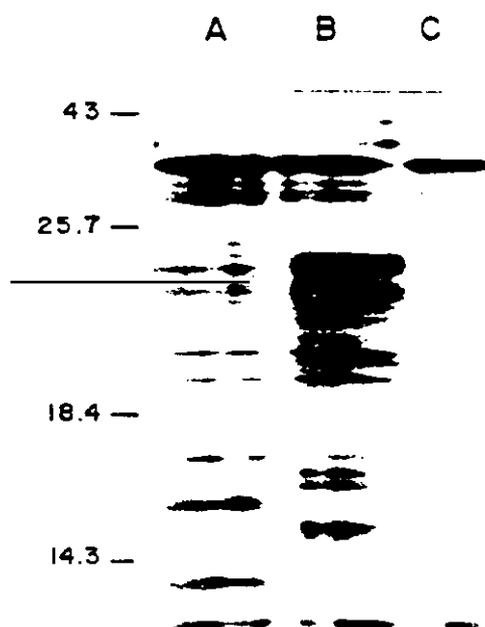
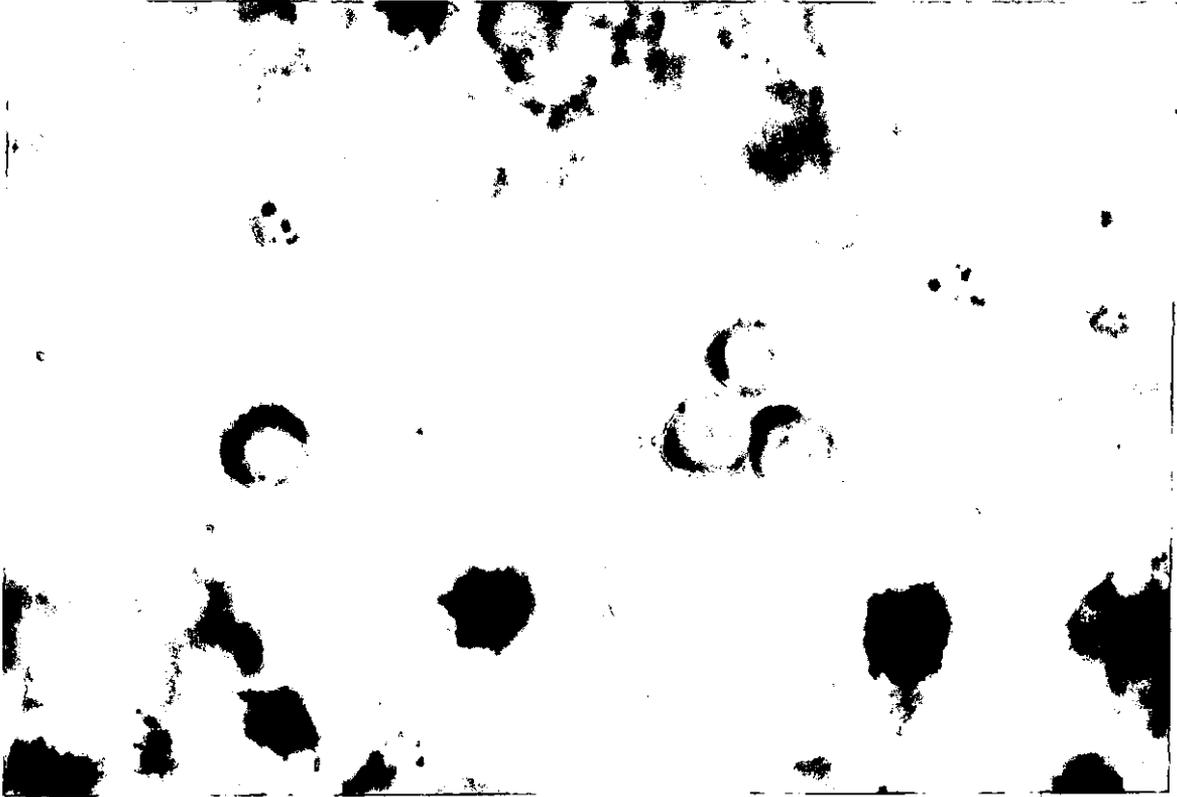


Fig. 22. Mapas peptídicos de las cadenas L reconocidas por el AcM 2H9 (A) y por el AcM 2A1 (B), tras digestión con la proteasa V8 de S. aureus. Línea C: control de la proteasa V8. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en SDS-PAGE sobre un gel de gradiente de acrilamida del 17-20% y teñidas mediante una tinción con plata. Los números del margen izquierdo corresponden a los pesos moleculares de los marcadores en kDa.



**Fig. 23.** Células de pronefros de trucha arcoiris estimuladas con LPS durante ocho días, citocentrifugadas y fijadas. Técnica inmunoenzimática de doble marcaje con peroxidasa (AcM 2H9) y fosfatasa alcalina (AcM 2A1). x 3000.

Estos ensayos se completaron con experimentos de citometría de flujo. El porcentaje de células de pronefros, mesonefros, bazo y sangre periférica reconocidas por los dos AcM por separado y mezclados se refleja en la Tabla VII. El porcentaje total de células Ig<sup>+</sup> se determinó con el AcM 1.14. En general, el AcM 2A1 reconoció un mayor porcentaje de células que el AcM 2H9 en los distintos órganos. Se observó siempre un efecto aditivo en el porcentaje de células reconocidas cuando se mezclaron ambos anticuerpos, aunque en sangre periférica este incremento no se correspondió con la suma exacta de los porcentajes obtenidos con los AcM por separado. En el pronefros y en el bazo, el número de células teñidas con los dos AcM fue similar al número total de células Ig<sup>+</sup> determinadas con el AcM 1.14. En el mesonefros, el porcentaje obtenido con los dos AcM superó en un 10% al determinado con el AcM 1.14. Sólo en sangre periférica el porcentaje total de células Ig<sup>+</sup> fue claramente superior (46,5%) al porcentaje de células 2H9 y 2A1 (32,3%).

En todos los órganos estudiados se observó una pronunciada variabilidad individual en los porcentajes obtenidos, siempre mayor en el caso del AcM 2A1, siendo en sangre periférica donde se obtuvo una menor variación en dichos porcentajes.

## **6. CARACTERIZACIÓN DE LAS Igs RECONOCIDAS POR EL AcM 3F7**

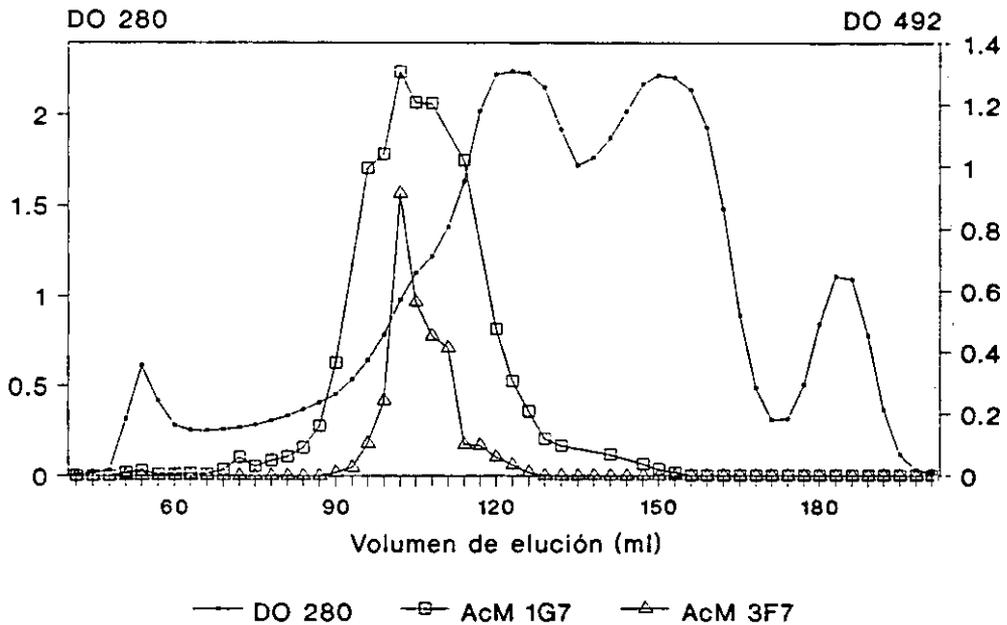
Las Igs reconocidas por el AcM 3F7 fueron analizadas con mayor detalle por ser el único AcM obtenido que, reaccionando con porcentajes bajos de Igs ( $\approx 20\%$ ), reconocía un epítipo localizado en las cadenas pesadas (Fig. 15).

Las Igs reconocidas por el AcM 3F7 son de alto peso molecular, y en una cromatografía de filtración en gel eluyen en el mismo volumen que las Igs tetraméricas encontradas habitualmente (Fig. 24).

**TABLA VII**

	<b>PRONEFROS</b>	<b>MESONEFROS</b>	<b>BAZO</b>	<b>SANGRE</b>
<b>2H9</b>	6,4 ± 3,2	11,8 ± 0,5	8,2 ± 2,7	14,6 ± 1
<b>2A1</b>	12,2 ± 4,4	19,9 ± 5,1	18,5 ± 6,5	24,8 ± 2
<b>2H9 + 2A1</b>	18,7 ± 6,8	30,1 ± 8,6	29 ± 12,1	32,3 ± 2
<b>TOTAL</b>	18,1 ± 4,6	19,7 ± 11	25,8 ± 10	46,5 ± 12

Porcentaje de células reconocidas por los AcM 2H9 y 2A1 sobre suspensiones celulares de pronefros, bazo y mesonefros. Los datos están expresados como la media ± desviación estándar de los valores específicos del porcentaje de células fluorescentes, obtenidos a partir de cinco experimentos en pronefros, de tres experimentos en bazo y sangre y de dos experimentos en mesonefros. Cada muestra de sangre periférica analizada consistió en una mezcla de células de cuatro individuos, purificadas por un gradiente de Ficoll. El porcentaje total representa el obtenido con el AcM 1.14.



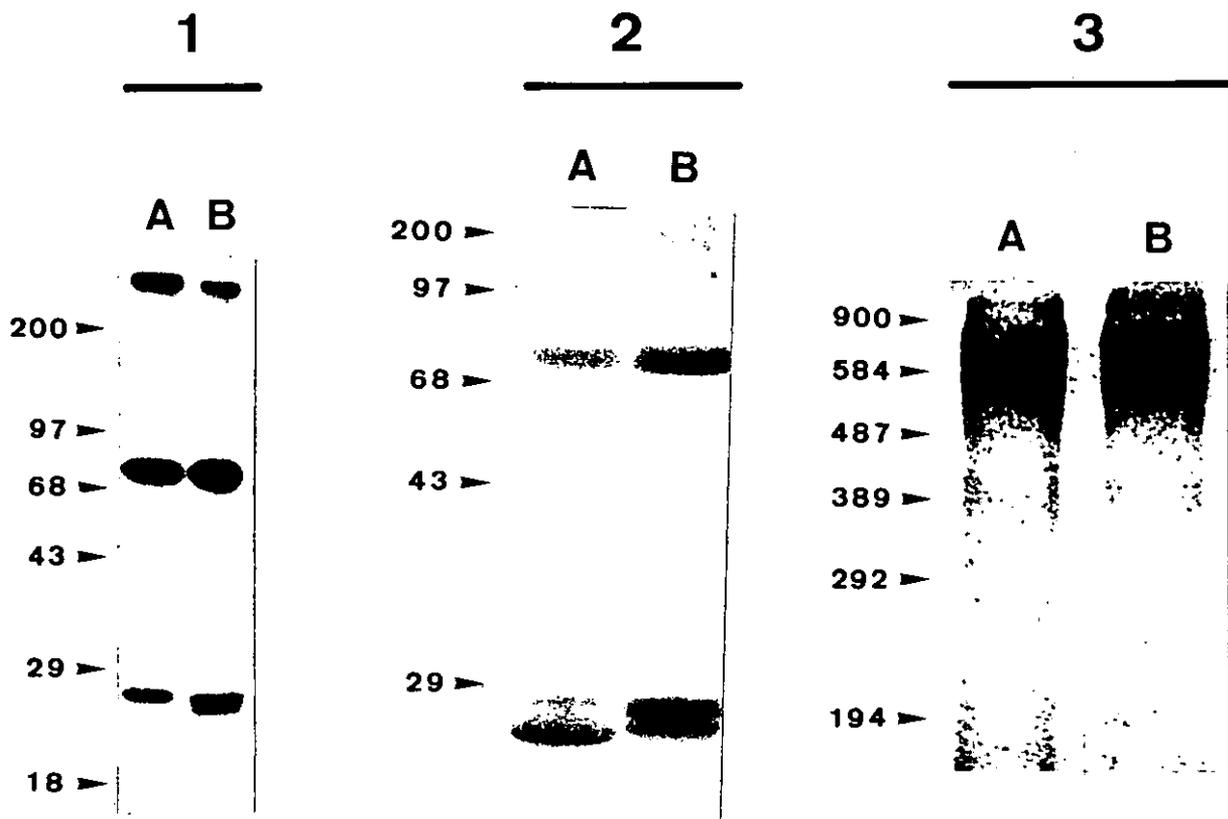
**Fig. 24.** Filtración en gel de un suero total de trucha sobre Bio-Gel A-5 m (5 x 100 cm). La columna fue equilibrada con PBS y se recogieron fracciones de 3 ml. La cantidad de proteína eluida se expresa como densidad óptica a 280 nm (DO 280) y la actividad Ig como densidad óptica a 492 nm (DO 492). La actividad Ig se determinó mediante un ELISA DAS en el que las placas fueron tapizadas con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Igs de trucha. A continuación se añadieron las distintas fracciones obtenidas de la cromatografía, a una dilución 1/30, y la reacción se reveló con los AcM 1G7 (para la detección de la fracción de Igs totales) o 3F7 biotinados, y avidina conjugada con peroxidasa.

En la figura 25, se muestran los patrones electroforéticos de las Igs 3F7 en condiciones reductoras y no reductoras. En condiciones reductoras, había diferencias estructurales entre las Igs 3F7 obtenidas por inmunoprecipitación y las Igs purificadas por cromatografías de afinidad. Las Igs obtenidas por el primer método, contenían un sólo tipo de cadenas L, de 26 kDa. Las Igs aisladas por cromatografía de afinidad acoplado a la columna el AcM 3F7, presentaban una banda adicional de 23-24 kDa. En la misma figura se muestran las Igs no reconocidas por el AcM 3F7, a las que denominaremos Igs no 3F7. Estas Igs fueron obtenidas a partir de la fracción de suero no adsorbida a la columna de afinidad del AcM 3F7, a través de otra cromatografía de afinidad, con el AcM 1G7. Analizando densitométricamente las bandas correspondientes a las cadenas H y L de ambas Igs se comprobó que para las Igs no 3F7 la proporción H:L era de 70:30, de acuerdo con sus pesos moleculares, y para las Igs 3F7, la proporción H:L:X era de 50:16:34. Excluyendo de la densitometría la banda de menor peso molecular (X) que no aparecía en las inmunoprecipitaciones, la proporción H:L era de 76:24.

Las Igs 3F7 obtenidas en estos ensayos se recromatografiaron sobre columnas de afinidad con el AcM 1G7, observándose de nuevo en las electroforesis la banda de 23-24 kDa.

Los patrones electroforéticos de las Igs 3F7 y no 3F7 en condiciones no reductoras no mostraron ninguna diferencia (Fig. 25).

Debido a que los AcM 2H9 y 2A1, analizados en el apartado 5, no presentaban reactividad por ELISA DAS con las Igs reconocidas por el AcM 3F7, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación aditiva con los tres AcM para comprobar si las Igs definidas por el AcM 3F7 eran distintas de las Igs 2A1 y 2H9. Los resultados (Tabla VIII) mostraron un efecto aditivo de estos dos tipos de Igs con las Igs 3F7. Este efecto aditivo fue mayor para el AcM 2H9, ya que se obtuvo un porcentaje de



**Fig. 25.** SDS-PAGE de las Igs 3F7 (A) y de las Igs no 3F7 (B) obtenidas en experimentos de inmunoprecipitación (1) y obtenidas a partir de cromatografías de afinidad (2 y 3). Los geles son un gradiente del 17-20% de acrilamida en (1), del 20% en (2) y del 3,5% en (3). (1 y 2): SDS-PAGE en condiciones reductoras. (3): SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Los números del margen izquierdo corresponden a los pesos moleculares de los marcadores en kDa. Los geles en (2) y (3) están teñidos con Azul Brillante de Coomassie.

TABLA VIII

Porcentaje de Igs de trucha marcadas con <sup>125</sup>I e inmunoprecipitadas con los AcM 1G7, 2H9, 2A1 y 3F7.

AcM	PORCENTAJE Igs OBSERVADO	PORCENTAJE Igs ESPERADO
1G7 + 5E10	100	-
2H9 + 5E10	11,1	-
2A1 + 5E10	16,1	-
3F7 + 5E10	14,1	-
2H9 + 3F7	22,8	25,2
2A1 + 3F7	23,9	30,2
2H9 + 2A1	26	27,2

Para cada experimento se empleó una alícuota de 100.000 cpm de Igs de trucha marcada. Esta Ig se aisló a partir de cromatografías de afinidad con el AcM 1G7, por lo que el porcentaje de Igs inmunoprecipitadas con este AcM se considera el 100% de Igs antigénicamente activas. En las inmunoprecipitaciones simples se mezclaron los AcM anti-Igs de trucha con el AcM 5E10, utilizado como control negativo. Los porcentajes de Ig esperados se han calculado considerando que los AcM reconocen distintos tipos de Igs.

22,8% cuando se mezcló con el AcM 3F7, frente al 25,1% esperado si ambos AcM reconocieran dos tipos distintos de Igs. Cuando se mezclaron los AcM 2A1 y 3F7 se obtuvo un porcentaje de inmunoprecipitación de 23,9%, frente al porcentaje esperado del 30,2%, por lo que, aunque hubo un aumento en el porcentaje de inmunoprecipitación con respecto a los dos AcM por separado, ambos AcM no llegaron a ser completamente aditivos.

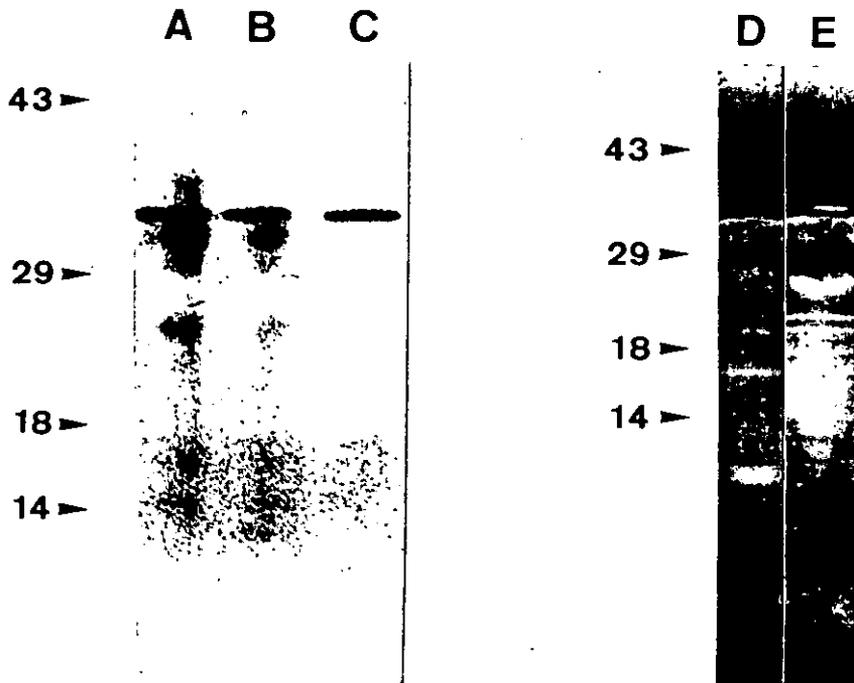
El AcM 3F7, como se ha descrito anteriormente, reconoce una Ig que contiene cadenas L de 26 kDa. El AcM 2H9, que reacciona frente a cadenas L, también es específico de la cadena L de 26 kDa. Los experimentos de inmunoprecipitación aditiva sugieren que las cadenas de 26 kDa contenidas en las Igs 2H9 y 3F7 son antigénicamente diferentes. El mapeo peptídico de ambas cadenas L con la proteasa V8 de S. aureus reflejó diferencias en las movilidades electroforéticas relativas de alguno de los péptidos obtenidos (Fig. 26).

Por último, se realizó también un mapeo peptídico con la proteasa V8 de las cadenas H 3F7 y no 3F7, observándose diferencias claras en las movilidades electroforéticas de algunos de los péptidos resultantes (Fig. 26).

## **7. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE Igs**

### **7.1. Cinética de producción de Igs "in vitro"**

Estos ensayos se realizaron con el fin de estudiar la cinética de producción de las Igs reconocidas por los AcM 2H9, 2A1 y 3F7 en cultivos de linfocitos estimulados con dos tipos de mitógenos: LPS y PWM, analizando la posible expresión diferencial de estas Igs en respuesta a ambos mitógenos.



**Fig. 26.** SDS-PAGE (geles de gradiente del 17-20% de acrilamida) de los mapas peptídicos de cadenas H y L, aisladas por cromatografías de afinidad, tras digestión con la proteasa V8. (A) Cadena H de las Igs 3F7. (B) Cadena H de las Igs no 3F7. (C) Proteasa V8. (D) Cadena L de 26 kDa de las Igs 3F7. (E) Cadena L de 26 kDa de las Igs 2H9. Los números del margen izquierdo corresponden a los pesos moleculares de los marcadores. Los geles están teñidos mediante una tinción con plata.

En la Tabla IX se muestran las cinéticas de producción de Igs en células de pronefros estimuladas con LPS y PWM, detectadas con el AcM 1G7, utilizado para la cuantificación de Igs totales en los sobrenadantes de cultivo.

La respuesta obtenida frente a LPS fue superior a la obtenida frente a PWM. En esta última, apenas se observó secreción de Igs, y sólo en los ocho primeros días de cultivo, los niveles de Igs producidas superaron ligeramente a las secretadas en el cultivo control. En los ensayos con LPS, desde el 4º día se produjo un aumento significativo en las concentraciones de Igs secretadas; esta respuesta aumentó progresivamente en el transcurso de los días del ensayo.

En la Fig. 27 se reflejan los porcentajes de Igs 2A1, 2H9 y 3F7 producidas en un cultivo en el que se estimularon las mismas células con LPS y con PWM. Las concentraciones de Igs totales, determinadas con el AcM 1G7, se muestran en la Tabla X.

En el cultivo control, hasta el 4º día, las Igs predominantes fueron las reconocidas por el AcM 2H9. A partir del 6º día, el porcentaje de Igs 3F7 fue superior, manteniéndose las Igs 2H9 y 2A1 en unos niveles paralelos.

En los cultivos estimulados con LPS se encontraron las mayores diferencias. Las Igs 3F7 fueron predominantes, presentando dos máximos en su porcentaje relativo en los días 4 y 12, con mínimos en los días 2 y 8. Este mínimo en el día 8 coincidió con el pico de porcentaje de las Igs 2A1. Los valores relativos de las Igs 2H9 sufrieron un fuerte descenso entre los días 2 y 4, manteniéndose posteriormente constantes a lo largo del cultivo.

En los cultivos estimulados con PWM, la respuesta fue muy baja, y prácticamente desde el día 8, las Igs producidas en el cultivo control igualaron o superaron a las producidas en

**TABLA IX**

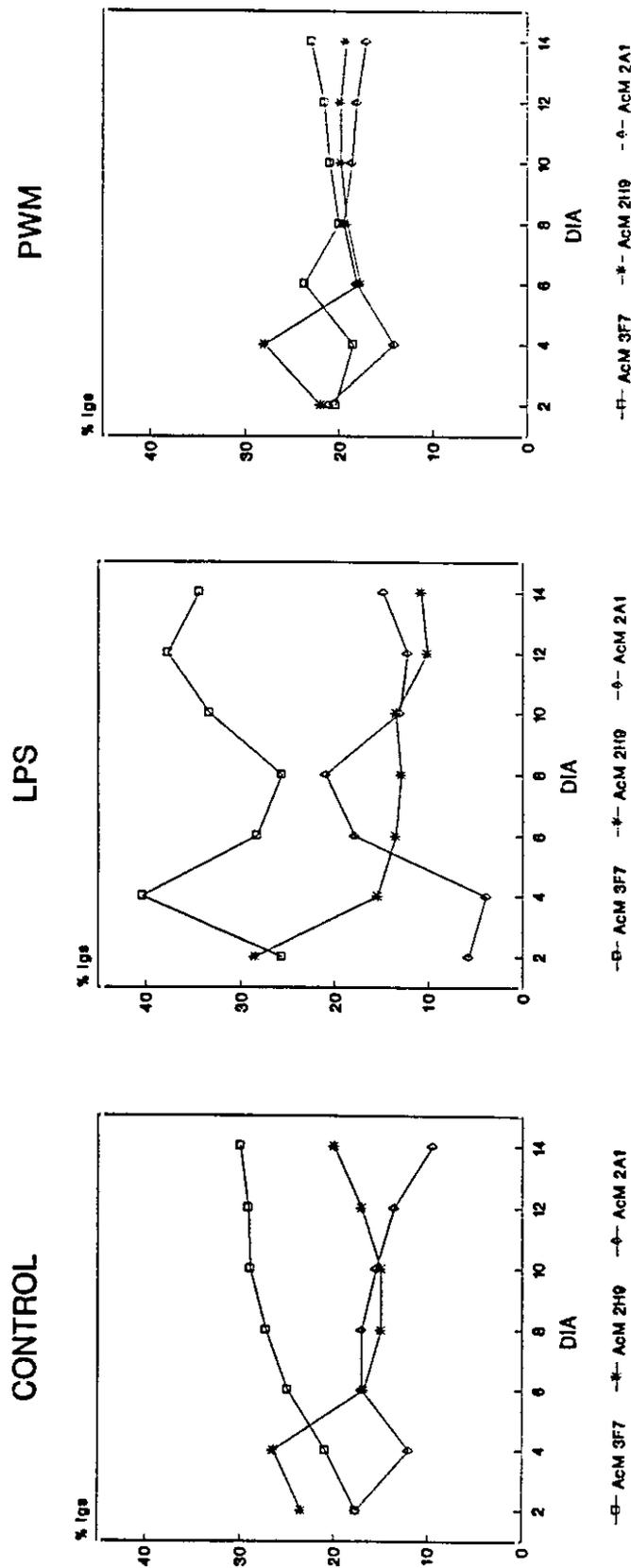
CONTROL		LPS		CONTROL		PWM	
DIA		DIA		DIA		DIA	
2	0,61 ± 0,23	2	0,92 ± 0,13	2	0,49 ± 0,35	2	0,78 ± 0,45
4	1,37 ± 0,62	4	4,05 ± 2,00	4	0,95 ± 0,81	4	1,08 ± 0,75
6	1,52 ± 0,54	6	6,17 ± 1,90	6	1,09 ± 0,86	6	1,65 ± 1,04
8	1,90 ± 0,81	8	9,46 ± 2,04	8	1,48 ± 0,92	8	1,68 ± 0,72
10	2,46 ± 1,05	10	13,38 ± 3,85	10	2,67 ± 0,8	10	1,77 ± 0,74
12	3,00 ± 1,24	12	16,08 ± 5,78	12	2,70 ± 1,25	12	1,77 ± 0,49
14	2,42 ± 0,72	14	24,80 ± 12,70	14	2,46 ± 0,67	14	2,23 ± 0,63

Concentración de Igs totales en cultivos de células de pronefros estimuladas con 100 µg/ml de LPS ó 5 µg/ml de PWM, respecto de un cultivo control. Las células utilizadas en los cultivos fueron obtenidas a partir de cinco truchas, tres de las cuales se emplearon en los ensayos con LPS y dos en los ensayos con PWM. Las concentraciones fueron determinadas mediante un ELISA DAS, utilizando el ACM 1G7, y se expresan como la media de las concentraciones (µg/ml) ± desviación estándar.

**TABLA X**

	DIA 2	DIA 4	DIA 6	DIA 8	DIA 10	DIA 12	DIA 14
CONTROL	0,85	1,77	1,96	2,41	3,47	3,96	3,14
LPS	1,05	3,37	5,16	6,64	8,37	11,22	12,1
PWM	1,23	1,84	2,7	2,41	2,52	2,27	2,86

Concentración de Igs totales, expresada en  $\mu\text{g/ml}$ , obtenida a partir de cultivos de células de prenefros estimuladas con  $100 \mu\text{g/ml}$  de LPS ó  $5 \mu\text{g/ml}$  de PWM, respecto de un cultivo control. Las células utilizadas para los cultivos fueron obtenidas del mismo animal. Se sembraron en los pocillos a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml, y los sobrenadantes de cultivo se recogieron cada dos días. Las concentraciones fueron determinadas mediante un ELISA DAS, utilizando el ACM 1G7.



**Fig. 27.** Porcentaje de Igs 3F7, 2A1 y 2H9 producidas en cultivos de células de proneros controles, en cultivos estimulados con LPS y en cultivos estimulados con PWM. Los ensayos de cuantificación de las Igs se realizaron mediante un ELISA DAS, utilizando los AcM 2H9, 2A1 y 3F7. Los porcentajes de las Igs 2A1, 2H9 y 3F7 se obtuvieron considerando como el 100% de las Igs producidas las reconocidas con el AcM IG7 (Tabla X).

respuesta a PWM. Las mayores diferencias entre los AcM se obtuvieron precisamente entre los días 2 y 8, ya que en el resto de los días todas las Igs se expresaron de igual forma. En el día 4 las Igs 2H9 fueron predominantes, alcanzando un mínimo en este día las Igs 2A1.

## 7.2. Cinética de producción de Igs "in vivo"

Se llevó a cabo este estudio con el fin de establecer si en los anticuerpos inducidos frente al hapteno FITC durante la respuesta inmune humoral de la trucha, había una expresión preferencial de las cadenas H o L reconocidas por los AcM 2A1, 2H9 y 3F7.

El título de los anticuerpos anti-FITC de estos sueros fue analizado mediante un ELISA indirecto en el que las placas fueron adsorbidas con Igs de conejo conjugadas con FITC, añadiéndose a continuación distintas diluciones de los sueros inmunes. Las Igs de trucha anti-FITC se revelaron con los AcM 1G7, 3F7, 2A1 y 2H9 biotinados (Fig. 28). La concentración de Igs totales en esos mismos sueros se determinó mediante un ELISA DAS, utilizando también los cuatro AcM (Fig. 29).

Con respecto a los sueros no inmunes, ya en el día 7 se detectó un aumento de los niveles de anticuerpos anti-FITC analizados con los cuatro AcM. La máxima respuesta de anticuerpos anti-FITC se obtuvo con todos los AcM en el día 28 post-inmunización. Los anticuerpos 2H9 y 2A1 anti-FITC apenas aumentaron su título desde la 1ª hasta la 3ª semana post-inoculación; los datos correspondientes a estos AcM resultaron prácticamente idénticos hasta la 4ª semana, en la que el título de los anticuerpos 2A1 superó al de los anticuerpos 2H9. El título de los anticuerpos 3F7 fue en todo momento superior a ambos.

## Acs anti-FITC

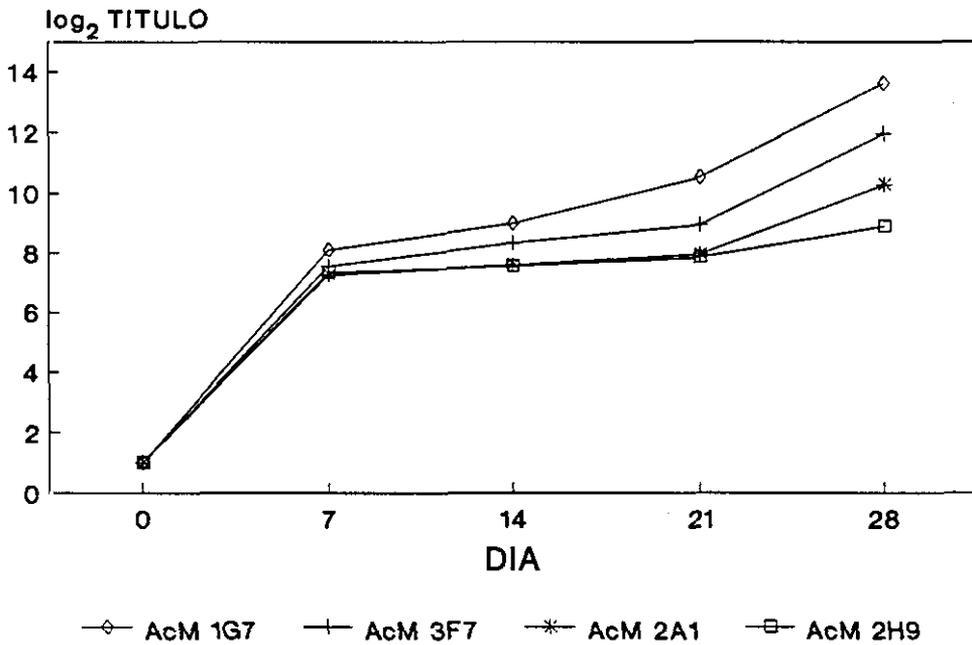
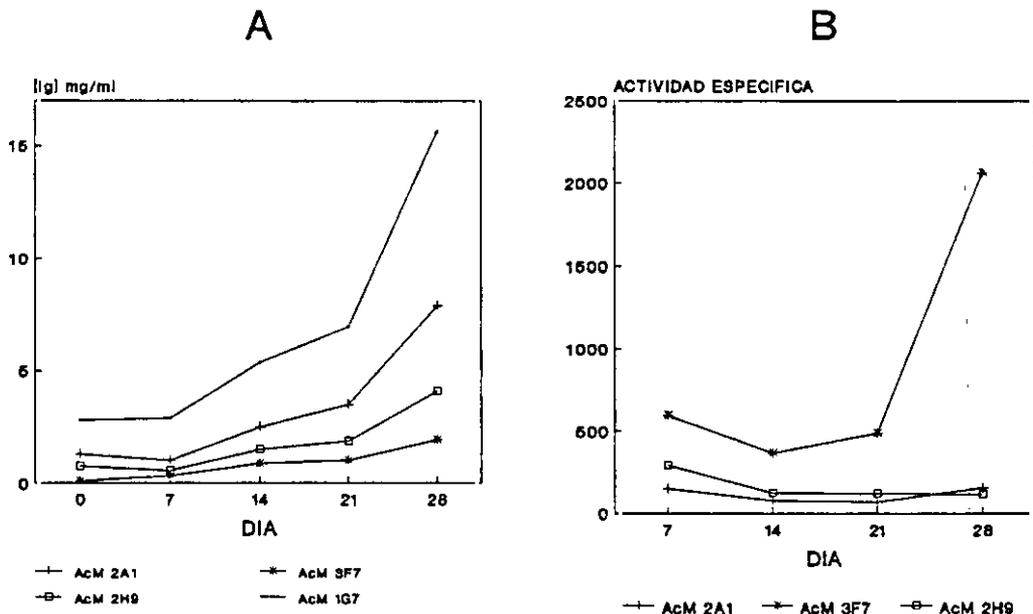


Fig. 28. Determinación de la presencia de anticuerpos anti-FITC en una mezcla de sueros de cuatro truchas inmunizadas con FITC<sub>6</sub>-LPS y sangradas semanalmente durante un mes. El ensayo se realizó mediante un ELISA indirecto, en el que las placas fueron tapizadas con 10  $\mu$ g/ml de Igs de conejo conjugadas con FITC. A continuación se añadieron los distintos sueros de trucha correspondientes a los días 0, 7, 14, 21 y 28 post-inmunización. Los anticuerpos específicos anti-FITC se revelaron con los AcM 1G7, 2A1, 2H9 y 3F7 biotinados y avidina conjugada con peroxidasa. El título de los anticuerpos se expresa como el log<sub>2</sub> de la última dilución del suero de trucha con la que se obtuvieron valores por encima del control negativo del ensayo, determinado con el AcM 5E10.



**Fig. 29.** (A) Concentración de las Igs totales y de las Igs 2A1, 2H9 y 3F7 en los sueros de las truchas inmunizadas con FITC<sub>6</sub>-LPS, correspondientes a los días 0, 7, 14, 21 y 28 después de la inmunización. El ensayo se realizó mediante un ELISA DAS de cuantificación empleando los AcM 1G7, 2A1, 2H9 y 3F7. (B) Actividad específica de los anticuerpos anti-FITC reconocidos por los AcM 2A1, 2H9 y 3F7, expresada como el cociente entre el título de los anticuerpos 2A1, 2H9 o 3F7 anti-FITC en cada semana y la concentración de Igs totales 2A1, 2H9 y 3F7, respectivamente, determinada también con cada AcM.

En cuanto a la concentración de Igs en los sueros de las truchas inmunizadas, tanto las Igs totales, como las Igs 2A1, 2H9 y 3F7, aumentaron su concentración en el transcurso de la respuesta (Fig. 29A). La actividad específica de los anticuerpos 3F7 resultó muy superior a la de los anticuerpos 2A1 y 2H9 (Fig. 29B).

#### **8. ANALISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE Igs EN EMBRIONES Y ALEVINES DE TRUCHA**

Para realizar este ensayo se utilizaron macerados de embriones de 8 y 4 días pre-eclosión, así como de alevines recién eclosionados y de 2, 4, 14, 21, 30, 45 y 60 días post-eclosión.

Para la cuantificación de Igs, los macerados fueron analizados por un ELISA DAS, utilizando cuatro ACM diferentes: 1G7, 2H9, 2A1 y 3F7 (Tabla XI). En todos los casos, se observó un máximo en las concentraciones de Igs en el momento de la eclosión de los huevos. Tras esta etapa los niveles descendieron drásticamente, y en el decimocuarto día de vida fueron prácticamente indetectables en nuestros ensayos, con excepción de las Igs totales cuantificadas con el ACM 1G7. Hacia el día 45 se observó una ligera recuperación de los niveles de las Igs totales y de las Igs 2H9 y 2A1.

El perfil de los niveles de Igs en las edades estudiadas fue similar para las Igs definidas por los ACM 2H9 y 2A1 con respecto a las Igs totales. Las Igs reconocidas por el ACM 3F7 no se detectaron hasta el momento de la eclosión, alcanzando en esta etapa valores de concentración superiores a las Igs 2H9 y 2A1. A partir del día 21 de vida, las Igs 3F7 fueron indetectables, incluyendo las muestras de 45 y 60 días, donde se observó una ligera recuperación en los niveles de los otros tipos de Igs.

**TABLA XI**

Concentración de Igs determinadas con los AcM 1G7, 3F7, 2H9 y 2A1 en diferentes estadios del desarrollo ontogénico de la trucha arcoiris

ESTADIO DE DESARROLLO	NÚMERO DE MUESTRAS *	Igs 1G7 (µg Ig/g)	Igs 3F7 (µg Ig/g)	Igs 2H9 (µg Ig/g)	Igs 2A1 (µg Ig/g)
8 d.p.e.	10	25,7 ± 5,8	n.d.	0,98 ± 0,2	1,5 ± 0,2
4 d.p.e.	9	39 ± 10,9	n.d.	2,2 ± 0,66	8,7 ± 1,2
ECLOSIÓN	10	153 ± 40,6	20,6 ± 0,1	7,8 ± 1,1	12,8 ± 1
2 d.	9	103 ± 41,1	15,8 ± 4,5	5,13 ± 1	10,5 ± 2
4 d.	8	33,3 ± 12	3 ± 0,9	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,1
14 d.	10	11,5 ± 4,4	0,62 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,2
21 d.	10	13,9 ± 3,9	n.d.	0,75 ± 0,4	0,7 ± 0,2
30 d.	7	6,6 ± 1,6	n.d.	0,37 ± 0,5	0,4 ± 0,3
45 d.	5	10,1 ± 3,1	n.d.	0,94 ± 0,6	1 ± 0,9
60 d.	4	14,7 ± 8,5	n.d.	1,5 ± 1,1	2,2 ± 1

(\*): Cada muestra incluye el homogeneizado de 10 individuos

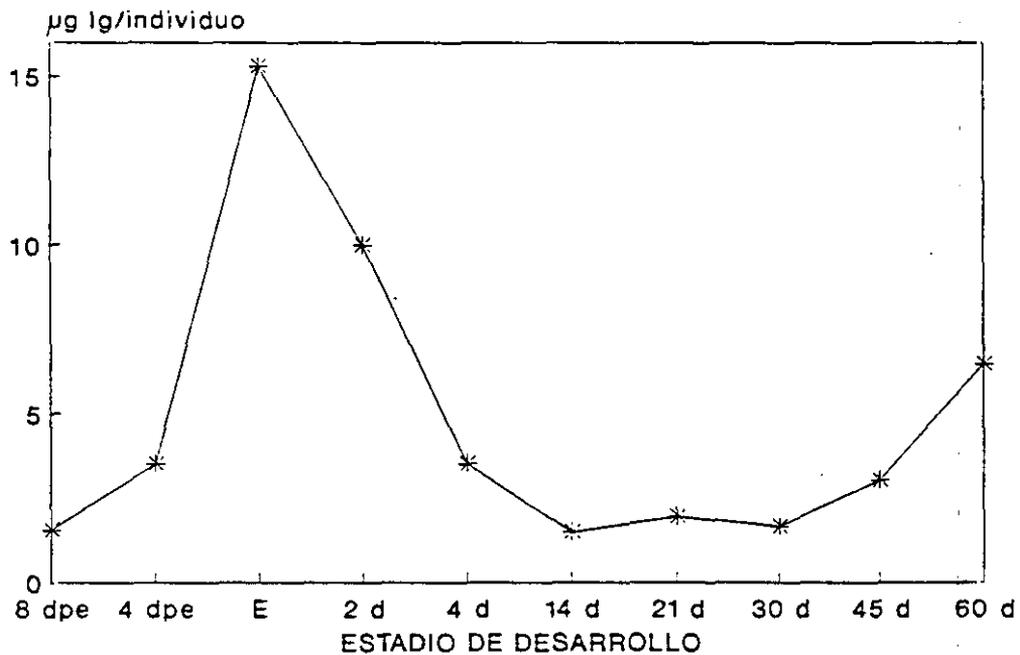
d.p.e.: días pre-eclosión

d.: días post-eclosión

n.d.: no detectable

Los valores están expresados como la media ± desviación estándar de las concentraciones en µg de Igs/g de peso de los animales.

En la Fig. 30 se muestran las cantidades absolutas de Igs encontradas por cada individuo analizado. Se observa que la cantidad de Igs en cada alevín disminuye desde el momento de la eclosión hasta el día 14 post-eclosión, detectándose una recuperación en los niveles de Igs a partir del día 30 post-eclosión.



**Fig. 30.** Cantidad de Igs totales ( $\mu\text{g}$ ) detectada por cada animal analizado en los distintos estadios del desarrollo. Los valores se han obtenido multiplicando la concentración de Igs totales (en  $\mu\text{g}$  Ig/g peso), cuantificadas con el AcM 1G7, por el peso medio de un animal en cada estadio.

## V. DISCUSSION

## ESTRUCTURA DE LAS Igs DE LA TRUCHA ARCOIRIS

Las Igs de los peces teleósteos son, mayoritariamente, Igs de alto peso molecular, similares a las IgM de los mamíferos. Por este motivo, los protocolos utilizados para su purificación suelen ser los descritos para dichas Igs.

Algunos autores utilizan como primer paso de la purificación la precipitación de los sueros con distintas concentraciones de sulfato amónico saturado (SAS), con lo que se consigue un enriquecimiento de la fracción de Igs en las muestras (Voss et al., 1980; Olesen y Vestergard Jørgensen, 1986; Fuda et al., 1989; Pilström y Petersson, 1991). En nuestro trabajo, el empleo de SAS al 40% para este fin no resultó eficaz, ya que, por una parte, los precipitados contenían muchos tipos de proteínas séricas, y por otra, gran parte de las Igs quedaban en los sobrenadantes (datos no mostrados). En cambio, la precipitación de las Igs utilizando bajas fuerzas iónicas fue más satisfactoria. Este protocolo se utiliza para las IgM de los mamíferos, y se fundamenta en que un alto porcentaje de ellas son euglobulinas (Johnstone y Thorpe, 1982a). Con esta técnica precipitan alrededor del 14% del total de las proteínas séricas en las truchas, y esta fracción está enriquecida en Igs con respecto a la fracción de proteínas no precipitadas; posteriormente, sólo se requiere una cromatografía de filtración en gel para conseguir una preparación de Igs con un 95% de pureza. Sin embargo, el rendimiento obtenido es muy bajo, ya que una gran parte de las Igs séricas permanecen en los sobrenadantes. Las Igs de estas fracciones se aislaron siguiendo los protocolos convencionales. En las cromatografías de intercambio iónico, la actividad Ig se detectó en la fracción eluida con tampón fosfato 0,05 M, de acuerdo con lo descrito por otros autores en varias especies de salmónidos (Voss et al., 1980; Kobayashi et al., 1982; Warr et al., 1983; Fuda et al., 1989). El salmón del Atlántico es una excepción, ya que sus Igs

eluyen en este tipo de cromatografías a mayores fuerzas iónicas, similares a las que eluyen las IgM de los mamíferos (Håvarstein et al., 1988).

Las Igs procedentes de las cromatografías de intercambio iónico fueron sometidas secuencialmente a dos cromatografías de filtración en gel, con distintos rangos de fraccionamiento. La fracción Ig se detectaba en el primer pico de proteínas cuando se utilizó Sephacryl S-300, y en el segundo pico cuando se empleó Agarosa A-5 m. Estos resultados confirman las características de alto peso molecular de las Igs de la trucha. En estas cromatografías nunca detectamos actividad Ig en fracciones de menor peso molecular que las arriba mencionadas.

Los datos obtenidos a partir de las electroforesis confirman la estructura observada para las Igs de los salmónidos y, en general, de los peces teleósteos (Ingram y Alexander, 1979; Voss et al., 1980; Kobayashi et al., 1982). La Ig sérica predominante en la trucha arcoiris es una Ig polimérica, semejante a la IgM de los mamíferos, con un peso molecular aparente (determinado por SDS-PAGE) de 750 kDa, el cual corresponde aproximadamente al peso de un tetrámero de Ig. En SDS-PAGE, en condiciones reductoras, las Igs de la trucha arcoiris se disocian en una banda correspondiente a las cadenas pesadas, cuyo peso molecular oscila entre 70-75 kDa, según las muestras, y en dos bandas de cadenas ligeras, de 26 y 24 kDa.

Estos resultados, con respecto a las cadenas H, concuerdan, en general, con los observados por otros autores en diferentes salmónidos: 74 kDa en la trucha arcoiris (Nonaka et al., 1981); 72 kDa en el salmón chum y en el salmón del Atlántico (Kobayashi et al., 1982; Håvarstein et al., 1988); 68 kDa en el salmón masu, Oncorhynchus masou (Fuda et al., 1989). Sin embargo, difieren de los obtenidos por Elcombe et al. (1985) en la trucha arcoiris, quienes calculan un peso molecular para las cadenas H de 60 kDa, y de 610 kDa para el tetrámero de Ig. En este trabajo, el peso

de la molécula completa se determinó mediante cromatografías de filtración en gel, y la diferencia de pesos moleculares (610 vs 750 kDa) podría deberse al uso de dos técnicas distintas para obtenerlos. En este sentido, Håvarstein et al. (1988), en el salmón del Atlántico, encuentran una diferencia de 200 kDa en el peso molecular del tetrámero, calculado mediante cromatografías de filtración en gel y mediante SDS-PAGE. La diferencia de peso molecular en las cadenas H podría deberse a que los autores utilizan para su determinación SDS-PAGE con bajos porcentajes de acrilamida (5%), en los que el cálculo del peso de proteínas de este tamaño tiene un gran error, ya que migran próximas al frente del gel.

En este mismo trabajo, Elcombe et al. (1985) describen la presencia de Igs monoméricas en los sueros de la trucha arcoiris, con cadenas L aparentemente idénticas a las de las Igs tetraméricas, pero con diferentes cadenas H en cuanto a peso molecular (50 kDa en las Igs monoméricas  $-\mu_1-$ ; 60 kDa en las Igs tetraméricas  $-\mu_4-$ ), mapas peptídicos y reactividad frente a antisueros de conejo. Mientras que algunas estructuras presentes en la cadena  $\mu_4$  no se encuentran en  $\mu_1$ , existe una identidad antigénica completa entre ambas cadenas cuando se utilizan antisueros anti- $\mu_1$ . Las Igs monoméricas se han detectado en los sueros de truchas inmunizadas con DNP-PGG (hapteno dinitrofenil conjugado con gammaglobulina porcina), en muy bajas concentraciones, y sólo en la época de primavera-verano. Esta respuesta anti-DNP es detectable para las Igs tetraméricas a lo largo de todo el año. Hodgins et al. (1967) también han descrito en la trucha arcoiris hemaglutininas naturales que se presentan en forma polimérica y monomérica. Nosotros, sin embargo, sólo hemos detectado en los sueros estudiados la existencia de Igs de alto peso molecular. En algunas ocasiones, tras el proceso de purificación de las Igs, encontramos en las electroforesis bandas correspondientes a las cadenas H y L y una banda adicional de 55 kDa. Esta cadena comparte determinantes antigénicos con las cadenas H, ya que ambas son reconocidas por los antisueros

policlonales anti-Igs de trucha empleados en este trabajo, por lo que podría tratarse de la cadena  $\mu_1$ , descrita por Elcombe et al. (1985). Sin embargo, esta idea fue descartada, ya que comprobamos que esta proteína es un producto de degradación de la cadena H de 70 kDa.

La existencia de dos formas moleculares de cadenas L en los salmónidos se ha descrito sólo en otra especie, el salmón del Atlántico (Hávarstein et al., 1988). Estos autores observan dos cadenas L, de 27 y 25 kDa. En la trucha arcoiris, trabajos previos describen la existencia de un tipo de cadenas L, de aproximadamente 23 kDa (Nonaka et al., 1981; Elcombe et al., 1985). Como ya indicamos en el apartado de Resultados, en las electroforesis no siempre se identifican las dos bandas de cadenas L, ya que la cadena de 26 kDa está en las Igs en una proporción muy superior a la de 24 kDa, y sólo en ciertos sueros de algunos animales se observa como mayoritaria la cadena L de menor peso molecular. La distinta proporción entre dos cadenas L dependiendo de los animales se ha descrito también en otro teleosteo, el pez gato (Lobb, 1986). El hecho de que una de las cadenas se presente, en general, en una alta proporción respecto a la otra, puede ser uno de los motivos por los que otros autores no han descrito la existencia de las dos cadenas.

Esta diferencia de peso molecular entre las dos cadenas L no se debe a un diferente contenido en carbohidratos, ya que ninguna de ellas está glicosilada, o lo está muy ligeramente y, cuando se produce la deglicosilación de la proteína, ambos polipéptidos conservan una diferencia de 2000 Da en su peso molecular. Por el contrario, las cadenas H están fuertemente glicosiladas; entre un 17-20% de su peso molecular está constituido por carbohidratos. Este alto contenido en azúcares es similar al encontrado para las cadenas  $\mu$  en las Igs de otras especies. Los experimentos de deglicosilación de las Igs realizados con la adición de tunicamicina sobre cultivos de linfocitos sugieren que la mayoría, si no todos, los

carbohidratos presentes en la molécula son de tipo N-, ya que se produce un descenso similar en el peso molecular de las cadenas H tratadas con tunicamicina y de las cadenas H totalmente deglicosiladas por el tratamiento con TFMS. Este dato concuerda con el tipo de glicosilación encontrado en las IgM tanto de vertebrados superiores como de vertebrados inferiores (Schwager et al., 1988a; Ghaffari y Lobb, 1989a; Muraoka y Shulman, 1989; Amemiya y Litman, 1990), en las que sólo se ha descrito la presencia de azúcares de tipo N-. No obstante, los experimentos realizados no permiten descartar la existencia de azúcares de tipo O- en las Igs de la trucha arcoiris, ya que se ha demostrado en algunas glicoproteínas que el tratamiento con tunicamicina impide la unión posterior de azúcares en O-, aunque se desconoce la explicación de este fenómeno (Pulido y Sánchez-Madrid, 1990).

En nuestros experimentos no hemos detectado la presencia de la cadena J en las Igs de la trucha. Esta cadena ha sido descrita sólo en algunas especies de teleósteos, como el pez gato (Mestecky et al., 1975) o el sargo (Lobb y Clem, 1981a), mientras que en otras, como el salmón chum, se ha sugerido que este polipéptido no está presente como un componente de sus Igs (Kobayashi et al., 1982). Precisamente, el hecho de que muchos vertebrados inferiores carezcan de cadena J en sus Igs poliméricas, es un argumento que se utiliza en contra del posible papel de este polipéptido en la polimerización de la IgM y de la IgA (Davis y Shulman, 1989). En la trucha arcoiris no se han realizado estudios que demuestren o excluyan la presencia de la cadena J en sus Igs, si bien, debido a su estequiometría (una cadena J por cada polímero de Ig) y a la conformación que adopta tras su reducción y alquilación (en SDS-PAGE se detecta con un peso molecular muy similar al de las cadenas L) (Koshland, 1989), su detección resulta problemática mediante procedimientos convencionales.

## Estructura covalente de las Igs

Si bien las Igs de la trucha arcoiris se aíslan como proteínas de alto peso molecular, en electroforesis en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, estas macroglobulinas se resuelven en una banda principal, cuyo peso molecular coincide aproximadamente con el de un tetrámero de Ig, y en tres bandas minoritarias, cuyos pesos corresponden a los de un trímero, dímero y monómero de una Ig. Esta estructura se observa tanto en Igs aisladas por cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico, como en Igs aisladas por cromatografías de afinidad. Para comprobar que las tres bandas adicionales al tetrámero no eran proteínas contaminantes en la preparación, dichas bandas fueron escindidas de los geles y se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras, comprobándose que todas estaban formadas por cadenas H y L (datos no mostrados). La posibilidad de que estas proteínas sean productos de degradación "in vitro" del tetrámero parece improbable, ya que se encuentra este mismo patrón electroforético en Igs aisladas a partir de sueros frescos de trucha.

Este tipo de estructura ha sido descrito en otro salmónido, el salmón chum (Kobayashi et al., 1982), y en otros teleósteos, como el sargo (Lobb y Clem, 1981a, b y c) o el pez gato (Lobb y Clem, 1983). En la trucha arcoiris, Nonaka et al. (1981) describieron este tipo de estructura para las Igs en condiciones no reductoras, con una banda principal correspondiente al tetrámero y varias bandas de menor peso molecular, que los autores interpretaron como los productos de una polimerización imperfecta de los monómeros de IgM. Por el contrario, Warr (1983) señala que toda la población de Igs séricas en la trucha arcoiris está constituida por tetrámeros cuyas subunidades se encuentran siempre covalentemente unidas. Nuestros resultados sugieren que las Igs de la trucha arcoiris se encuentran en el suero en forma de tetrámeros, ya que siempre se aíslan como proteínas de alto

peso molecular, pero no toda la población de tetrámeros tiene sus subunidades unidas covalentemente, ya que en presencia de un agente disociante (SDS) y en ausencia de agentes reductores, algunos tetrámeros dejan libres algunas o todas sus subunidades. Nosotros proponemos la posible existencia de cinco subpoblaciones de tetrámeros:

1) Tetrámeros cuyas subunidades se encuentran todas unidas covalentemente.

2) Tetrámeros con tres subunidades unidas covalentemente y una cuarta unida al resto de la molécula a través de enlaces no covalentes.

3) Tetrámeros que contienen dos dímeros cuyas subunidades están unidas covalentemente, mientras que la unión entre los dos dímeros se produce a través de enlaces no covalentes.

4) Tetrámeros con dos subunidades unidas covalentemente y dos monómeros unidos por enlaces no covalentes.

5) Tetrámeros en los que las cuatro subunidades están unidas por enlaces no covalentes. Esta estructura, que aparecería en las electroforesis como un monómero, podría proceder de las subunidades no covalentemente unidas de las estructuras tipo 2) y tipo 4). En este sentido, el número de moléculas monoméricas por cada trímero de Ig (calculadas densitométricamente) resultó muy variable según las muestras analizadas, por lo que no podemos descartar esta última posibilidad.

En el pez gato, el tetrámero de Ig se resuelve en ocho bandas en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, de las cuales, la de menor peso molecular corresponde a un par H-L (Lobb y Clem, 1983). Ghaffari y Lobb (1989a) atribuyen este tipo de estructura a las posiciones de las cisteínas en las cadenas H. Estas posiciones posibilitan que algunas cisteínas formen más de un

tipo de enlace, tanto entre las cadenas H como entre los monómeros. Así, por ejemplo, las cisteínas de las posiciones 239 y 241, situadas en el extremo C-terminal del dominio C<sub>H</sub>4, son las encargadas de formar los enlaces entre los monómeros, pero se ha demostrado que también pueden formar enlaces entre dos cadenas H de un mismo monómero; los monómeros en los que estas cisteínas se encuentran formando enlaces entre las cadenas H no pueden unirse covalentemente a otras subunidades de Ig. En humanos, se ha sugerido que las IgM poliméricas pueden ensamblarse usando más de un patrón de puentes disulfuro, y según el patrón utilizado, la molécula resultante puede ser tetramérica, pentamérica o hexamérica (Davis y Shulman, 1989). La unión de la cadena J a la IgM polimérica dependería también del patrón de uniones covalentes adoptado por los monómeros (Davis y Shulman, 1989). En nuestro caso, debido a la ausencia de datos de secuencia para las cadenas H, no podemos asegurar que esta particular estructura de las Igs sea debida a las posiciones de las cisteínas encargadas de formar los enlaces covalentes entre los monómeros. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el pez gato, en la trucha arcoiris no encontramos en las electroforesis bandas correspondientes a pares H-L, siendo el monómero la subunidad de menor peso molecular hallada en estas condiciones. La unidad básica covalente de la molécula sería, por lo tanto, el monómero, lo cual sugiere que las cisteínas encargadas de formar los enlaces entre las cadenas H se encuentran en unas posiciones que no les permiten establecer combinaciones alternativas, como ocurre en el pez gato.

#### CONCENTRACIÓN DE LAS Igs SÉRICAS

Las concentraciones de Igs séricas obtenidas en este estudio son similares a las encontradas por Ingram y Alexander (1979) en la trucha común, Salmo trutta (media: 7,3 mg/ml), pero mayores que las obtenidas en la trucha arcoiris (3,3 mg/ml), salmón coho

(2,1 mg/ml), salmón del Atlántico (0,8-1,3 mg/ml) y salmón masu (0,6-2,7 mg/ml) por Olesen y Vestergard Jørgensen (1986), Voss et al. (1980), Hávarstein et al. (1988) y Fuda et al. (1989), respectivamente. Las diferencias en la concentración de Ig sérica podrían ser explicadas por una fuerte estimulación antigénica ambiental, pero en nuestro caso los peces fueron obtenidos de una granja sin historia previa de enfermedades, y las truchas estaban sanas en el momento de la recogida de muestras. Los valores obtenidos por Olesen y Vestergard Jørgensen fueron determinados en truchas mantenidas a 10°C, y se aproximan a los obtenidos por nosotros en los sueros recogidos en invierno, época en la que la temperatura media del agua era de 7°C.

Nuestros resultados reflejan que hay diferencias significativas en las concentraciones de Igs entre los sueros recogidos en invierno y en verano. Diversos autores han puesto de manifiesto el efecto de los cambios estacionales en la respuesta inmune de los peces (Rijkers et al., 1980; Yamaguchi et al., 1981). La influencia de la temperatura en la producción de anticuerpos ha sido estudiada en varias especies, y es objeto de controversia. Así por ejemplo, en el pez gato, Klesius (1990) no observa diferencias en las concentraciones de Igs entre sueros de peces mantenidos a 10°C y de peces mantenidos a 30°C. Otros estudios han intentado documentar los efectos de la temperatura del agua por medida de los títulos de anticuerpos frente a diversos antígenos tras inmunización de los peces en aguas con distintas temperaturas. En la carpa, Rijkers et al. (1980) encuentran un retraso a bajas temperaturas en el pico máximo de producción de anticuerpos en la respuesta primaria frente a eritrocitos de carnero, pero no observan ningún efecto sobre la magnitud de la respuesta. Sin embargo, en el pez gato, Plumb et al. (1986) demuestran una menor producción de anticuerpos frente a Edwardsiella ictulari en peces mantenidos a 12°C en comparación con los mantenidos a 25°C. Miller y Clem (1984), también en el pez gato, encuentran un efecto diferencial de las bajas temperaturas sobre las respuestas primarias frente a

antígenos T-dependientes y T-independientes, observando que las respuestas frente a estos últimos son independientes de la temperatura, mientras que las respuestas frente a los primeros no lo son. En estos estudios, los resultados miden el efecto de la temperatura sobre la producción de anticuerpos específicos más que el efecto sobre la concentración de Igs, pero los datos sugieren que, a bajas temperaturas, los peces podrían producir una menor cantidad de Igs debido a alteraciones funcionales de las células T.

Nuestros datos indican que las concentraciones de Igs séricas se incrementan también con la edad de los peces; estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras especies, como el pez limón, Seriola quinqueradiata (Matsubara et al., 1985), o el pez gato (Klesius, 1990). Por el contrario, Olesen y Vestergard Jørgensen (1986) no encuentran, en la trucha arcoiris, ninguna correlación entre el tamaño del pez y la concentración de Igs en peces infectados con el virus de la septicemia hemorrágica (VHS), aunque los autores no mencionan los tamaños de los peces utilizados. En nuestro estudio, sólo encontramos diferencias significativas en la concentración de Igs entre las truchas de 20 g y las truchas de 125 g o de 1 Kg, pero no entre estos dos últimos grupos de peces, lo cual sugiere que, tras alcanzar un cierto tamaño, la media de las concentraciones de Igs permanece estable.

#### **CARACTERIZACIÓN DE LOS ACM ANTI-Igs DE TRUCHA. HETEROGENEIDAD ESTRUCTURAL Y ANTIGÉNICA DE LAS Igs**

A pesar de que clásicamente se ha considerado que los peces teleósteos poseen una sola clase de Ig, a la que por sus características se le ha denominado IgM, en los últimos años, con el uso de ACM, algunos autores han logrado establecer la existencia de distintos tipos de cadenas pesadas y ligeras, en

especies como el pez gato o el salmón del Atlántico (Lobb et al., 1984; Lobb y Olson, 1988; Killie et al., 1991). En la trucha arcoiris, aún con la utilización de AcM frente a sus Igs (DeLuca et al., 1983; Desvaux et al., 1987; Thuvander et al., 1990), no se ha descrito hasta el momento la presencia de tipos o clases de cadenas L o H en dichas Igs. El empleo de 14 AcM anti-Igs de trucha arcoiris, caracterizados en este trabajo, nos ha permitido definir la presencia de variantes antigénicas en las Igs séricas de este salmónido.

Los porcentajes de Igs reconocidos por algunos AcM apoyan la idea de la existencia de variantes antigénicas: mientras que cuatro AcM (1G7, 3B10, 3E4 y 4D11) reaccionan con porcentajes altos de Igs, el resto parecen reconocer subpoblaciones de Igs, ya que reaccionan con pequeños porcentajes de las mismas. Además, mientras que las Igs reconocidas por los AcM 1G7, 3B10, 3E4 y 4D11 contienen las dos cadenas L de 26 y 24 kDa, definidas anteriormente, los AcM que reconocen bajos porcentajes de Igs reaccionan con Igs que contienen la cadena L de 26 kDa (1A6, 1B4, 1H2, 2H9, 3F7 y 5G7) o la cadena L de 24 kDa (1A3, 1C6 y 2A1). Este último dato une la característica de variante antigénica de la Ig con la característica de variante estructural.

Parece improbable que los bajos porcentajes de Igs reconocidos por algunos AcM se deban a una destrucción de los epítomos reconocidos por ellos, como consecuencia del marcaje de las Igs con  $^{125}\text{I}$ . En el salmón coho, Voss et al. (1980) señalan que la Cloramina T (el método de marcaje utilizado por nosotros) no desnaturaliza la molécula de Ig, al menos en su porción Fab. Por otra parte, los porcentajes de Igs retenidos en cromatografías de afinidad empleando algunos de estos AcM fueron similares a los obtenidos en los experimentos de inmunoprecipitación. Asimismo, parece improbable que estos resultados sean debidos a una baja afinidad de los AcM por su antígeno. Para eliminar esta posibilidad se reinmunoprecipitaron las Igs que quedaban en los sobrenadantes del ensayo tras una

primera inmunoprecipitación y, en ningún caso, los porcentajes obtenidos en estos experimentos superaron los de los controles negativos.

En los ensayos para determinar la reactividad de los AcM frente a las cadenas H o L, cuatro de ellos reaccionaron frente a las cadenas H (1G7, 3B10, 3F7 y 4D11), mientras que los diez restantes lo hicieron preferentemente frente a las cadenas L. Cuando utilizamos la técnica de inmuno-electrotransferencia, sólo cuatro AcM resultaron positivos (1G7, 3B10, 3E4 y 4D11), lo que indica que los epítomos reconocidos por el resto de los AcM son destruidos con el tratamiento, debido al exceso de agente reductor utilizado en las electroforesis, o bien debido a la presencia del detergente SDS. Por este motivo se emplearon posteriormente para la separación de las cadenas H y L bajas concentraciones de agente reductor, intentando evitar la ruptura de los enlaces intracatenarios, y un agente disociante de los enlaces no covalentes que permitiera una buena renaturalización posterior de las cadenas. De este modo, las cadenas H y L separadas fueron reconocidas por cinco AcM más, si bien otros cinco presentaron una reactividad dudosa (1A6, 1B4, 1H2, 2D12 y 5G7), lo cual parece sugerir que estos AcM reconocen epítomos conformacionales que son destruidos con la reducción o con la separación de las cadenas H y L. Estos AcM reaccionan de manera preferente en estos ensayos con las cadenas L. Este hecho, junto con el patrón de inmunoprecipitaciones que presentan, donde todos parecen reconocer Igs que contienen la cadena L de 26 kDa, sugieren que los AcM 1A6, 1B4, 1H2, 2D12 y 5G7 podrían reconocer epítomos situados en estas cadenas.

#### **Reactividad de los AcM frente a determinantes alotípicos**

Los AcM que reconocían bajos porcentajes de Igs fueron analizados haciéndolos reaccionar con las Igs de una colección

de sueros de distintos animales, con el fin de descartar posibles reactividades frente a determinantes alotípicos de las Igs.

Los alotipos son variantes alélicas de las cadenas polipeptídicas de las Igs que segregan de forma mendeliana. Si existiesen variantes alotípicas en las cadenas H o L de las Igs de trucha, estas variantes sólo estarían expresadas en algunos miembros de la población, y no en otros. Los AcM que estuvieran dirigidos frente a determinantes alotípicos, sólo reaccionarían con los sueros de los individuos que los expresaran.

En este trabajo hemos analizado la reactividad de los AcM frente a 20 sueros de trucha, procedentes de distintas áreas geográficas, para evitar la existencia de una relación genética fuerte entre los animales que pudiera enmascarar la presencia de determinantes alotípicos, ya que en este caso serían expresados por muchos miembros de la población.

Tres de los AcM (1A3, 1B4 y 5G7) resultaron negativos para algunos de los sueros analizados. Parece improbable que estos resultados negativos sean debidos a la existencia de bajas concentraciones en los sueros de las Igs reconocidas por estos AcM, ya que otros AcM que reconocen también bajos porcentajes de Igs son positivos para los sueros en los que los AcM 1A3, 1B4 y 3F7 resultaron negativos. Además, cada uno de estos tres AcM presentan reactividades altas con otros sueros ensayados, lo cual excluye que los resultados negativos sean debidos a una falta de reactividad en general de los AcM. Estos datos sugieren que los AcM 1A3, 1B4 y 5G7 podrían reconocer determinantes alotípicos en las Igs de la trucha. El resto de los AcM reaccionaron con las Igs de los 20 sueros analizados; la probabilidad de encontrar secuencialmente un mismo alotipo en 20 animales seleccionados al azar es baja, por lo que consideramos improbable que los AcM restantes reconozcan determinantes alotípicos en las Igs.

La existencia de alotipos en las cadenas ligeras de las Igs está ampliamente documentada en especies como el conejo (Chersi et al., 1980), la rata (Gutman, 1981) o el hombre (Solomon, 1986), tanto en las cadenas  $\kappa$  como en las cadenas  $\lambda$ . Los tres AcM que parecen reconocer determinantes alotípicos, reconocen preferentemente cadenas L, aunque los AcM 1B4 y 5G7 presentan una reactividad muy baja frente a las cadenas L aisladas. Algunos autores han descrito la existencia de alotipos denominados conformacionales, en el sentido de que requieren la asociación con otra cadena polipeptídica para ser expresados; por ejemplo, los alotipos  $\kappa_m$  de las cadenas  $\kappa$  humanas requieren la presencia de las cadenas H para su expresión (Fleischman y Davie, 1984). Basándonos en este hecho, podríamos interpretar los alotipos definidos por los AcM 1B4 y 5G7 como alotipos "conformacionales".

#### **Reactividad de los AcM frente a determinantes idiotípicos**

En algunas especies de teleósteos se ha descrito la existencia de anticuerpos naturales que se encuentran en un alto porcentaje en el suero. Así, por ejemplo, Vilain et al. (1984) demostraron que el 11-16% de las Igs séricas de la carpa, el carpín y la tenca, son anticuerpos naturales anti-DNP/TNP. Se podría pensar que algunos de los AcM anti-Igs de trucha que reconocen bajos porcentajes de Igs, podrían estar reconociendo algún determinante idiotípico muy representado en las Igs séricas de las truchas. Para descartar esta posibilidad, inmunizamos truchas con dos tipos de antígenos, LPS y TNP-OVA, y analizamos la reactividad de los AcM frente a las Igs específicas producidas frente a ambos antígenos. Considerando que la probabilidad de que las Igs específicas de dos antígenos diferentes posean un mismo idiotipo es muy baja, un AcM que reaccionara frente a un determinante idiotípico no reconocería ninguno de los dos tipos de Igs o sólo uno de ellos, si estas Igs poseyeran el idiotipo adecuado.

Nuestros resultados indican que ninguno de los AcM analizados reconoce determinantes idiotípicos en las Igs de la trucha, ya que reaccionan con anticuerpos anti-LPS y con anticuerpos anti-TNP-OVA. El AcM 1C6 podría ser una excepción, ya que presentó una reactividad muy baja, aunque por encima del control negativo, frente a los anticuerpos anti-TNP-OVA.

Un dato interesante revelado con estos experimentos es la presencia de anticuerpos naturales en la trucha anti-TNP-OVA, de los cuales pensamos que la mayoría podrían ser anticuerpos anti-TNP, por las referencias que existen sobre la presencia de anticuerpos naturales frente a este hapteno en diversas especies de vertebrados (Desvaux y Charlemagne, 1981; Benner et al., 1982; Vilain et al., 1984; Wetzel y Charlemagne, 1985; Charlemagne, 1987; Holmberg, 1987). Desvaux y Charlemagne (1981) explican la existencia de anticuerpos naturales anti-TNP en el carpín por una activación espontánea de algunos clones de linfocitos sin la mediación de estímulos externos, idea que es apoyada por la ausencia de memoria en las respuestas; sin embargo, estos autores no descartan la existencia de una estimulación de estos clones con antígenos que reaccionen cruzadamente con el TNP, presentes en el agua o el alimento.

En los mamíferos, los anticuerpos naturales suelen ser "polirreactivos", es decir, son capaces de reconocer un amplio espectro de antígenos (normalmente autoantígenos), aunque con una baja afinidad (Holmberg, 1987); además, estos anticuerpos utilizan un número limitado de genes  $V_H$ , D y  $V_L$  para su formación (Dildrop et al., 1984; Holmberg, 1987). Se cree que son sintetizados por una subpoblación de linfocitos B que está permanentemente activada, con una alta conectividad idiotípica y asociada a procesos autorreactivos (Portnoi et al., 1988). En los peces, la elevada presencia en los sueros de anticuerpos naturales podría deberse a un número limitado de clones mantenidos continuamente en proceso de división y diferenciación

en ausencia aparente de estimulación antigénica, al igual que ocurre en mamíferos, y desde este punto de vista, su función podría estar asociada a la regulación idiotípica de la respuesta inmune. En algunos vertebrados inferiores, como el anfibio urodelo Ambystoma mexicanum, se ha demostrado que tanto los anticuerpos anti-TNP naturales como los producidos tras la inmunización, utilizan el mismo segmento  $V_H$  para su formación y, al igual que los anticuerpos de mamíferos, reaccionan cruzadamente con una gran cantidad de antígenos no relacionados, como la actina, la tubulina, la espectrina o la miosina (Charlemagne, 1987). Estas características coinciden con las de los anticuerpos anti-idiotipo que se han descrito en ratón o en humanos.

No obstante, quizá la explicación a la existencia de anticuerpos naturales en los peces se deba a la propia organización genética de sus Igs. Los teleósteos presentan un número relativamente bajo de genes  $V_H$  para la formación de sus Igs. Algunos de estos genes  $V_H$  son utilizados preferentemente por los linfocitos (Chaffari y Lobb, 1991), lo que implica que la diversidad de idiotipos presente en las Igs séricas podría ser muy limitada.

Otro dato de interés adicional que se obtiene con estos experimentos es la diferente reactividad de los AcM con los anticuerpos anti-TNP-OVA naturales y los producidos tras la inmunización. Mientras que las Igs reconocidas por algunos AcM no aumentan su título después de 30 días de inmunización (AcM 1A3, 1A6, 1B4, 2A1, 3F7 y 5G7), las Igs reconocidas por los AcM 1H2, 2D12 y 2H9 parecen expresarse preferentemente en respuesta a TNP-OVA. Una situación similar se ha observado en el salmón del Atlántico, donde algunos AcM anti-Igs de salmón no presentan reactividad con anticuerpos naturales anti-NIP, y sí la presentan frente a los anticuerpos inducidos tras inmunización de los salmones con el hapteno (Killie et al., 1991). Esta diferente reactividad de los AcM frente a los anticuerpos naturales y a los

anticuerpos "inmunes" permite a los autores definir la existencia de isotipos de Igs. Nuestros resultados sugieren que las cadenas L definidas por los AcM 2H9, 2D12 y 1H2, de 26 kDa, se expresan preferentemente en los anticuerpos inducidos frente a TNP-OVA, mientras que las cadenas L de 24 kDa definidas por los AcM 1A3 y 2A1, las cadenas L de 26 kDa reconocidas por los AcM 1A6, 1B4 y 5G7 y las cadenas H definidas por el AcM 3F7, no lo hacen.

La expresión preferencial de un tipo de cadena L sobre otra se ha observado en muchas especies, tanto en las Igs totales como en las Igs específicas producidas en respuesta frente a determinados antígenos (Nussenzweig y Benacerraf, 1967; Scott y Fleischman, 1982; Fulton et al., 1983; Lobb, 1986; Ambrosino et al., 1991). Las distintas hipótesis que se han planteado para explicar este fenómeno se pueden resumir en dos ideas fundamentales:

- 1) Las diferencias en las regiones  $C_L$  pueden restringir o modular la estructura terciaria o cuaternaria que la molécula puede asumir e, indirectamente, afectar al sitio de combinación con el antígeno.

- 2) Las porciones variables de los diversos tipos de cadenas L pueden ser diferentes, es decir, el tipo de cadena puede definir y delimitar las secuencias de la región variable.

En nuestro caso, desconocemos la especificidad de los AcM frente a los dominios  $C_L$  o  $V_L$ , así como la organización genética que presentan las cadenas L en las truchas, por lo que no podemos descartar ninguna de las posibilidades arriba mencionadas.

## **Determinación de la unión simultánea de pares de AcM sobre la molécula de Ig**

Con el fin de delimitar la existencia de las variantes antigénicas reconocidas por los AcM, realizamos un experimento de unión simultánea de pares de AcM sobre las moléculas de Ig, mediante un ELISA DAS. Considerando que las Igs son tetraméricas y que, por tanto, sus epítomos están repetidos al menos ocho veces, en un ensayo de este tipo, en condiciones de saturación de antígeno, los AcM deben reaccionar entre sí, a menos que reconozcan distintos tipos de Igs. Los datos obtenidos apoyan los resultados de las inmunoprecipitaciones. Se establecieron tres grandes grupos de reactividad (Fig. 12). Uno de ellos, compuesto por los AcM 1G7, 3B10, 3E4 y 4D11 (grupo C), reacciona con las Igs reconocidas por todos los AcM, es decir, reconocen epítomos presentes en toda la población de Igs. Los dos grupos restantes son excluyentes entre sí, los AcM del grupo A (1A6, 1B4, 1H2, 2H9, 3F7 y 5G7) no reaccionan con las Igs reconocidas por los AcM del grupo B (1A3 y 2A1), y viceversa. La heterogeneidad antigénica es, sin embargo, mayor, puesto que dentro del grupo A se establecen dos subgrupos (1= 1A6, 1H2, 2H9 y 5G7 y 2= 1B4 y 3F7), que reconocen distintos tipos de Igs, pero comparten reactividad con las Igs reconocidas con el AcM 2D12.

Estos datos, junto con los ensayos de reactividad de los AcM frente a cadenas H y L y los experimentos de inmunoprecipitación, nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

1) Los AcM 1G7, 3B10 y 4D11 reconocen epítomos sobre las cadenas H presentes en todas las Igs.

2) El AcM 3E4 reconoce un epítomo presente en todas las cadenas L de las Igs, tanto en las cadenas de 26 kDa como en las de 24 kDa.

3) El AcM 3F7 reconoce un epítipo presente sólo en una subpoblación de cadenas H. Esta subpoblación se encuentra asociada preferentemente a cadenas L de 26 kDa.

4) Existen, al menos, dos subpoblaciones antigénicas distintas de cadenas L de 26 kDa. Una está definida por los AcM 1A6, 1H2, 2H9 y 5G7, y la otra por el AcM 1B4. Estas últimas se encuentran asociadas a las cadenas H reconocidas por el AcM 3F7.

5) Las dos subpoblaciones de cadenas L de 26 kDa, definidas por los AcM 1A6, 1H2, 2H9 y 5G7 y por el AcM 1B4 contienen algún(os) determinante(s) antigénico(s) común(es), como lo indica el hecho de que el AcM 2D12 reconozca ambas subpoblaciones.

6) Los AcM 1A3 y 2A1 reconocen epítipos presentes exclusivamente en las cadenas L de 24 kDa.

En resumen, podemos señalar que, si bien todas las cadenas H de las Igs contienen algunos determinantes antigénicos comunes, existe una subclase de cadenas H (definida por el AcM 3F7), que presenta una asociación preferencial con cadenas L de 26 kDa. Dentro de las cadenas L hay una gran complejidad antigénica. Todas las cadenas L comparten algunos determinantes antigénicos, pero existen, al menos, tres variantes antigénicas dentro de estas cadenas L: la definida por los AcM 1A6, 1H2, 2H9 y 5G7, de 26 kDa; la definida por el AcM 1B4, también de 26 kDa y la definida por los AcM 1A3 y 2A1, de 24 kDa. Un dato de interés adicional es que las cadenas L que contienen el determinante alotípico definido por el AcM 1B4, se asocian preferentemente a la subpoblación de cadenas H reconocida por el AcM 3F7. Una posible explicación de este hecho podría ser que el alotipo definido en la cadena L necesitara para su expresión el apareamiento de esta cadena con un determinado tipo de cadena H, en este caso, el definido por el AcM 3F7. Un ejemplo de esta situación se da en el conejo, donde Naessens et al. (1979) han definido la existencia de un marcador alotípico para la IgM

formado por la combinación de una cadena pesada  $\mu$  con una cadena  $\kappa$  que presenta un alotipo codificado por el locus b.

### **Análisis epitópico de las Igs**

Los estudios de especificidad epitópica indican que los AcM anti-Igs de trucha reconocen cuatro epítomos sobre las cadenas H y un mínimo de seis sobre las cadenas L. Las inhibiciones en una sola dirección observadas con algunos AcM podrían ser debidas a diferencias en su afinidad por las Igs de la trucha, aunque los AcM tienen títulos similares por ELISA, o bien a cambios conformacionales en los epítomos reconocidos por un AcM, inducidos por la unión del otro AcM.

Los datos de inhibiciones parciales obtenidos concuerdan con la clasificación hecha anteriormente de las variantes de cadenas L. El AcM 2A1, del grupo B, compite en su unión a las Igs con el AcM 1A3, perteneciente también al mismo grupo. El AcM 1B4 (grupo A2) no es competido por ningún AcM. Los AcM 2D12, 1H2, 5G7 y 2H9 (2D12: grupo A; 1H2, 5G7 y 2H9: grupo A1) compiten parcialmente entre sí, por lo que podrían estar reconociendo epítomos muy próximos.

### **Reactividad de los AcM con Igs de distintos salmónidos**

Los análisis de reacción cruzada del panel de AcM con las Igs de varios salmónidos indican que la mayoría de los epítomos están altamente conservados entre las diferentes especies. Sin embargo, los epítomos reconocidos por los AcM 3F7, 5G7, 3E4, 1H2 y 1A3 muestran una distribución polimórfica, ya que están presentes sólo en las Igs de algunos salmónidos. El hecho de que los AcM 1A3 y 5G7 no reconozcan las Igs del salmón chinook,

salmón sockeye y salmón chum (sólo el 5G7) puede también explicarse por su posible reactividad alotípica, ya que sólo fue analizado un suero de cada especie. El AcM 3E4, que parece reconocer un epítipo presente en todas las cadenas L de las Igs de la trucha arcoiris, fue el AcM que presentó una reactividad más restringida, ya que sólo reconoció las Igs de la otra especie de trucha analizada, la trucha común. En general, no hemos encontrado diferencias en la reactividad de los AcM frente a las Igs de la trucha arcoiris y de la trucha común, lo cual indica la existencia de una gran relación antigénica entre las Igs de las dos especies. Este dato concuerda con los encontrados por Thuvander et al. (1990), donde cuatro AcM que reaccionan frente a determinantes presentes en las cadenas H de las Igs de la trucha arcoiris, reaccionan cruzadamente con las Igs de la trucha común y del salmón del Atlántico, si bien otro AcM es específico de las Igs de la trucha arcoiris. En contraste, Kobayashi et al. (1982), utilizando un antisuero policlonal frente a las Igs del salmón chum, encuentra sólo una identidad parcial entre las dos especies de truchas aquí analizadas, mientras que las Igs de la trucha arcoiris eran indistinguibles de las de otros peces del género Oncorhynchus.

#### **Análisis de la heterogeneidad en las cadenas L de las Igs**

En prácticamente todas las clases de vertebrados se ha descrito la existencia de variantes de cadenas L, con distinto peso molecular y/o distinta antigenicidad. En los mamíferos, está clara la presencia de, al menos, dos tipos de cadenas L, denominadas  $\kappa$  y  $\lambda$ , aunque la complejidad varía dependiendo de las especies (Solomon, 1986). En el resto de los vertebrados, la presencia de distintos tipos de cadenas L en sus Igs se ha demostrado sólo en algunas especies de aves (Leslie, 1977; Kobayashi e Hirai, 1980), reptiles (Saluk et al., 1970) y anfibios (Hsu y Du Pasquier, 1984; Du Pasquier et al., 1989). En

los peces teleósteos, únicamente en el pez gato se ha establecido claramente la existencia de dos tipos de cadenas L, denominadas F y G por los autores, mediante el uso de AcM (Lobb et al., 1984), aunque en el salmón del Atlántico también se han definido dos variantes de cadenas L, con distinto peso molecular (Hávarstein et al., 1988).

Mediante la utilización de AcM, nosotros hemos podido establecer la presencia de, al menos, tres variantes antigénicas en las cadenas L de las Igs de la trucha arcoiris: la definida por los AcM 1A6, 1H2, 2H9 y 5G7 (grupo A1), la definida por el AcM 1B4 (grupo A2), y la definida por los AcM 1A3 y 2A1 (grupo B). Con estos resultados preliminares, intentamos analizar con mayor detalle la existencia de distintos isotipos de cadenas L, mediante la utilización de un AcM representativo de cada grupo. Para este fin, excluimos del estudio los AcM que no mostraron una reactividad muy clara frente a las cadenas L (1A6 y 1H2), y los AcM que presentaron posibles reactividades anti-alotípicas (1A3, 1B4 y 5G7). Por ello, nuestro trabajo se ha basado en el análisis de las cadenas L definidas por los AcM 2H9, de 26 kDa, y 2A1, de 24 kDa, representantes de los grupos A1 y B, respectivamente. Las cadenas L de las Igs del grupo A2 no pudieron ser analizadas con AcM anti-cadenas L, ya que el único AcM perteneciente a este grupo que cumplía esta característica, fue descartado por la posibilidad de que reaccionara frente a un determinante alotípico. No obstante, si fueron estudiadas las cadenas L de este grupo que se asocian preferentemente a las Igs reconocidas por el AcM 3F7 (anti-cadenas H), y que serán comentadas en el siguiente apartado.

Los AcM 2H9 y 2A1 reconocen alrededor de un 20% y un 11%, respectivamente, del total de Igs séricas. Cuando ambos AcM se mezclan en experimentos de inmunoprecipitación, se produce un efecto aditivo en el porcentaje de Igs reconocidas, lo cual indica que reaccionan con dos subpoblaciones de Igs antigénicamente diferentes. Este efecto aditivo no sólo se

refleja en los porcentajes de Igs reconocidos, sino también en los patrones electroforéticos observados tras los experimentos de inmunoprecipitación: mientras que los dos AcM por separado reconocen Igs que contienen sólo una de las dos formas moleculares de cadenas L, cuando se mezclan, las Igs resultantes presentan las dos cadenas L de 24 y 26 kDa. Hay que señalar que el 67% de Igs que no son reconocidas por ninguno de los dos AcM, parecen contener exclusivamente cadenas L de 26 kDa, si bien no podemos descartar la presencia en estas Igs de una pequeña proporción de cadenas L de 24 kDa. Como ya hemos mencionado anteriormente, esta cadena de menor peso molecular se encuentra en los sueros en una proporción muy inferior a la cadena de 26 kDa, y éste podría ser el motivo por el que no son observadas en dicha población de Igs.

Las cadenas L definidas por los AcM 2H9 y 2A1 presentan diferencias en su estructura primaria, como lo reflejan los experimentos de digestión de ambas cadenas con la proteasa V8 de S. aureus, que rompe específicamente los enlaces peptídicos por el extremo C-terminal de residuos aspártico o glutámico (Drapeau et al., 1972). Se encontraron dos importantes diferencias en estos estudios. Primeramente, aunque muchos de los péptidos tienen la misma movilidad relativa, hay una diferencia clara en las cantidades de algunos de los péptidos compartidos por ambas cadenas. Segundo, y más importante, hay diferencias en la movilidad relativa de varios de los péptidos resultantes. Estas diferencias en el peso molecular de los péptidos no pueden ser atribuidas a la presencia de carbohidratos en las cadenas L, ya que no se observa un descenso en el peso molecular de estas cadenas tras el tratamiento de las Igs con TFMS, en contraste con la marcada reducción que experimentan las cadenas H. Tras este tratamiento, las cadenas L conservan una diferencia de 2000 Da en su peso molecular. Esta misma diferencia se observa en las Igs reconocidas por ambos AcM, producidas en cultivos de linfocitos tratados con tunicamicina, lo cual indica que las cadenas L de 26 y 24 kDa que reaccionan con los AcM 2H9 y 2A1 no están

glicosiladas y, por lo tanto, la diferencia de peso molecular parece deberse a una distinta composición de aminoácidos.

Los bajos porcentajes de Igs reconocidos por la mayoría de los ACM anti-cadenas L obtenidos, reflejan la alta heterogeneidad existente en estas cadenas. La suma de los porcentajes correspondientes a las tres variantes antigénicas definidas en este trabajo justifica aproximadamente sólo el 50% de la población total de Igs. En el caso de los ACM 2H9 y 2A1, los porcentajes obtenidos en las inmunoprecipitaciones fueron confirmados mediante cromatografías de afinidad, donde las Igs de trucha se presentan en forma nativa, lo que excluye la posibilidad de que los bajos porcentajes obtenidos en las inmunoprecipitaciones sean debidos a alteraciones en las Igs por el marcaje radiactivo. Valores similares han sido descritos para distintos isotipos y subgrupos de cadenas  $\kappa$  y  $\lambda$  en mamíferos, definidos en los dominios  $C_L$  o  $V_L$  (Solomon, 1986). Hasta la fecha, desconocemos la posición de los epítomos reconocidos por los ACM 2H9 y 2A1 y, aunque es posible que se encuentren en la región  $C_L$ , no podemos descartar la presencia de isotipos en regiones consenso de los dominios  $V_L$ .

La heterogeneidad de puentes disulfuro en las Igs de la trucha observada por SDS-PAGE en condiciones no reductoras no parece asociarse con la presencia de diferentes cadenas L. En estas condiciones, las Igs 2H9 y 2A1 mostraron el mismo patrón electroforético que el descrito para las Ig totales, con una banda correspondiente al tetrámero de Ig, y tres bandas adicionales, cuyos pesos moleculares se corresponden con un trimero, dímero y monómero de Ig. En un estudio similar realizado en el pez gato, Lobb et al. (1984) tampoco encuentran una asociación entre los distintos tipos de cadenas L y la estructura covalente de la molécula de Ig.

Los datos expuestos indican que los ACM 2H9 y 2A1 reconocen dos isotipos de cadenas L en las Igs de la trucha arcoiris, que

presentan una distinta movilidad electroforética y, a juzgar por sus mapas peptídicos, una distinta estructura primaria.

La presencia de isotipos de cadenas H o L se pone también de manifiesto en su expresión celular, ya que, normalmente, cada clon de linfocitos B sintetiza un único tipo de cadenas H y L, debido a la existencia de un mecanismo de exclusión alélica. Hay, sin embargo, algunas excepciones descritas para las cadenas H en algunas especies de vertebrados inferiores, donde una misma célula expresa dos isotipos simultáneamente (Kobayashi et al., 1985b; Du Pasquier et al., 1989; Andreas y Ambrosius, 1989). La existencia de estas células doble positivas para dos isotipos de cadenas H se interpreta en muchas ocasiones como estadios transitorios en el cambio de clase de Ig en los linfocitos.

Para las cadenas L, no tenemos constancia de la existencia de clones B que expresen dos isotipos distintos en la misma célula. Los resultados de doble marcaje sobre células de pronefros indican que los AcM 2H9 y 2A1 tiñen distintas poblaciones celulares, lo cual apoya la idea de la existencia de diferentes tipos de cadenas L. Estos datos visuales fueron corroborados mediante experimentos de citometría de flujo, utilizando los AcM 2H9 y 2A1 para el marcaje de células sobre distintos órganos linfoides. En estos ensayos, los porcentajes de células que reconocían los dos AcM cuando eran mezclados, representaban aproximadamente la suma de los porcentajes obtenidos con los AcM por separado, lo cual indica que estos AcM reconocen distintas subpoblaciones linfoides. Sin embargo, resultan un tanto sorprendentes los altos porcentajes de células reconocidos por el AcM 2A1. Mientras que las células reconocidas por el AcM 2H9 representan aproximadamente 1/3 de la población total de linfocitos B, los valores obtenidos con el AcM 2A1, si exceptuamos la sangre periférica, se aproximan mucho al porcentaje de células B totales. Creemos que estos valores pueden estar sobreestimados debido, al menos en parte, a la presencia de anticuerpos citofílicos sobre otras células del sistema

inmune. En algunos vertebrados inferiores se ha descrito la existencia de Igs séricas adsorbidas pasivamente a receptores Fc en la membrana de los linfocitos (Schwager y Hadji-Azimi, 1984; Andreas y Ambrosius, 1989). Otros leucocitos, como los monocitos y los granulocitos, expresan también receptores Fc en su membrana, y pueden ser teñidos inespecíficamente (Pettey y McKinney, 1988; Rombout et al., 1991). Además, estos receptores pueden adsorber los AcM anti-Igs utilizados en los ensayos.

Otra posible explicación de los altos porcentajes de células reconocidas por el AcM 2A1 es la existencia de reacciones cruzadas con otros componentes de la membrana celular. Es un hecho la presencia en distintos tipos celulares de moléculas de superficie muy relacionadas estructuralmente, entre ellas, las pertenecientes a la superfamilia de las Igs. En los vertebrados inferiores, estas moléculas podrían estar mucho más relacionadas que en el nivel filogenético de los mamíferos, donde las posibilidades de divergencia han sido mayores. Así por ejemplo, Secombes et al. (1983) describen la existencia de AcM anti-Igs de carpa que reaccionan con prácticamente todos los timocitos y, al contrario, señalan que el 90% de los AcM que reaccionan frente a los timocitos, reconocen las Igs séricas. Estos resultados indican la presencia de epítomos comunes en distintas moléculas de membrana. El AcM 2A1 podría estar reconociendo algún determinante común entre las cadenas L y otro tipo de polipéptido. La conservación de secuencias en las cadenas L es muy alta a lo largo de la filogenia. Precisamente, algunas de estas secuencias altamente conservadas se encuentran también en las cadenas  $\beta$  del receptor de los linfocitos T, por lo que los anticuerpos que vayan dirigidos frente a dichas secuencias, pueden reconocer ambos tipos de moléculas (Marchalonis y Schluter, 1989a). Sin embargo, éste no sería el caso del AcM 2A1, ya que tiñe un porcentaje muy bajo de timocitos.

## **Análisis de la heterogeneidad en las cadenas H de las Igs**

De los cuatro AcM anti-cadenas H que obtuvimos en nuestro estudio, sólo uno reaccionaba con bajos porcentajes de Igs, el AcM 3F7, por lo que el análisis de la heterogeneidad en estas cadenas se centró exclusivamente en este anticuerpo.

El AcM 3F7 reconoce, aproximadamente, el 20% del total de Igs séricas. Reacciona frente a un epítipo situado en las cadenas H, probablemente proteico, ya que reconoce de forma similar las Igs tratadas con metaperiodato que las Igs cuyos grupos carbohidrato no se encuentran alterados. Los bajos porcentajes de Igs reconocidas por este AcM se confirman también a nivel celular, ya que reacciona con pequeños porcentajes de células con Igs de superficie. Todas estas características sugieren que el AcM 3F7 define un isotipo de cadenas H.

La existencia de diferentes isotipos de cadenas H se ha descrito desde los vertebrados más primitivos, los agnatos (Hanley et al., 1990). En los elasmobranquios, todas las especies estudiadas del orden rajiformes presentan dos tipos de cadenas H, con distinto peso molecular y sintetizadas por distintas subpoblaciones linfoides (Kobayashi et al., 1984; Tomonaga et al., 1984; Kobayashi y Tomonaga, 1988). En el resto de las especies de peces de esqueleto cartilaginoso analizadas, sólo se ha demostrado la existencia de Igs de alto y bajo peso molecular, pero no se han descrito diferencias entre sus cadenas H (Frommel et al., 1971; Klapper y Clem, 1977; Tomonaga et al., 1985; Rosenshein y Marchalonis, 1987). En los peces de esqueleto óseo, diversos autores han sugerido la existencia de variantes de cadenas H, con distinto peso molecular y/o distinta antigenicidad, en especies como el sargo (Lobb y Clem, 1981a y c), el pez globo (Warr, 1983), el pez gato (Lobb y Olson, 1988), o el salmón del Atlántico (Killie et al., 1991). En la trucha

arcoiris, Elcombe et al. (1985) han descrito la existencia de Igs monoméricas cuyas cadenas H difieren en 10 kDa respecto a las cadenas H de las Igs tetraméricas encontradas habitualmente (50 vs 60 kDa). Ambas cadenas H se diferencian, además, en sus mapas peptídicos, en su reactividad frente a antisueros de conejo y en su capacidad para activar el complemento.

Las Igs reconocidas por el AcM 3F7 no se diferencian estructuralmente de las Igs descritas a lo largo de este trabajo. Son Igs de alto peso molecular que, en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, se disocian en cuatro bandas, cuyos pesos moleculares corresponden a un tetrámero, trímero, dímero y monómero de una Ig. Su cadena H tiene un peso molecular de 70 kDa, y contiene el mismo porcentaje de hidratos de carbono que el referido anteriormente para las Igs totales (datos no mostrados). Esta cadena H se asocia preferentemente, si no exclusivamente, con cadenas L de 26 kDa. Asociaciones de este tipo se han observado en otros vertebrados inferiores, como en el sapo Xenopus laevis, donde su cadena pesada  $\nu$  se aparea preferentemente con una de las tres formas de cadenas L encontradas (Hsu y Du Pasquier, 1984). Asociaciones entre cadenas L e isotipos de cadenas H también se observan en los mamíferos, donde la proporción  $\kappa/\lambda$  para la IgD es 0,3, mientras que para la IgG<sub>4</sub> es 8,0; para el resto de las Igs, la proporción  $\kappa/\lambda$  oscila entre 1,1-3,2 (Calvanico y Tomasi, 1979).

Las cadenas H reconocidas por el AcM 3F7 no sólo muestran diferencias antigénicas con el resto de las cadenas H presentes en las Igs, se encuentran también diferencias estructurales. En las digestiones con la proteasa V8 de las cadenas H reconocidas por el AcM 3F7 y de las cadenas H no reconocidas por este anticuerpo, se observan diferencias en las cantidades relativas de algunos de los péptidos que comparten, así como diferencias en la movilidad de alguno de los péptidos obtenidos. Estas características, tomadas en conjunto, permiten definir la existencia de, al menos, dos isotipos o subclases de cadenas H

en las Igs de la trucha arcoiris, diferentes antigénica y estructuralmente, aunque con idénticos pesos moleculares.

El porcentaje de Igs reconocidas por el AcM 3F7 es muy similar al de los tres isotipos de cadenas H definidos en el pez gato con AcM (Lobb y Olson, 1988). En este trabajo, se analizaron algunas secuencias correspondientes a las regiones FR1 de cada uno de los isotipos, mostrando grandes diferencias entre ellas, por lo que los autores consideran la posibilidad de que los epítomos reconocidos por los AcM se localicen en las regiones variables de las cadenas; los isotipos en la región V pueden ser diferenciados con AcM si una región consenso de una determinada familia génica V es antigénicamente diferente de una región consenso de otra familia V. Los estudios genéticos de las Igs realizados hasta la fecha en algunas especies de teleósteos indican la existencia de un única copia de genes  $C_H$ , aunque en el pez gato se ha sugerido la presencia de dos segmentos (Ghaffari y Lobb, 1989b). En cambio, se han descrito varias familias génicas  $V_H$  (Amemiya y Litman, 1990; Ghaffari y Lobb, 1991; Bengtén y Pilström, 1991), por lo que es altamente probable que los isotipos encontrados residan en estas regiones  $V_H$ .

Los patrones electroforéticos observados en las Igs reconocidas por el AcM 3F7 difieren según el método de obtención de dichas Igs. Cuando son aisladas mediante ensayos de inmunoprecipitación, se obtiene el patrón clásico, consistente en una cadena H de 70 kDa y una cadena L de 26 kDa. Cuando estas Igs se aíslan a partir de un suero total de trucha, por medio de cromatografías de afinidad, se observa una banda adicional con un peso ligeramente menor que las cadenas L de 24 kDa. Los porcentajes densitométricos obtenidos indican que por cada tetrámero de Ig hay aproximadamente 16 moléculas de esta proteína. Si estos porcentajes fueran reales, este componente añadiría aproximadamente 375 kDa al tetrámero. Este aumento considerable en el tamaño de las Igs no se observa en las electroforesis en SDS-PAGE, donde el tetrámero presenta un peso

molecular de 750 kDa, ni tampoco en las cromatografías de filtración en gel, donde las Igs reconocidas por el AcM 3F7 eluyen en el mismo volumen que las Igs tetraméricas encontradas habitualmente. Por lo tanto, no podemos descartar el hecho de que los porcentajes densitométricos sean un artefacto del ensayo, debido a una excesiva captación del colorante (Azul Brillante de Coomassie) por parte de esta proteína.

Aunque esta molécula no está presente en las Igs reconocidas por el AcM 3F7 en los experimentos de inmunoprecipitación, pensamos que puede estar asociada de alguna forma a dichas Igs, ya que cuando se recromatografian las Igs 3F7 en una columna de afinidad con otro AcM, el 1G7, aparece de nuevo esta banda en las electroforesis. Esta proteína está presente, por lo tanto, en las muestras de Igs reconocidas por dos AcM diferentes, lo cual sugiere que está asociada a dichas Igs, pero hasta el momento no hemos podido determinar si esta banda corresponde a un componente de las Igs reconocidas por el AcM 3F7 o a una molécula no relacionada con las Igs que se asocia a éstas.

Como ya mencionamos en el apartado anterior, el estudio de la variante de cadena L definido en el grupo A2 (AcM 1B4 y 3F7) se realizó con el AcM 3F7. Las cadenas L de 26 kDa que se asocian preferentemente a las Igs reconocidas por este AcM son antigénicamente distintas de las cadenas L de 26 kDa definidas por el AcM 2H9, y de las cadenas L de 24 kDa reconocidas por el AcM 2A1, como lo demuestran los experimentos de inmunoprecipitación aditiva que se realizaron con estos tres anticuerpos. En el caso del AcM 2A1, el efecto aditivo con las Igs 3F7 no fue total, lo que indica que estas Igs podrían contener un pequeño porcentaje de cadenas L de 24 kDa, aunque nunca han sido observadas en las electroforesis.

Los mapas peptídicos obtenidos para las dos variantes de cadenas L de 26 kDa, utilizando la proteasa V8 de S. aureus, muestran algunas diferencias estructurales entre ambas cadenas.

Aunque el AcM 3F7 no reconoce cadenas L, reacciona frente a un isotipo de cadenas H que se asocia preferentemente a una variante antigénica y estructural de cadenas L, lo que permite definir un tercer tipo de cadenas L, si bien desconocemos la proporción en que esta cadena se presenta en la población total de Igs.

#### **ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS CON Igs DE SUPERFICIE EN LOS ÓRGANOS LINFOIDES**

La presencia de subpoblaciones linfocitarias en los peces teleósteos, semejantes a las células T y B de los mamíferos, está relativamente bien establecida (Miller et al., 1985; Kaattari y Yui, 1987; Miller et al., 1987; Ellsaesser et al., 1988). El marcador más clásico de las células B es su Ig de superficie. Mediante el uso de AcM anti-Igs, se ha demostrado en los peces la existencia de subpoblaciones linfocitarias que presentan Igs de membrana, cuya funcionalidad es muy similar a la de las células B de los mamíferos (DeLuca et al., 1983; Miller et al., 1985), así como la existencia de subpoblaciones linfocitarias que no expresan Igs de superficie. La utilización de anticuerpos policlonales anti-Igs para este fin ha sido excluida, ya que suelen reaccionar inespecíficamente con otros componentes de la membrana de los leucocitos. Estos antisueros suelen teñir un alto porcentaje de timocitos (Emmrich et al., 1975; Warr et al., 1979), por lo que durante mucho tiempo se creyó que estas células expresaban Igs en su superficie, idea que ha sido rechazada con el uso de AcM (DeLuca et al., 1983; Thuvander et al., 1990).

Nuestros resultados referentes al porcentaje de linfocitos con Igs de superficie (mIg) en distintos órganos linfoides coinciden, en general, con los de otros autores, obteniendo una media del 12% de linfocitos en el pronefros, 14% en el mesonefros, 23% en el bazo y 41% en sangre periférica. Quizá el dato más divergente sea el del bazo, ya que autores como DeLuca

et al. (1983) y Thuvander et al. (1990) dan valores de linfocitos mIg<sup>+</sup> para la trucha arcoiris en este órgano de 30-32%, si bien, debido a la gran variabilidad individual que se encuentra, estas diferencias no son muy significativas.

En el pez gato, Lobb y Clem (1982) describen porcentajes de linfocitos B muy similares a los nuestros en el bazo y en sangre periférica, si bien resaltan las grandes diferencias existentes entre los individuos, así como entre los AcM utilizados, ya que para una misma muestra, distintos AcM tiñen porcentajes muy diferentes de células.

Los AcM que reconocen bajos porcentajes de Igs también tiñen porcentajes más bajos de células. Así, frente al 41% de células mIg<sup>+</sup> que reconocen los AcM del grupo C en sangre periférica, los AcM del grupo A1 tiñen alrededor del 9% de los linfocitos, los del grupo A2 el 18% y los del grupo B el 17%. No obstante, llaman la atención los resultados obtenidos en los grupos A2 y B ya que, a diferencia del grupo A1, tiñen un porcentaje de células tres veces mayor que el porcentaje de Igs séricas que reconocen. Este dato puede indicar que existen diferencias en el grado de síntesis o de catabolismo entre estas variantes de Igs.

Otro aspecto a destacar es el porcentaje de células reconocidas por el AcM 3E4 en sangre periférica. Este AcM reacciona aparentemente con las cadenas L de todas las Igs séricas, pero no reconoce la totalidad de las células mIg<sup>+</sup> en la sangre, determinadas con AcM anti-cadenas H totales (AcM 1.14, 3B10, 1G7). Este resultado podría explicarse por la existencia de otros tipos de cadenas L, presentes en algunas Igs de membrana, las cuales, por algún motivo, no son secretadas, o se secretan en cantidades muy bajas. Situaciones de este tipo se conocen para las cadenas H; por ejemplo, en el ratón, la mayoría de los linfocitos B periféricos poseen IgD en su membrana, pero esta Ig se presenta en el suero en unas concentraciones bajísimas (Campbell et al., 1989). Otra posible explicación sería la

existencia de una subpoblación de linfocitos circulantes que sólo expresen las cadenas H de las Igs en su membrana, aisladas o asociadas a otro tipo de proteínas. Este hecho se produce muy raras veces en los linfocitos B, pero ha sido observado en algunas líneas celulares de mamíferos (Pillai y Baltimore, 1987).

La presencia de células con Igs de superficie no es infrecuente en el timo de vertebrados. En mamíferos, esta subpoblación de células B tiene algunas características funcionales diferentes con respecto a los linfocitos B del bazo o de sangre periférica ya que, por ejemplo, presentan una respuesta muy baja frente a LPS, un mitógeno clásico para las células B. Una alta proporción de estas células en el timo son de naturaleza plasmática, y durante algún tiempo se consideraron como una población de linfocitos recirculantes, aunque hoy se les asigna un papel significativo en la maduración del repertorio de células T (Kimoto et al., 1989; Andreu-Sánchez et al., 1990).

En los vertebrados inferiores se han descrito células con Igs de membrana en el timo de especies como la carpa (Secombes et al., 1983), la trucha arcoiris (DeLuca et al., 1983; Thuvander et al., 1990; Razquín et al., 1990), o el sapo Xenopus laevis (Du Pasquier et al., 1989), mientras que en otras, como el anfibio urodelo Ambystoma mexicanum, no se han detectado (Tournefier et al., 1988b). Por otra parte, se han realizado algunos estudios funcionales en las células tímicas, y se han podido detectar respuestas de células formadoras de placas en timocitos de especies como el salmón coho (Kaattari e Irwin, 1985).

Para la trucha arcoiris, los autores citan porcentajes entre 1-5% de células con Igs de superficie en el timo (DeLuca et al., 1983; Thuvander et al., 1990), utilizando siempre AcM anti-cadenas H de las Igs. En nuestro caso, tanto los AcM anti-cadenas H como los AcM anti-cadenas L, reconocen una pequeña subpoblación de timocitos (alrededor del 1%). Creemos que el uso de AcM anti-cadenas L es interesante, ya que permite demostrar por primera

vez la existencia de auténticas moléculas de Ig en la superficie de estas células.

El AcM 4D11 (anti-cadenas H) reacciona con, aproximadamente, el 28% de los timocitos. Se ha descrito en muchas ocasiones la existencia de reacciones cruzadas entre las Igs séricas y moléculas presentes en la superficie de las células tímicas, tanto con anticuerpos policlonales como monoclonales (Emmrich et al., 1975; Warr et al., 1979; Secombes et al., 1983; Desvaux et al., 1987), explicándose, en unas ocasiones, por la presencia en la membrana de los timocitos de moléculas que contienen epítomos comunes con las Igs séricas (Ambrosius et al., 1982) y, en otras, por la reactividad de los anticuerpos frente a determinantes azucarados comunes a muchas proteínas (Yamaga et al., 1978; Desvaux et al., 1987). El AcM 4D11 no parece reconocer carbohidratos presentes en las cadenas H, a juzgar por los resultados del tratamiento de las Igs con metaperiodato. Además, sólo una subpoblación de timocitos es reconocida por este AcM, al contrario que lo señalado por otros autores que, utilizando los reactivos antes mencionados, obtienen tinciones de prácticamente todos los timocitos. Por ello creemos que el AcM 4D11 podría estar reconociendo selectivamente una molécula sobre la superficie de alguna subpoblación de timocitos; esta molécula no parece estar presente en los linfocitos T maduros, ya que el AcM 4D11 no reconoce, en los órganos linfoides, porcentajes de células mayores que otros AcM.

#### **PRODUCCIÓN "IN VITRO" DE Igs EN RESPUESTA A MITÓGENOS**

Este estudio se llevó a cabo con el fin de analizar una posible expresión diferencial de los isotipos de cadenas H y L definidos anteriormente (2H9, 2A1 y 3F7), en respuesta a dos tipos de mitógenos: LPS y PWM. En los mamíferos, ambos producen la diferenciación de los linfocitos B a células productoras de

anticuerpos (McKearn et al., 1982). Aunque estos dos mitógenos son activadores policlonales de los linfocitos B, estimulan de forma diferencial la producción de distintos isotipos de Igs. Así, en los cultivos, el LPS induce principalmente la secreción de IgM y, dentro de las IgG, la secreción de IgG<sub>2</sub> en humanos (Mayumi et al., 1983), y de IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>3</sub> en ratón (McKearn et al., 1982). El PWM estimula la formación de un mayor número de células plasmáticas que el LPS (Mayumi et al., 1983), promoviendo principalmente la secreción de IgG sobre IgM (Ambrosino et al., 1991); en el hombre, el PWM induce preferentemente la secreción de IgG<sub>1</sub>, y de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> en el ratón (McKearn et al., 1982; Mayumi et al., 1983). En humanos, la proporción  $\kappa/\lambda$  de las Igs producidas en respuesta a LPS y a PWM cambia con respecto a la que contienen las Igs séricas. En las Igs séricas esta proporción es de 2,3; en las Igs inducidas por el PWM es de 1,3 y en el caso del LPS, la proporción se encuentra incluso invertida (0,8) (Ambrosino et al., 1991).

Las concentraciones de 100  $\mu\text{g/ml}$  de LPS empleadas en nuestro trabajo son las consideradas óptimas por Warr y Simon (1983) para la trucha arcoiris, y por Kaattari y Yui (1987) para el salmón coho. El mitógeno PWM ha sido menos utilizado que el LPS para inducir proliferación y diferenciación celular en vertebrados inferiores. En humanos, la concentración óptima de PWM empleada para la producción de Igs oscila entre 1-10  $\mu\text{g/ml}$  (Hirano et al., 1977). Tillitt et al. (1988) realizaron un estudio comparativo sobre el grado de proliferación de linfocitos circulantes en la trucha arcoiris utilizando varios tipos de mitógenos: concanavalina A (ConA), fitohemaglutinina (PHA), LPS y PWM. La respuesta de proliferación a LPS y PWM fue muy baja, obteniéndose además fuertes variaciones individuales. Los mitógenos fueron utilizados a diferentes concentraciones; el PWM se empleó a 5, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , y con ninguna de estas concentraciones se obtuvo una diferencia significativa en el grado de proliferación con respecto a los controles, diferencia que sí se detectó con LPS a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

En nuestro estudio, el mitógeno LPS indujo una buena respuesta de secreción de Igs, mientras que en el caso del PWM resultó muy baja, prácticamente nula. Debido a las grandes diferencias individuales que se encuentran en este tipo de respuesta en los peces, las mismas células fueron utilizadas para medir el grado de secreción de Igs con ambos mitógenos, comprobándose de nuevo que el LPS inducía una respuesta apreciablemente mayor que el PWM a las dosis ensayadas. Este hecho contrasta con la actividad del PWM en otros vertebrados inferiores, como el anfibio Xenopus laevis, o en los mamíferos, donde produce una buena respuesta de secreción de Igs, incluso mayor que la respuesta inducida por el LPS, en el caso de los mamíferos (Mayumi et al., 1983; Schwager y Hadji-Azimi, 1984).

La baja respuesta obtenida por nosotros frente al PWM podría deberse a las características de las células empleadas, ya que en el pronefros parece haber linfocitos en distintos estadios de maduración (Kaattari e Irwin, 1985), y se ha sugerido que este mitógeno estimula principalmente poblaciones B maduras (Ambrosino et al., 1991). No obstante, esta explicación no estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Tillitt et al. (1988), ya que estos autores encuentran también una respuesta muy baja frente al PWM con linfocitos circulantes que, teóricamente, representan un estadio maduro de las células B. Debido a que el PWM es un mitógeno T-dependiente, una posibilidad alternativa sería la baja o ausente colaboración de los linfocitos T en esta respuesta, como consecuencia de algún mecanismo supresor inducido por el mitógeno, o de la incapacidad del PWM para estimular determinadas subpoblaciones T.

Los porcentajes de Igs 2H9 y 2A1 producidas en los cultivos controles son muy semejantes a los observados en los cultivos a los que se añadió el mitógeno PWM, lo cual está de acuerdo con la relativa inespecificidad que muestra la secreción de Igs en estos últimos. Se observa también una ligera disminución en el porcentaje relativo de las Igs 3F7, aunque debido a los bajos

niveles de Igs secretadas en los cultivos tratados con PWM, consideramos que estos datos no son suficientemente concluyentes para confirmar la expresión diferencial de un isotipo de Igs sobre otro.

Las cinéticas de producción de las Igs 3F7, 2H9 y 2A1 obtenidas en respuesta a LPS muestran, en cambio, algunas diferencias notables. Las Igs 2H9 presentan un porcentaje máximo en el día 2 de cultivo, descendiendo posteriormente su valor relativo, para permanecer en unos niveles constantes el resto de los días. Las Igs 3F7 se expresan de una manera preferencial, llegando a alcanzar algunos días el 40% del total de Igs existentes en los sobrenadantes de cultivo. Estas Igs presentan dos máximos en su porcentaje relativo, con un mínimo en el día 8 de cultivo. Este mínimo observado coincide con el pico del porcentaje de las Igs 2A1, que son las Igs que aparecen más tardíamente en el cultivo. En las gráficas podemos observar que las cinéticas obtenidas para los AcM 3F7 y 2A1 son como imágenes especulares, lo que podría reflejar una distinta cinética de síntesis y/o de catabolismo para ambas Igs. Los dos máximos correspondientes al porcentaje relativo de las Igs 3F7 coinciden, por otra parte, con dos picos en las concentraciones absolutas de dichas Igs, y podrían ser debidos al propio catabolismo de las Igs 3F7, o bien a la estimulación de dos subpoblaciones de linfocitos B, productores de ese isotipo, que presenten un diferente estadio madurativo, y por lo tanto, una diferente cinética de producción de Igs. Hay que tener en cuenta que las células utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir de pronefros, que contiene linfocitos B en distintos estadios de maduración (Kaattari e Irwin, 1985; Razquín et al., 1990), y que el mitógeno LPS es capaz de inducir la estimulación de subpoblaciones B relativamente inmaduras (Ambrosino et al., 1991).

Los tres tipos de Igs aquí analizados parecen comportarse de una forma diferente en su expresión en respuesta a LPS. A

pesar de que el LPS es un activador policlonal de los linfocitos B, como ya hemos mencionado anteriormente, en los mamíferos induce la expresión preferencial de determinados isotipos de Igs. En vertebrados inferiores, como el anfibio Xenopus laevis, el LPS induce la secreción prácticamente exclusiva de IgM e IgX en los cultivos de linfocitos, siendo la IgY detectable sólo en los tres primeros días de cultivo (Hsu et al., 1985). En general, la expresión isotípica podría estar regulada a varios niveles, por ejemplo, por una expansión o supresión selectiva de las células en las que se ha producido el cambio de isotipo, por la inhibición o inducción de la secreción de anticuerpos en estas células, o por la inducción de distintos isotipos en las células no comprometidas. También factores como las citoquinas influyen en la expresión de los isotipos a varios niveles (Esser y Radbruch, 1990).

#### **PRODUCCIÓN "IN VIVO" DE Igs EN RESPUESTA AL HAPTENO FITC**

Los distintos isotipos de cadenas H y L se expresan en distinta proporción en las Igs dependiendo del tipo de antígeno frente al que vayan dirigidas (Der Balian et al., 1980; Scott y Fleischman, 1982; Fulton et al., 1983; Esser y Radbruch, 1990). La expresión preferencial de distintos isotipos de Igs en respuesta a diversos antígenos ha sido puesta de manifiesto en prácticamente todas las clases de vertebrados. El tipo de respuesta inmune determina qué isotipos serán producidos y con qué frecuencias. Los patrones isotípicos varían según la forma de activación de las células B, lo cual es dependiente del antígeno, de la ruta de inmunización, de la actividad de las distintas células reguladoras implicadas, y de la dotación genética del individuo (Esser y Radbruch, 1990).

En los vertebrados inferiores, se ha demostrado la expresión preferencial de algunos isotipos de cadenas H y L en respuesta

a determinados haptenos. Así, en el pez gato, las Igs producidas en respuesta al hapteno DNP contienen preferentemente cadenas L del tipo F (Lobb, 1986) y cadenas H reconocidas por el AcM anti-isotípico 3D11 (Lobb y Olson, 1988). Las cadenas H reconocidas por este AcM también se expresan de una manera preferencial en respuesta al hapteno FITC (Lobb y Olson, 1988), mientras que la proporción habitual de las cadenas L no se ve afectada en esta respuesta (Lobb et al., 1984). En otros peces, como el tiburón nodriza, el corocoro, el carpín o la trucha arcoiris, se ha detectado un aumento en la concentración de Igs monoméricas en respuesta a antígenos como DNP o albúmina (Trump, 1970; Clem y McLean, 1975; Shankey y Clem, 1980; Elcombe et al., 1985). Este mismo efecto ha sido observado para las IgY en Ambystoma mexicanum, un anfibio urodelo (Tournefier et al., 1988a). En otro anfibio, Xenopus laevis, se ha demostrado que la IgM se expresa tanto en las respuestas T-independientes como en las T-dependientes, mientras que la IgY se produce únicamente en estas últimas (Clothier et al., 1988).

En este trabajo, nosotros hemos analizado la expresión de los isotipos de Igs 2A1, 2H9 y 3F7 en respuesta al hapteno FITC. Hemos utilizado este sistema porque este hapteno es un potente inmunógeno, que produce altos niveles de anticuerpos específicos en muchas especies (Voss et al., 1978). El FITC se utilizó acoplado a LPS, ya que se ha señalado que los conjugados hapteno-LPS son altamente eficaces para realizar inmunizaciones anti-hapteno en los peces (Desvaux y Charlemagne, 1981). El hapteno DNP/TNP ha sido también ampliamente utilizado en este tipo de experimentos. A pesar de que nosotros hemos detectado la existencia de una expresión preferencial de las Igs reconocidas por el AcM 2H9 en respuesta a TNP-OVA, también hemos puesto de manifiesto la existencia de anticuerpos naturales frente a este antígeno en las truchas. Consideramos que el estudio de la expresión preferencial de un isotipo de Igs frente a un determinado antígeno podría verse dificultado por la presencia de anticuerpos naturales frente al mismo, por lo que descartamos

para estos experimentos el sistema del hapteno DNP/TNP, y elegimos el sistema del hapteno FITC, para el cual no se encuentran anticuerpos naturales en la trucha.

Por dificultades técnicas, debidas a la escasez de volumen de los sueros inmunes, nos fue imposible realizar el aislamiento de los anticuerpos anti-FITC reconocidos por cada AcM, por lo que los datos aquí presentados se basan en el análisis del título de los anticuerpos específicos con cada uno de los AcM estudiados, y en el análisis de la concentración de Igs totales de cada isotipo en los sueros inmunes, determinada igualmente con todos los AcM. Ambos parámetros nos proporcionan una idea relativa acerca de la expresión de los isotipos de Igs en esta respuesta inmune.

La síntesis de anticuerpos anti-FITC es detectable con todos los AcM utilizados desde el día 7 post-inoculación, lo cual coincide con los datos señalados por otros autores para este mismo hapteno en el salmón coho (Voss et al., 1978), para el hapteno TNP en el carpín (Desvaux y Charlemagne, 1981), o para el hapteno DNP en el pez gato (Lobb, 1986). La máxima producción de anticuerpos en estas respuestas primarias se suele alcanzar, al igual que ocurre en nuestros ensayos, entre la 3ª y la 4ª semana post-inoculación (Voss et al., 1978; Desvaux y Charlemagne, 1981; Isbell y Pauley, 1983; Bortz et al., 1984; Lobb, 1986). En los anticuerpos anti-FITC totales (medidos con el AcM 1G7) y en los anticuerpos 3F7, se observa un aumento progresivo de sus títulos a lo largo de las cuatro semanas del ensayo; en cambio, los anticuerpos anti-FITC que expresan los isotipos 2A1 y 2H9, aunque están presentes en los sueros inmunes, no aumentan prácticamente su título desde la 1ª hasta la 3ª semana post-inoculación. Así, mientras que los anticuerpos anti-FITC totales presentan un aumento en su título de 2,4 logaritmos desde el día 7 hasta el día 21, los anticuerpos 3F7 aumentan 1,4 logaritmos, 0,7 los anticuerpos 2A1 y 0,5 los anticuerpos 2H9. Estos datos indican que la respuesta inmune anti-FITC en las

primeras semanas está mediada principalmente por otros isotipos de cadenas L no reconocidas por los AcM 2H9 y 2A1, mientras que las cadenas H que reaccionan con el AcM 3F7 parecen contribuir a esta respuesta de una manera activa desde los primeros días. Hay que señalar que en el día 28 post-inoculación, los anticuerpos 2H9 anti-FITC mostraron los títulos más bajos de todos los anticuerpos estudiados, lo que indica que las cadenas L 2H9 no son prioritarias en la respuesta a FITC.

La concentración de Igs totales en los peces inmunizados asciende progresivamente a lo largo de las semanas, al igual que la concentración de Igs 3F7, 2A1 y 2H9. Si comparamos estos resultados con el aumento de los títulos de anticuerpos específicos anti-FITC, podemos concluir que, al menos en las tres primeras semanas, la elevación de los niveles de Igs 2A1 y 2H9 no es debida principalmente a la producción de anticuerpos anti-FITC, sino a una estimulación inespecífica, mediada quizá por la utilización del LPS como "carrier", o a la acción del adyuvante.

Los resultados obtenidos referentes a la actividad específica de cada uno de los grupos de anticuerpos anti-FITC revelan que la mayor proporción de anticuerpos anti-FITC con respecto a las Igs totales corresponde a las Igs 3F7, siendo mucho menores las de las Igs 2A1 y 2H9. Este dato indica que una gran parte de las Igs 3F7 que se sintetizan son específicas del hapteno FITC, mientras que la mayoría de los anticuerpos 2A1 y 2H9 que contienen los sueros inmunes no lo son. Este hecho sugiere que las cadenas L de 26 kDa que se asocian preferentemente a las Igs 3F7, se expresan en un mayor grado que las cadenas de 26 kDa reconocidas por el AcM 2H9 o que las cadenas de 24 kDa reconocidas por el AcM 2A1 en respuesta al hapteno FITC. Con respecto a las cadenas H podemos indicar que las Igs reconocidas por el AcM 3F7 se expresan en los anticuerpos anti-FITC pero, al carecer de AcM que reconozcan la otra subpoblación de cadenas H, no podemos establecer comparaciones para determinar la existencia de una expresión preferencial.

## PRODUCCIÓN DE Igs EN EL DESARROLLO ONTOGÉNICO DE LA TRUCHA

Los peces, debido a su desarrollo en el medio externo, necesitan un sistema inmune eficiente desde los primeros días de vida. Uno de los parámetros utilizado para determinar el grado de inmunocompetencia de los animales es la concentración de Igs en sus sueros. En la trucha arcoiris, las primeras células Ig<sup>+</sup> se detectan a los 4-5 días post-eclosión (Razquín et al., 1990). Sin embargo, nosotros hemos observado la presencia de Igs en estadios anteriores a la eclosión de los huevos. En la carpa, van Loon et al. (1981) encuentran bajas cantidades de Igs en homogeneizados de animales antes del día 21 post-fertilización, con un mínimo en el día 10. Desde el día 21, los niveles de Igs aumentan progresivamente; las células linfoides con Igs de superficie o citoplásmicas aparecen por primera vez, en el timo y el riñón, entre los días 14-21 post-fertilización. En el anfibio Xenopus laevis, también se detectan IgM e IgY en el fluido peritoneal al mismo tiempo que se completa la diferenciación de los órganos linfoides (Katagiri y Tochinai, 1987; Du Pasquier et al., 1989), y algunos autores han demostrado la existencia de ambos tipos de Igs en ausencia total de un tejido linfoide diferenciado (Leverone et al., 1979). La existencia de Igs en estadios tan tempranos del desarrollo se interpreta en estos casos como la consecuencia de una transferencia pasiva de anticuerpos desde la madre a los huevos. En el caso de la trucha, sin embargo, parte de estas Igs parecen ser sintetizadas "de novo", ya que desde el primer estadio estudiado (8 días pre-eclosión), hasta el momento de la eclosión de los huevos, se observa un aumento progresivo en la concentración de Igs, alcanzando un máximo precisamente en el momento de la eclosión, que llega a cuadruplicar el valor obtenido en el estadio anterior (4 días pre-eclosión). Este máximo no sólo se produce en las Igs totales, sino también en las Igs reconocidas por los ACM 2H9, 2A1 y 3F7.

A partir del momento de la eclosión se produce, también en todos los casos, un descenso progresivo en la concentración de Igs séricas. Desde los 14 días post-eclosión, este descenso se estabiliza, quedando en unos niveles mínimos hasta el último estadio analizado (2 meses post-eclosión). El hecho de que se produzca un fuerte descenso de la concentración de Igs en los 14 primeros días del desarrollo fuera del huevo puede deberse al catabolismo propio de las Igs, cuya vida media está calculada en 49 h en el salmón coho (Voss et al., 1980), junto a un bajo o ausente recambio de estas Igs. Esta ausencia de síntesis "de novo" de Igs podría ser consecuencia de un mecanismo de inmunosupresión, mediado, al menos en parte, por una situación de stress, provocada por la salida al medio externo del alevín. Este descenso en las concentraciones de Igs no puede ser atribuido a un aumento de la masa corporal de los alevines sin que exista un aumento proporcional de las Igs, ya que hemos observado que las cantidades absolutas de Igs que presenta cada individuo sufren también un fuerte descenso desde el momento de la eclosión.

La cinética de producción de las Igs 3F7 en el desarrollo ontogénico presenta diferencias considerables con respecto a las Igs totales o a las Igs 2A1 y 2H9, ya que sólo son detectables durante un corto período de tiempo, que comprende desde el momento de la eclosión hasta el día 14 post-eclosión. Quizá el resultado más sorprendente es que su concentración aumenta al menos 20 veces en el momento de la eclosión con respecto al estadio anterior analizado. Este aumento, junto con el aumento general observado para todas las Igs, puede representar un mecanismo de respuesta inmune no específica con un papel protector de los alevines que, a partir de este momento, van a desarrollarse fuera del huevo. No creemos que el aumento de la concentración de Igs observado en la eclosión sea debido a un artefacto de la técnica ya que, por una parte, los datos han sido obtenidos con cuatro AcM diferentes, y por otra, en los estadios anterior (4 días pre-eclosión) y posterior (2 días post-eclosión)

a la eclosión, los valores sufren un aumento y un descenso progresivos, respectivamente.

Si consideramos que el volumen de sangre en la trucha con respecto al peso del cuerpo es de 50 ml/Kg (dato calculado para el salmón coho; Voss et al., 1980), y que se mantiene constante a lo largo del desarrollo del pez, podemos determinar que, en el período de la eclosión, la concentración de Igs totales alcanza valores comparables a los de los peces adultos (aproximadamente 3 mg/ml), mientras que a los dos meses de edad la concentración disminuye hasta 0,3 mg/ml. Este valor es equiparable con los datos obtenidos en las truchas de 20 g de peso (6 meses de edad), donde la concentración de Igs totales determinada es de 0,67 mg/ml (apartado 3 de Resultados).

Los datos obtenidos con el AcM 3F7 indican que durante el desarrollo ontogénico de la trucha, se expresan preferentemente otros isotipos de cadenas H no reconocidos por este AcM. No podemos precisar en qué momento del desarrollo, con posterioridad a los dos meses de edad, empiezan a sintetizarse de nuevo las Igs 3F7 en cantidades detectables, pero parece que es un isotipo de Ig que aparece tardíamente en la ontogenia, a excepción del corto período de tiempo en que se sintetiza, y que puede ser el resultado, como ya hemos mencionado, de un mecanismo de respuesta inespecífica. Diferencias en el tiempo de aparición en la ontogenia de distintos isotipos de Igs se ha observado en otros vertebrados inferiores, como Ambystoma mexicanum (Urodelo), donde la IgY se detecta por primera vez aproximadamente seis meses después de la aparición de la IgM (Fellah et al., 1989).

## VI. CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1.- Las Igs séricas mayoritarias de la trucha arcoiris son tetrámeros, formados por cadenas pesadas de 70-75 kDa y por dos formas moleculares de cadenas ligeras, de 26 y 24 kDa. Aproximadamente un 20% del peso molecular de las cadenas H es debido a la presencia de carbohidratos, mientras que las cadenas L no están glicosiladas.

2.- Las subunidades que forman los tetrámeros de Igs no siempre se encuentran unidas covalentemente y, en electroforesis en presencia de SDS y en condiciones no reductoras, se resuelven en cuatro bandas cuyos pesos moleculares corresponden a los de un tetrámero, trímero, dímero y monómero de una Ig.

3.- La concentración de Igs séricas en la trucha presenta variaciones estacionales. Este parámetro también varía con el tamaño de los peces, aunque a partir de una cierta edad estas concentraciones se estabilizan.

4.- Se han caracterizado catorce AcM frente a las Igs de la trucha arcoiris, cuatro de ellos dirigidos frente a las cadenas H y diez frente a las cadenas L. Cuatro de estos AcM reconocen la totalidad de las Igs séricas, mientras que los diez restantes reaccionan con subpoblaciones de Igs. Los epítomos que reconocen los AcM no parecen contener determinantes azucarados. Tres de los AcM parecen reconocer determinantes alotípicos.

5.- Existen al menos tres tipos de cadenas L en las Igs de la trucha arcoiris, dos de 26 kDa y una de 24 kDa. Estas cadenas se diferencian en su reactividad con algunos AcM y en sus mapas peptídicos, aunque todas las cadenas L comparten algunos determinantes antigénicos. Dos de estas cadenas L, las reconocidas por el AcM 2H9, de 26 kDa, y por el AcM 2A1, de 24 kDa, se expresan en distintas subpoblaciones linfocitarias.

6.- Las Igs de la trucha arcoiris contienen, al menos, dos subclases de cadenas H, una de las cuales ha sido definida por la reactividad del AcM 3F7 frente a las cadenas H del 20% de las Igs séricas. Ambas subclases presentan el mismo peso molecular, diferenciándose en su reactividad frente al AcM 3F7 y en sus mapas peptídicos.

7.- Las cadenas H reconocidas por el AcM 3F7 se asocian preferentemente a uno de los tipos de cadenas L ya definidos, de 26 kDa. Las cadenas L reconocidas por los AcM 2H9 (26 kDa) y 2A1 (24 kDa) no parecen asociarse a estas cadenas H.

8.- El 12% de los linfocitos en el pronefros, el 14% en el mesonefros, el 23% en el bazo y el 41% en sangre periférica expresan Igs en su membrana. Los AcM que reconocen subpoblaciones de Igs séricas reaccionan con porcentajes más bajos de linfocitos. En el timo también se detectan células que expresan Igs de superficie, representando aproximadamente el 1% de la población de timocitos.

9.- Las subpoblaciones de Igs definidas por los AcM 3F7, 2A1 y 2H9 se producen tanto "in vitro" como "in vivo". "In vitro", estos tres isotipos presentan una distinta cinética de secreción en respuesta al mitógeno LPS; el mitógeno PWM, a las dosis empleadas, apenas induce secreción de Igs. En la respuesta "in vivo" al hapteno FITC, utilizando como inmunógeno FITC-LPS, se obtiene una expresión preferencial de las Igs 3F7 sobre las Igs 2A1 y 2H9.

10.- La síntesis de Igs en los embriones de la trucha arcoiris se inicia antes de que se produzca la eclosión de los huevos, alcanzando en este momento las mayores concentraciones de Igs del período ontogénico estudiado (desde los 8 días pre-eclosión hasta los dos meses post-eclosión). Después de la eclosión, los niveles de Igs descienden drásticamente, manteniéndose bajos hasta el final de la experiencia. Las Igs reconocidas por el AcM 3F7 se detectan sólo durante un corto período de tiempo, lo que sugiere que este isotipo de Igs no es relevante durante el desarrollo ontogénico.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ACTON, R.T.; NIEDERMEIER, W.; WEINHEIMER, P.F.; CLEM, L.W.; LESLIE, G.A. y BENNETT, J.C. (1972). The carbohydrate composition of immunoglobulins from diverse species of vertebrates. *J. Immunol.* **109**: 371-381.
- 2.- AMBROSINO, D.M.; KANCHANA, M.V.; DELANEY, N.R. y FINBERG, R.W. (1991). Human B cells secrete predominantly  $\lambda$  L chains in the absence of H chain expression. *J. Immunol.* **146**: 599-602.
- 3.- AMBROSIUS, H.; FIEBIG, H. y SCHERBAUM, I. (1982). Phylogenetic aspects of fish immunoglobulins and lymphocyte receptors. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* **2**: 3-13.
- 4.- AMEMIYA, C.T.; HAIRE, R.N. y LITMAN, G.W. (1989). Nucleotide sequence of a cDNA encoding a third distinct Xenopus immunoglobulin heavy chain isotype. *Nucl. Acids Res.* **17**: 5388.
- 5.- AMEMIYA, C.T. y LITMAN, G.W. (1990). Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin heavy chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 811-815.
- 6.- ANDREAS, E.-M. y AMBROSIUS, H. (1989). Surface immunoglobulin on lymphocytes of the tortoise Agrionemys horsfieldii. *Dev. Comp. Immunol.* **13**: 167-175.
- 7.- ANDREU-SÁNCHEZ, J.L.; FARO, L.; ALONSO, J.M.; PAIGE, C.J.; MARTÍNEZ, C. y MARCOS, M.A.R. (1990). Ontogenic characterization of thymic B lymphocytes. Analysis in different mouse strains. *Eur. J. Immunol.* **20**: 1767-1773.
- 8.- AVRAMEAS, S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* **6**: 43-50.

- 9.- BENGTÉN, E. y PILSTRÖM, L. (1991). The nucleotide sequence of immunoglobulin heavy chain from Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) shows a different splicing pattern for membrane bound Ig. Dev. Comp. Immunol. 15, Suppl. 1: S43.
- 10.- BENNER, R.; van OUDENAREN, A.; BJÖRKLUND, M.; IVARS, F. y HOLMBERG, D. (1982). "Background" immunoglobulin production: measurement, biological significance and regulation. Immunol. Today 3: 243-249.
- 11.- BLACKWELL, T.K. y ALT, F.W. (1988). Immunoglobulin genes. En "Molecular Immunology", pp: 1-60. Eds. B.A. Hames y D.M. Glover. IRL Press, Oxford.
- 12.- BLAXHALL, P.C. (1981). A comparison of methods used for the separation of fish lymphocytes. J. Fish Biol. 18: 177-181.
- 13.- BORTZ, B.M.; KENNY, G.E.; PAULEY, G.B.; GARCIA-ORTIGOZA, E. y ANDERSON, D.P. (1984). The immune response in immunized and naturally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to *Diplostomum spathaceum* as detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Dev. Comp. Immunol. 8: 813-822.
- 14.- BRADFORD, M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- 15.- CALVANICO, N.J. y TOMASI, T.B. (1979). Effector sites on antibodies. En "Immunochemistry of proteins", pp: 1-71. Ed. M.Z. Atazzi. Plenum Press, New York.
- 16.- CAMBIER, J.C. (1991). Capturing antigen receptor components. Current Biology 1: 25-27.

- 17.- CAMBIER, J.C. y RANSOM, J.T. (1987). Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 5: 175-179.
- 18.- CAMPBELL, K.S. y CAMBIER, J.C. (1990). B lymphocyte antigen receptors (mIg) are non-covalently associated with a disulphide linked, inducibly phosphorylated glycoprotein complex. *EMBO J.* 9: 441-448.
- 19.- CAMPBELL, K.S.; JUSTEMENT, L.B. y CAMBIER, J.C. (1990). Murine B-cell antigen receptor-mediated signal transduction. In "Ligands, receptors, and signal transduction in regulation of lymphocyte function", pp: 1-50. Ed. J.C. Cambier. American Society for Microbiology, Washington.
- 20.- CATTANEO, A. y NEUBERGER, M.S. (1987). Polymeric immunoglobulin M is secreted by transfectants of non-lymphoid cells in the absence of immunoglobulin J chain. *EMBO J.* 6: 2753-2758.
- 21.- CHARLEMAGNE, J. (1987). Antibody diversity in amphibians. Noninbred axolotls used the same unique heavy chain and a limited number of light chains for their anti-2, 4- dinitrophenyl antibody responses. *Eur. J. Immunol.* 17: 421-424.
- 22.- CHERSI, A.; ALEXANDER, C.B. y MAGE, R. (1980). Partial primary structure of the immunoglobulin light chain constant region of a single rabbit of b5 allotype. *Mol. Immunol.* 17: 1515-1523.
- 23.- CLEM, L.W. (1971). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. IV. Immunoglobulin of the giant grouper, *Epinephalus itaira*. *J. Biol. Chem.* 246: 9-15.

- 24.- CLEM, L.W.; BLY, J.E.; ELLSAESSER, C.F.; LOBB, C.J. y MILLER, N.W. (1990). Channel catfish as an unconventional model for immunological studies. *J. Exp. Zool. Suppl.* 4: 123-125.
- 25.- CLEM, L.W. y McLEAN, W.E. (1975). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VII. Monomeric and tetrameric immunoglobulins of the margate, a marine teleost fish. *Immunology* 29: 791-799.
- 26.- CLEVELAND, D.W.; FISHER, S.G.; KIRSCHNER, M.W. y LAEMMLI, U.K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulphate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252: 1102-1106.
- 27.- CLOTHIER, R.H.; KANDOLA, L.; MIRCHANDANI, M.; ELLIS, A.; WOOD, P.; LAST, Z.; BALLS, M. y RUBEN, L.N. (1988). Responses in Xenopus to the thymus independent antigen polyvinylpyrrolidone (PVP) and its haptened derivative trinitrophenylated PVP (TNP-PVP). *Cell. Differentiation* 23: 213-220.
- 28.- COSSARINI-DUNIER, M.; DESVAUX, F.X. y DORSON, M. (1986). Variability in humoral responses to DNP-KLH of rainbow trout (Salmo gairdneri). Comparison of antibody kinetics and immunoglobulin spectrotypes between normal trouts and trouts obtained by gynogenesis or self-fertilization. *Dev. Comp. Immunol.* 10: 207-217.
- 29.- DAHAN, A.; REYNAUD, C.A. y WEILL, J.-C. (1983). Nucleotide sequence of the constant region of a chicken  $\mu$  heavy chain immunoglobulin mRNA. *Nucl. Acids Res.* 11: 5381-5389.
- 30.- DAVIS, A.C.; COLLINS, C. y SHULMAN, M.J. (1989). Differential glycosilation of polymeric and monomeric IgM. *Mol. Immunol.* 26: 147-152.

- 31.- DAVIS, A.C. y SHULMAN, M.J. (1989). IgM-molecular requirements for its assembly and function. *Immunol. Today* 10: 118-128.
- 32.- De IOANNES, A.E. y ÁGUILA, H.L. (1989). Amino terminal sequence of heavy and light chains from ratfish immunoglobulin. *Immunogenetics* 30: 175-180.
- 33.- DeLUCA, D.; WILSON, M. y WARR, G.W. (1983). Lymphocyte heterogeneity in the trout, Salmo gairdneri, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur. J. Immunol.* 13: 546-551.
- 34.- DER BALIAN, G.P.; SLACK, J.; CLEVINGER, B.L.; BAZIN, H. y DAVIE, J.M. (1980). Subclass restriction of murine antibodies. III. Antigens that stimulate IgG<sub>3</sub> in mice stimulate IgG<sub>2c</sub> in rats. *J. Exp. Med.* 152: 209-218.
- 35.- DESVAUX, F.X. y CHARLEMAGNE, J. (1981). The goldfish immune response. I. Characterization of the humoral response to particulate antigens. *Immunology* 43: 755-762.
- 36.- DESVAUX, F.X.; COSSARINI-DUNIER, M.; CHILMONZCYK, S. y CHARLEMAGNE, J. (1987). Antibody diversity in trouts obtained by gynogenesis or self-fertilization. Comparative analysis of the heavy chain spectrotypes. *Dev. Comp. Immunol.* 11: 577-584.
- 37.- DILDROP, R.; BOVENS, J.; SIEKEVITZ, M.; BEYREUTHER, K. y RAJEWSKY, K. (1984). A V region determinant (idiotope) expressed at high frequency in B lymphocytes is encoded by a large set of antibody structural genes. *EMBO J.* 3: 517-523.
- 38.- DRAPEAU, G.R.; BOILY, Y. y HOUMARD, J. (1972). Purification and properties of an extracellular protease of Staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* 247: 6720-6725.

- 39.- Du PASQUIER, L. (1982). Antibody diversity in lower vertebrates. -Why is it so restricted?. *Nature* 296: 311-313.
- 40.- Du PASQUIER, L.; SCHWAGER, J. y FLAJNIK, M.F. (1989). The immune system of Xenopus. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 251-275.
- 41.- DULIS, B.H.; KLOPPEL, T.M.; GREY, H.M. y KUBO, R.T. (1982). Regulation of catabolism of IgM heavy chains in a B lymphoma cell line. *J. Biol. Chem.* 257: 4369-4374.
- 42.- EDMUNDSON, A.B.; ELY, K.R.; ABOLA, E.E.; SCHIFFER, M. y PANAGIOTOPOULOS, N. (1975). Rotational allomerism and divergent evolution of domains in immunoglobulin light chains. *Biochemistry* 14: 3953-3961.
- 43.- ELCOMBE, B.M.; CHANG, R.J.; TAVES, C.J. y WINKELHAKE, J.L. (1985). Evolution of antibody structure and effector functions: comparative hemolytic activities of monomeric and tetrameric IgM from rainbow trout, Salmo gairdneri. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: 697-706.
- 44.- ELLSAESSER, C.F.; BLY, J.E. y CLEM, L.W. (1988). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the thymus of the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 787-799.
- 45.- EMMRICH, F.; RICHTER, R.F. y AMBROSIUS, H. (1975). Immunoglobulin determinants on the surface of lymphoid cells of carp. *Eur. J. Immunol.* 5: 76-78.
- 46.- ESSER, C. y RADBRUCH, A. (1990). Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Ann. Rev. Immunol.* 8: 717-735.
- 47.- FELLAH, J.S. y CHARLEMAGNE, J. (1988). Characterization of an IgY-like low molecular weight immunoglobulin class in the mexican axolotl. *Mol. Immunol.* 25: 1377-1386.

- 48.- FELLAH, J.S.; VAULOT, D.; TOURNEFIER, A. y CHARLEMAGNE, J. (1989). Ontogeny of immunoglobulin expression in the mexican axolotl. *Development* **107**: 253-263.
- 49.- FLEISCHMAN, J.B. y DAVIE, J.M. (1984). Immunoglobulins: allotypes and idiotypes. En "Fundamental Immunology", 1st edition, pp: 205-219. Ed. W.E. Paul. Raven Press, New York.
- 50.- FROMMEL, D.; LITMAN, G.W.; FINSTAD, J. y GOOD, R.A. (1971). The evolution of the immune response. XI. The immunoglobulins of the horned shark, Heterodontus francisci: purification, characterization and structural requirement for antibody activity. *J. Immunol.* **106**: 1234-1243.
- 51.- FUDA, H.; HARA, A. y YAMAZAKI, F. (1989). Purification and quantification of immunoglobulin M (IgM) in serum of masu salmon (Oncorhynchus masou). *Bull. Faculty Fisheries Hokkaido University* **40**: 292-306.
- 52.- FULLER, L.; MURRAY, J. y JENSEN, J.A. (1978). Isolation from nurse shark serum of immune 7S antibodies with two different molecular weight H-chains. *Immunochemistry* **15**: 251-259.
- 53.- FULTON, R.J.; NAHM, M.H. y DAVIE, J.M. (1983). Monoclonal antibodies to streptococcal group A carbohydrate. II. The  $V\kappa 1^{GAC}$  light chain is preferentially associated with serum  $IgG_3$ . *J. Immunol.* **131**: 1326-1331.
- 54.- GALLAGHER, R.B. y CAMBIER, J.C. (1990). Signal transmission pathways and lymphocyte function. *Immunol. Today* **11**: 187-189.
- 55.- GEARHART, P.J.; JOHNSON, N.D.; DOUGLAS, R. y HOOD, L. (1981). IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts. *Nature* **291**: 29-34.

- 56.- GHAFARI, S.H. y LOBB, C.J. (1989a). Cloning and sequence analysis of channel catfish heavy chain cDNA indicate phylogenetic diversity within the IgM immunoglobulin family. *J. Immunol.* **142**: 1356-1365.
- 57.- GHAFARI, S.H. y LOBB, C.J. (1989b). Nucleotide sequence of channel catfish heavy chain cDNA and genomic blot analysis. *J. Immunol.* **143**: 2730-2739.
- 58.- GHAFARI, S.H. y LOBB, C.J. (1991). Heavy chain variable region gene families evolved early in phylogeny. Ig complexity in fish. *J. Immunol.* **146**: 1037-1046.
- 59.- GODING, J.W. (1983a). Theory of monoclonal antibodies. En "Monoclonal antibodies: Principles and practice", pp: 5-55. Academic Press Inc. Ltd., Londres.
- 60.- GODING, J.W. (1983b). Conjugation of antibodies with fluorochromes. En "Monoclonal antibodies: Principles and practice", pp: 223-230. Academic Press Inc. Ltd., Londres.
- 61.- GODING, J.W. (1986). Membrane and secretory immunoglobulins: structure, biosynthesis and assembly. En "Handbook of Experimental Immunology". Vol. 1. (Immunochemistry), pp: 20.1-20.33. Ed. D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 62.- GODING, J.W. y LAYTON, J.E. (1976). Antigen-induced co-capping of IgM and IgD-like receptors on murine B cells. *J. Exp. Med.* **144**: 852-857.
- 63.- GOOD, A.H.; WOFSEY, L.; HENRY, C. y KIMURA, J. (1980). Preparation of hapten-modified protein antigens. En "Selected methods in cellular immunology", pp: 343-351. Eds. B.B. Mishell y S.M. Shiigi. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

- 64.- GREY, H.M. (1963). Phylogeny of the immune response. Studies on some physical, chemical and serologic characteristics of antibody produced in the turtle. *J. Immunol.* **91**: 819-825.
- 65.- GUILBERT, B.; DIGHIERO, G. y AVRAMEAS, S. (1982). Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J. Immunol.* **128**: 2779-2787.
- 66.- GUTMAN, G.A. (1981). Genetic and structural studies on rat kappa chain allotypes. *Transplant. Proc.* **13**: 1483-1488.
- 67.- HÄDGE, D. y AMBROSIUS, H. (1984). Evolution of low molecular weight immunoglobulins. IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. *Mol. Immunol.* **21**: 699-707.
- 68.- HÄDGE, D. y AMBROSIUS, H. (1986). Evolution of low molecular weight immunoglobulins. V. Degree of antigenic relationship between the 7S immunoglobulins of mammals, birds, and lower vertebrates to the turkey IgY. *Dev. Comp. Immunol.* **10**: 377-385.
- 69.- HÄDGE, D. y AMBROSIUS, H. (1988). Comparative studies on the structure of biliary immunoglobulins of some avian species. I. Physico-chemical properties of biliary Igs of chicken, turkey, duck and goose. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 121-129.
- 70.- HADJI-AZIMI, I. y PARRINELLO, N. (1978). The simultaneous production of two classes of cytoplasmic immunoglobulins by single cells in Xenopus laevis. *Cell. Immunol.* **39**: 316-324.
- 71.- HAGIWARA, K.; KOBAYASHI, K.; KAJII, T. y TOMONAGA, S. (1985). J-chain-like component in 18S immunoglobulin of the skate Raja kenoi, a cartilaginous fish. *Mol. Immunol.* **22**: 775-778.

- 72.- HAIRE, R.N.; SHAMBLLOT, M.J.; AMEMIYA, C.T. y LITMAN, G.W. (1989). A second Xenopus immunoglobulin heavy chain constant region isotype gene. Nucl. Acids Res. 17: 4.
- 73.- HANLEY, P.J.; SEPPELT, I.M.; GOOLEY, A.A.; HOOK, J.W. y RAISON, R.L. (1990). Distinct Ig H chains in a primitive vertebrate, Eptatretus stoutii. J. Immunol. 145: 3823-3828.
- 74.- HARRIS, L.K. y CAMBIER, J.C. (1987). B lymphocyte activation. Transmembrane signal transduction by membrane immunoglobulin in isolated cell membranes. J. Immunol. 139: 963-970.
- 75.- HASEMANN, C.A. y CAPRA, J.D. (1989). Immunoglobulins: structure and function. En "Fundamental Immunology", 2nd edition, pp: 209-233. Ed. W.E. Paul. Raven Press Ltd., New York.
- 76.- HÅVARSTEIN, L.S.; AASJORD, P.M.; NESS, S. y ENDRESEN, C. (1988). Purification and partial characterization of an IgM-like serum immunoglobulin from Atlantic salmon (Salmo salar). Dev. Comp. Immunol. 12: 773-785.
- 77.- HENDERSHOT, L.; BOLE, D. y KEARNEY, J.F. (1987). The role of immunoglobulin heavy chain binding protein. Immunol. Today 8: 111-114.
- 78.- HICKMAN, S. y KORNFIELD, S. (1978). Effect of tunicamycin on IgM, IgA and IgG secretion by mouse plasmacytoma cells. J. Immunol. 121: 990-996.
- 79.- HIGGINS, D.A.; MIDDLETON, D.; WILSON, M.R. y WARR, G.W. (1991). cDNA and amino acid sequences of the heavy chain of duck 5.7S IgG. Dev. Comp. Immunol. 15, Suppl. 1: S43.

- 80.- HINDS, K.R. y LITMAN, G.W. (1986). Major reorganization of immunoglobulin V<sub>H</sub> segmental elements during vertebrate evolution. *Nature* 320: 546-549.
- 81.- HIRANO, T.; KURITANI, T.; KISHIMOTO, T. y YAMAMURA, Y. (1977). "In vitro" immune response of human peripheral lymphocytes. I. The mechanism(s) involved in T cell helper functions in the Pokeweed mitogen-induced differentiation and proliferation of B cells. *J. Immunol.* 119: 1235-1241.
- 82.- HODGINS, H.O.; WEISER, R.S. y RIDGWAY, G.L. (1967). The nature of antibodies and the immune response in rainbow trout (Salmo gairdneri). *J. Immunol.* 99: 534-544.
- 83.- HOLMBERG, D. (1987). High connectivity, natural antibodies preferentially use 7183 and QUPC 52 V<sub>H</sub> families. *Eur. J. Immunol.* 17: 399-403.
- 84.- HOMBACH, J.; LECLERCQ, L.; RADBRUCH, A.; RAJEWSKY, R. y RETH, M. (1988). A novel 34 Kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells. *EMBO J.* 7: 3451-3456.
- 85.- HOMBACH, J.; LOTTSPREICH, F. y RETH, M. (1990a). Identification of the genes encoding the IgM- $\alpha$  and IgM- $\beta$  components of the IgM antigen receptor complex by amino-terminal sequencing. *Eur. J. Immunol.* 20: 2795-2799.
- 86.- HOMBACH, J.; TSUBATA, T.; LECLERCQ, L.; STAPPERT, H. y RETH, M. (1990b). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 343: 760-762.
- 87.- HSU, E. y Du PASQUIER, L. (1984). Studies on Xenopus immunoglobulins using monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* 21: 257-270.

- 88.- HSU, E.; FLAJNIK, M.F. y Du PASQUIER, L. (1985). A third immunoglobulin class in amphibians. *J. Immunol.* **135**: 1998-2004.
- 89.- HSU, E.; SCHWAGER, J. y ALT, F.W. (1989). Evolution of immunoglobulin genes:  $V_H$  families in the amphibian Xenopus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8010-8014.
- 90.- HUBER, R.; DEISENHOFER, J.; COLMAN, P.M.; MATSUSHIMA, M. y PALM, W. (1976). Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* **264**: 415-420.
- 91.- HUNKAPILLER, T. y HOOD, L. (1986). The growing immunoglobulin gene superfamily. *Nature* **323**: 15-16.
- 92.- INGRAM, G.A. y ALEXANDER, J.B. (1979). The immunoglobulin of the brown trout, Salmo trutta, and its concentration in the serum of antigen-stimulated and non-stimulated fish. *J. Fish Biol.* **14**: 249-260.
- 93.- ISBELL, G.L. y PAULEY, G.B. (1983). Characterization of immunoglobulins from the brown bullhead (Ictalurus nebulosus) produced against a naturally occurring bacterial pathogen, Aeromonas hydrophyla. *Dev. Comp. Immunol.* **7**: 473-482.
- 94.- ISHIZAKA, T.; TOMIOKA, H. e ISHIZAKA, K. (1971). Degranulation of human basophil leukocytes by anti- $\gamma$  antibody. *J. Immunol.* **106**: 705-710.
- 95.- JERNE, N.K. (1974). Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* **125C**: 373-389.
- 96.- JOHNSTONE, A. y THORPE, S. (1982a). Purification of immunoglobulins, constituent chains and fragments. En "Immunochemistry in practice", pp: 41-76. Blackwell Scientific Publications, Londres.

- 97.- JOHNSTONE, A. y THORPE, S. (1982b). Radiolabelling techniques. En "Immunochemistry in practice", pp: 102-120. Blackwell Scientific Publications, Londres.
- 98.- KAATTARI, S.L. e IRWIN, M.J. (1985). Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. Dev. Comp. Immunol. 9: 433-444.
- 99.- KAATTARI, S.L. y YUI, M.A. (1987). Polyclonal activation of salmonid B lymphocytes. Dev. Comp. Immunol. 11: 155-165.
- 100.- KATAGIRI, C. y TOCHINAI, S. (1987). Ontogeny of thymus-dependent immune responses and lymphoid cell differentiation in Xenopus laevis. Dev. Growth Diff. 29: 297-305.
- 101.- KILLIE, J.-E.; ESPELID, S. y JØRGENSEN, T.O. (1991). The humoral immune response in Atlantic salmon (Salmo salar, L.) against the hapten carrier antigen NIP-LPH. The effect of determinant (NIP) density and the isotype profile of anti-NIP antibodies. Fish & Shellfish Immunol. 1: 33-46.
- 102.- KIMOTO, H.; SHIRASAWA, T.; TANIGUCHI, M. y TAKEMORI, T. (1989). B cell precursors are present in the thymus during early development. Eur. J. Immunol. 19: 97-104.
- 103.- KINCADE, P.W. y COOPER, M.D. (1973). Immunoglobulin A: site and sequence of expression in developing chicks. Science 179: 398-400.
- 104.- KLAPPER, D.G. y CLEM, L.W. (1977). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. Characterization of the cysteine-containing peptide involved in the pentamerization of shark IgM. Dev. Comp. Immunol. 1: 81-92.

- 105.- KLESIUS, P.H. (1990). Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish, Ictalurus punctatus. Vet. Immunol. Immunopathol. 24: 187-195.
- 106.- KOBAYASHI, K.; HARA, A.; TAKANO, K. e HIRAI, H. (1982). Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon (Oncorhynchus keta). Mol. Immunol. 19: 95-103.
- 107.- KOBAYASHI, K. e HIRAI, H. (1980). Studies on subunit components of chicken polymeric immunoglobulins. J. Immunol. 124: 1695-1704.
- 108.- KOBAYASHI, K. y TOMONAGA, S. (1988). The second immunoglobulin class is commonly present in cartilaginous fish belonging to the order Rajiformes. Mol. Immunol. 25: 115-120.
- 109.- KOBAYASHI, K.; TOMONAGA, S. y HAGIWARA, K. (1985a). Isolation and characterization of immunoglobulin of hagfish, Eptatretus burgeri, a primitive vertebrate. Mol. Immunol. 22: 1091-1097.
- 110.- KOBAYASHI, K.; TOMONAGA, S. y KAJII, T. (1984). A second class of immunoglobulins other than IgM in the serum of a cartilaginous fish, the skate, Raja kenosjoi: Isolation and characterization. Mol. Immunol. 21: 397-404.
- 111.- KOBAYASHI, K.; TOMONAGA, S.; TESHIMA, K. y KAJII, T. (1985b). Ontogenic studies on the appearance of two classes of immunoglobulin-forming cells in the spleen of the Aleutian skate, Bathyraja aleutica, a cartilaginous fish. Eur. J. Immunol. 15: 952-956.
- 112.- KÖHLER, G. y MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.

- 113.- KOIDE, N.; NOSE, M. y MURAMATSU, T. (1977). Recognition of IgG by Fc receptor and complement: effects of glycosidase digestion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75: 838-844.
- 114.- KOKUBU, F.; HINDS, K.; LITMAN, R.; SHAMBLOTT, M.J. y LITMAN, G.W. (1988a). Complete structure and organization of immunoglobulin heavy chain constant region genes in a phylogenetically primitive vertebrate. *EMBO J.* 7: 1979-1988.
- 115.- KOKUBU, F.; LITMAN, R.; SHAMBLOTT, M.J.; HINDS, K. y LITMAN, G.W. (1988b). Diverse organization of immunoglobulin V<sub>H</sub> gene loci in a primitive vertebrate. *EMBO J.* 7: 3413-3422.
- 116.- KÖLSCH, E.; OBERBARNSCHEIDT, J.; BRÜNER, R. y HEUER, J. (1980). The Fc receptor: Its role in the transmission of differentiation signals. *Immunol. Rev.* 49: 61-78.
- 117.- KOSHLAND, M.E. (1985). The coming of age of immunoglobulin J chain. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 425-453.
- 118.- KOSHLAND, M.E. (1989). The immunoglobulin helper: the J chain. En "Immunoglobulin genes", pp: 345-359. Eds. T. Honjo, F.W. Alt y T.H. Rabbitts. Academic Press Ltd., Londres.
- 119.- KÜHN, L.C. y KRAEHENBUHL, J.-P. (1981). The membrane receptor for polymeric immunoglobulin is structurally related to secretory component. *J. Biol. Chem.* 256: 12490-12495.
- 120.- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 121.- LEATHERBARROW, R.J.; RADEMACHER, T.W. y DWEK, R.A. (1985). Effector functions of a monoclonal aglycosilated mouse IgG<sub>2a</sub>: binding and activation of complement component C1 and interaction with the human monocyte Fc receptor. *Mol. Immunol.* 22: 407-415.

- 122.- LESLIE, G.A. (1977). Evidence for a second avian light chain isotype. *Immunochemistry* 14: 149-151.
- 123.- LESLIE, G.A. y CLEM, L.W. (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of chicken. *J. Exp. Med.* 130: 1337-1352.
- 124.- LEVERONE, L.; SUHAR, T.; BROWN, R.D. y ARMENTROUT, R.W. (1979). Characteristics of immunoglobulin synthesized early in the development of Xenopus laevis. *Dev. Biol.* 68: 319-325.
- 125.- LINTIHICUM, D.S. y HILDEMANN, W.H. (1970). Immunologic responses of Pacific hagfish. III. Serum antibodies to cellular antigens. *J. Immunol.* 105: 912-918.
- 126.- LITMAN, G.W.; BERGER, L.; MURPHY, K.; LITMAN, R.; HINDS, K. y ERICKSON, B.W. (1985a). Immunoglobulin V<sub>H</sub> gene structure and diversity in Heterodontus, a phylogenetically primitive shark. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2082-2086.
- 127.- LITMAN, G.W.; BERGER, L.; MURPHY, K.; LITMAN, R.; HINDS, K.; JAHN, C.L. y ERICKSON, B.W. (1983). Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin V<sub>H</sub> gene homologue from caiman, a phylogenetically ancient reptile. *Nature* 303: 349-352.
- 128.- LITMAN, G.W.; HINDS, K. y KOKUBU, F. (1989a). The structure and organization of immunoglobulin genes in lower vertebrates. En "Immunoglobulin genes", pp: 163-180. Eds. T. Honjo, F.W. Alt y T.H. Rabbitts. Academic Press Ltd., Londres.
- 129.- LITMAN, G.W.; MURPHY, K.; BERGER, L.; LITMAN, R.; HINDS, K. y ERICKSON, B.W. (1985b). Complete nucleotide sequences of three V<sub>H</sub> genes in caiman, a phylogenetically ancient reptile: Evolutionary diversification in coding segments and variation in the structure and organization of recombinations elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 844-848.

- 130.- LITMAN, G.W.; SCHEFFEL, C. y GERBER-JENSON, B. (1980). Immunoglobulin diversity in the phylogenetically primitive shark, Heterodontus francisci. I. Suggested lack of structural variation between light chains isolated from different animals. J. Immunogenet. 7: 197-206.
- 131.- LITMAN, G.W.; SHAMBLOTT, M.J.; HAIRE, R.N. y AMEMIYA, C.T. (1990). Phylogenetic origins and diversification of immunoglobulin genes. En "Defense molecules", vol. 121, pp: 281-294. Eds. J.J. Marchalonis y L.L. Reinisch. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. New Series, Wiley-Liss, New York.
- 132.- LITMAN, G.W.; SHAMBLOTT, M.J.; HAIRE, R.; AMEMIYA, C.T.; NISHIKATA, H.; HINDS, K.; HARDING, F.; LITMAN, R. y VARNER, J. (1989b). Evolution of immunoglobulin gene complexity. En "Progress in Immunology VII", pp: 361-368. Ed. F. Melchers. Springer Verlag, Berlin.
- 133.- LITMAN, G.W.; STOLEN, J.S.; SARVAS, H.O. y MÄKELÄ, O. (1982). The range and fine specificity of the anti-hapten immune response: phylogenetic studies. J. Immunogenet. 9: 465-474.
- 134.- LITMAN, G.W.; WANG, A.C.; FUDEMBERG, H.H. y GOOD, A.A. (1971). N-terminal amino-acid sequence of African lungfish immunoglobulin light chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 2321-2324.
- 135.- LOBB, C.J. (1986). Preferential expression of catfish light chain immunoglobulin isotypes in anti-dinitrophenyl antibodies. J. Immunogenet. 13: 19-28.
- 136.- LOBB, C.J. y CLEM, L.W. (1981a). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. X. Humoral immunoglobulins of the sheephead, Archosargus probatocephalus. Dev. Comp. Immunol. 5: 271-282.

- 137.- LOBB, C.J. y CLEM, L.W. (1981b). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XI. Secretory immunoglobulins in the cutaneous mucus of the sheephead, Archosargus probatocephalus. Dev. Comp. Immunol. 5: 587-596.
- 138.- LOBB, C.J. y CLEM, L.W. (1981c). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XII. Secretory immunoglobulins in the bile of the marine teleost Archosargus probatocephalus. Mol. Immunol. 18: 615-619.
- 139.- LOBB, C.J. y CLEM, L.W. (1981d). The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus and bile. J. Immunol. 127: 1525-1529.
- 140.- LOBB, C.J. y CLEM, L.W. (1982). Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. Dev. Comp. Immunol. 6: 473-479.
- 141.- LOBB, C.J. y CLEM, L.W. (1983). Distinctive subpopulations of catfish serum antibody and immunoglobulin. Mol. Immunol. 20: 811-818.
- 142.- LOBB, C.J. y HAYMAN, J.R. (1989). Activation of complement by different immunoglobulin heavy chain isotypes of the channel catfish (Ictalurus punctatus). Mol. Immunol. 26: 457-465.
- 143.- LOBB, C.J. y OLSON, M.O.J. (1988). Immunoglobulin heavy H chain isotypes in a teleost fish. J. Immunol. 141: 1236-1245.
- 144.- LOBB, C.J.; OLSON, M.O.J. y CLEM, L.W. (1984). Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish. J. Immunol. 132: 1917-1923.

- 145.- LODISH, H.F.; KONG, N.; SNIDER, M. y STROUS, G.J.A.M. (1983). Hepatoma secretory proteins migrate from rough endoplasmic reticulum to Golgi at characteristic rates. *Nature* 304: 80-83.
- 146.- MACHULLA, H.K.G.; RICHTER, R.F. y AMBROSIUS, H. (1980). Study of antibody heterogeneity of carp (*Ciprinus carpio*, L.). The idiotypic specificity of anti-DNP antibodies. *Immunol. Lett.* 1: 329-334.
- 147.- MÄKELÄ, O. y LITMAN, G.W. (1980). Lack of heterogeneity in anti-hapten antibodies of a phylogenetically primitive shark. *Nature* 287: 639-640.
- 148.- MARCHALONIS, J.J. y SCHLUTER, S.F. (1989a). Immunoproteins in evolution. *Dev. Comp. Immunol.* 13: 285-301.
- 149.- MARCHALONIS, J.J. y SCHLUTER, S.F. (1989b). Evolution of variable and constant domains and joining segments of rearranging immunoglobulins. *FASEB J.* 3: 2469-2479.
- 150.- MARCHALONIS, J.J. y SCHLUTER, S.F. (1990). Origins of immunoglobulins and immune recognition molecules. *BioScience* 40: 758-768.
- 151.- MARCHALONIS, J.J.; SCHLUTER, S.F.; ROSENSHEIN, I.L. y WANG, A.-C. (1988). Partial characterization of immunoglobulin light chains of carcharine sharks: Evidence for phylogenetic conservation of variable region and divergence of constant region structure. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 65-74.
- 152.- MATSUBARA, A.; MIKARA, S. y KUSUDA, R. (1985). Quantitation of yellowtail immunoglobulin by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 51: 921-925.

- 153.- MATSUNAGA, T. y TÖRMANĚN, V. (1990). The characterization of a Ig germ line  $V_H$  gene of rainbow trout. European Federation of Immunological Societies, 10th Meeting. Abs. 31-3.
- 154.- MAYUMI, M.; KURITANI, T.; KUBAGAWA, H. y COOPER, M.D. (1983). IgG subclass expression by human B lymphocytes and plasma cells: B lymphocytes precommitted to IgG subclass can be preferentially induced by polyclonal mitogens with T cell help. *J. Immunol.* **130**: 671-677.
- 155.- McCUNE, J.M. y FU, S.M. (1981). Ig biosynthesis in a human pre-B cell line. *J. Immunol.* **127**: 2609-2611.
- 156.- McKEARN, J.P.; PASLAY, J.W.; SLACK, J.; BAUM, C. y DAVIE, J.M. (1982). B cell subsets and differential responses to mitogens. *Immunol. Rev.* **64**: 5-23.
- 157.- MELERO, J.A. y GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J. (1984). Preparation of monoclonal antibodies against glycoprotein IIIa of human platelets: their effect on platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.* **141**: 421-427.
- 158.- MESTECKY, J.; KULHAVY, R.; SCHROHENLOHER, R.E.; TOMANA, M. y WRIGHT, G.P. (1975). Identification and properties of J chain isolated from catfish macroglobulin. *J. Immunol.* **115**: 993-997.
- 159.- METZGER, H. y KINET, J.-P. (1988). How antibodies work: Focus on Fc receptors. *FASEB J.* **2**: 3-11.
- 160.- MILLER, N.W.; BLY, J.E.; van GINKEL, F.; ELLSAESSER, C.F. y CLEM, L.W. (1987). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* **11**: 739-747.

- 161.- MILLER, N.W. y CLEM, L.W. (1984). Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish "in vitro" antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. *J. Immunol.* 133: 2356-2359.
- 162.- MILLER, N.W.; SIZEMORE, R.C. y CLEM, L.W. (1985). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for "in vitro" antibody responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.* 134: 2884-2888.
- 163.- MORROW, W.J.W.; HARRIS, J.E.; DAVIES, D. y PULSFORD, A. (1983). Isolation and partial characterization of dogfish (Scyliorhynchus canicula) antibody. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 63: 409-418.
- 164.- MULLOCK, B.M. y HINTON, R.H. (1981). Transport of proteins from blood to bile. *Trends Biochem. Sci.* 6: 188-191.
- 165.- MURAOKA, S. y SHULMAN, M.J. (1989). Structural requirements for IgM assembly and cytolytic activity. Effects of mutations in the oligosaccharide acceptor site at Asn 402. *J. Immunol.* 142: 695-701.
- 166.- NAESSENS, J.; HAMERS-CASTERMAN, C. y KELUS, A. (1979). Allotypes of rabbit IgM linked to the b locus of the kappa polypeptide chain. *Immunogenetics* 8: 571-576.
- 167.- NOELLE, R.J. y SNOW, E.C. (1990). Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol. Today* 11: 361-368.
- 168.- NONAKA, M.; YAMAGUCHI, N.; NATSUUME-SAKAI, S. y TAKAHASHI, M. (1981). The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement. *J. Immunol.* 126: 1489-1494.

- 169.- NOSE, M. y WIGZELL, H. (1983). Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 6632-6636.
- 170.- NUSSENZWEIG, V. y BENACERRAF, B. (1969). Antihapten antibody specificity and L chain type. J. Exp. Med. **126**: 727-743.
- 171.- OLDEN, K.; BERNARD, B.A.; WHITE, S.L. y PARENT, J.B. (1982). Function of the carbohydrate moieties of glycoproteins. J. Cell. Biochem. **18**: 313-320.
- 172.- OLESEN, N.J. y VESTERGARD JØRGENSEN, P.E. (1986). Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout Salmo gairdneri under various environmental conditions. Dis. Aqu. Org. **1**: 183-189.
- 173.- OURTH, D.D. (1980). Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, Ictalurus punctatus. Dev. Comp. Immunol. **4**: 65-74.
- 174.- OWEN, M.J. y LAMB, J.R. (1988). Immunoglobulin genetics and the generation of antibody diversity. En "Immune recognition", pp: 17-36. Ed. D. Male. IRL Press Ltd., Oxford.
- 175.- PARVARI, R.; AVIVI, A.; LENTNER, F.; ZIV, E.; TEL-OR, S.; BURSTEIN, Y. y SCHECHTER, I. (1988). Chicken immunoglobulin  $\gamma$ -heavy chains. Limited  $V_H$  gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. EMBO J. **7**: 739-744.
- 176.- PEPPARD, J.; ORLANS, E.; PAYNE, A.W.R. y ANDREW, E. (1981). The elimination of circulating complexes containing polymeric IgA by excretion in the bile. Immunology **42**: 83-89.

- 177.- PETTEY, C.L. y MCKINNEY, E.C. (1988). Induction of cell-mediated cytotoxicity by shark 19S IgM. *Cell. Immunol.* **111**: 28-38.
- 178.- PILLAI, S. y BALTIMORE, D. (1987). Formation of disulphide-linked  $\mu_2$ - $\omega_2$  tetramers in pre-B cells by the 18K  $\omega$ -immunoglobulin light chain. *Nature* **329**: 172-174.
- 179.- PILSTRÖM, L. y PETERSSON, A. (1991). Isolation and partial characterization of immunoglobulin from cod (Gadus morhua, L.). *Dev. Comp. Immunol.* **15**: 143-152.
- 180.- PINK, J.R.L.; KOCH, C. y ZIEGLER, A. (1981). Immunornithological conversation. En "The Immune System", pp: 69-75. Eds. C.M. Steinberg e I. Lefkovits. Karger, Basel.
- 181.- PLUMB, J.A.; WISE, M.L. y ROGERS, W.A. (1986). Modulatory effects of temperature on antibody response and specific resistance to challenge of channel catfish, Ictalurus punctatus, immunised against Edwardsiella ictulari. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**: 297-304.
- 182.- PORTNOI, D.; LUNDKVIST, I. y COUTINHO, A. (1988). Inverse correlation between the utilization of an idiotype in specific immune responses and its representation in pre-immune "natural" antibodies. *Eur. J. Immunol.* **18**: 571-576.
- 183.- PULIDO, R. y SÁNCHEZ-MADRID, F. (1990). Glycosylation of CD45: carbohydrate composition and its role in acquisition of CD45RO and CD45RB T cell maturation-related antigen specificities during biosynthesis. *Eur. J. Immunol.* **20**: 2667-2671.

- 184.- PUTNAM, F.W.; LIU, Y.V. y LOW, T.L.K. (1979). Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease digestion, Fab and Fc fragments and the complete amino acid sequence of the  $\alpha 1$  heavy chain. J. Biol. Chem. 254: 2865-2874.
- 185.- RAISON, R.L.; HULL, C.J. y HILDEMANN, W.H. (1978a). Characterization of immunoglobulin from the Pacific hagfish, a primitive vertebrate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5679-5682.
- 186.- RAISON, R.L.; HULL, C.J. y HILDEMANN, W.H. (1978b). Production and specificity of antibodies to streptococci in the Pacific hagfish, Eptatretus stoutii. Dev. Comp. Immunol. 2: 253-262.
- 187.- RAZQUÍN, B.E.; CASTILLO, A.; LÓPEZ-FIERRO, P.; ÁLVAREZ, F.; ZAPATA, A. y VILLENA, A.J. (1990). Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson: an immuno- and enzyme-histochemical study. J. Fish Biol. 36: 159-173.
- 188.- REYNAUD, C.A.; ANQUEZ, V.; DAHAN, A. y WEILL, J.-C. (1985). A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. Cell 40: 283-291.
- 189.- REYNAUD, C.A.; ANQUEZ, V.; GRIMAL, H. y WEILL, J.-C. (1987). A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. Cell 48: 379-388.
- 190.- REYNAUD, C.A.; DAHAN, A.; ANQUEZ, V. y WEILL, J.-C. (1989). Development of the chicken antibody repertoire. En "Immunoglobulin genes", pp: 151-162. Eds. T. Honjo, F.W. Alt y T.H. Rabbitts. Academic Press Ltd., Londres.

- 191.- RICHTER, R.F. y AMBROSIUS, H. (1979). Anti-idiotypic antibodies of IgM-type produced in carp (Cyprinus carpio, L.). Eur. J. Immunol. 9: 578-580.
- 192.- RIJKERS, G.T.; FREDERIX-WOLTERS, E.M.H. y van MUISWINKEL, W.B. (1980). The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (Cyprinus carpio). Immunology 41: 91-97.
- 193.- ROMBOUT, J.H.W.M.; van DIEPEN, J.C.E.; van LISDONK, M.H.M.; TAVERNE-THIELE, J.J. y VERBURG-van KEMENADE, B.M. (1991). Ig-binding capacity of carp macrophages. Dev. Comp. Immunol. 15, Suppl. 1: S85.
- 194.- ROSENSHEIN, I.L. y MARCHALONIS, J.J. (1987). The immunoglobulins of carcharine sharks: a comparison of serological and biochemical properties. Comp. Biochem. Physiol. 86B: 737-741.
- 195.- SALUK, P.H.; KRAUSS, J. y CLEM, L.W. (1970). The presence of two antigenically distinct light chain ( $\kappa$  and  $\lambda$ ?) in alligator immunoglobulins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133: 365-369.
- 196.- SÁNCHEZ, G.A.; GAJARDO, M.K. y De IOANNES, A.E. (1980). IgM-like natural hemagglutinin from ratfish (Callorhynchus callorhynchus) serum: isolation and physico-chemical characterization. Dev. Comp. Immunol. 4: 667-678.
- 197.- SCHWAGER, J.; BÜRCKERT, N.; COURTET, M. y Du PASQUIER, L. (1989). Genetic basis of the antibody repertoire in Xenopus: analysis of the  $V_H$  diversity. EMBO J. 8: 2989-3001.
- 198.- SCHWAGER, J.; GROSSBERGER, D. y Du PASQUIER, L. (1988). Organization and rearrangement of immunoglobulin M genes in the amphibian Xenopus. EMBO J. 7: 2409-2415.

- 199.- SCHWAGER, J. y HADJI-AZIMI, I. (1984). Mitogen-induced B-cell differentiation in Xenopus laevis. *Differentiation* 27: 182-188.
- 200.- SCHWAGER, J. y WILSON, M. (1990). Evolution and diversification of Xenopus light chains. *Ann. Rep. Basel Inst. Immunol.* p: 34.
- 201.- SCOTT, M.G. y FLEISCHMAN, J.B. (1982). Preferential idiotype-isotype associations in antibodies to dinitrophenyl antigens. *J. Immunol.* 128: 2622-2628.
- 202.- SECOMBES, C.J.; van GRONINGEN, J.J.M. y EGBERTS, E. (1983). Separation of lymphocyte subpopulations in carp Cyprinus carpio, L.) by monoclonal antibodies: immunohistochemical studies. *Immunology* 48: 165-175.
- 203.- SHAMBLOTT, M.J. y LITMAN, G.W. (1989a). Genomic organization and sequences of immunoglobulin light chain genes in a primitive vertebrate suggest coevolution of immunoglobulin gene organization. *EMBO J.* 8: 3733-3739.
- 204.- SHAMBLOTT, M.J. y LITMAN, G.W. (1989b). Complete nucleotide sequence of primitive vertebrate immunoglobulin light chain genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4684-4688.
- 205.- SHANKEY, T.V. y CLEM, L.W. (1980). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. IX. Intramolecular heterogeneity of shark 19S IgM antibodies to the dinitrophenil hapten. *J. Immunol.* 125: 2690-2698.
- 206.- SNOW, P.M.; KEIZER, G.; COLIGAN, J.E. y TERHORST, C. (1984). Purification and N-terminal amino acid sequence of the human T cell surface antigen T8. *J. Immunol.* 133: 2058-2066.

- 207.- SOLOMON, A. (1986). Light chains of immunoglobulins: structural-genetics correlates. *Blood* 68: 603-610.
- 208.- SPIEGELBERG, H.L. (1974). Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv. Immunol.* 19: 259-294.
- 209.- STHALI, C.; STAEHELIN, T.H. y MIGGIANO, V. (1983). Spleen cells analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas. *Meth. Enzymol.* 92: 26-36.
- 210.- TAKAHASHI, N.; TETAERT, D.; DEBUIRE, B.; LIN, L.-C. y PUTNAM, F.W. (1982). Complete amino acid sequence of the  $\delta$  heavy chain of human immunoglobulin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2850-2854.
- 211.- TARTAKOFF, A. y VASSALLI, P. (1979). Plasma cell IgM molecules. Their biosynthesis, assembly, and intracellular transport. *J. Cell. Biol.* 83: 284-299.
- 212.- THUVANDER, A.; FOSSUM, C. y LORENZEN, N. (1990). Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin: characterization and applicability in immunoassays. *Dev. Comp. Immunol.* 14: 415-423.
- 213.- TILLITT, D.G.; GIESY, J.P. y FROMM, P.O. (1988). "In vitro" mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (Salmo gairdneri). *Comp. Biochem. Physiol.* 89A: 25-35.
- 214.- TKACZ, J. y LAMPEN, J. (1975). Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 248-257.
- 215.- TOMONAGA, S. y KOBAYASHI, K. (1985). A second class of immunoglobulin in the cartilaginous fishes. *Dev. Comp. Immunol.* 9: 797-802.

- 216.- TOMONAGA, S.; KOBAYASHI, K.; HAGIWARA, K.; SASAKI, K. y SEZAKI, K. (1985). Studies on immunoglobulin and immunoglobulin-forming cells in Heterodontus japonicus, a cartilaginous fish. Dev. Comp. Immunol. 9: 617-626.
- 217.- TOMONAGA, S.; KOBAYASHI, K.; KAJII, T. y AWAYA, K. (1984). Two populations of immunoglobulin-forming cells in the skate, Raja kenoei: their distribution and characterization. Dev. Comp. Immunol. 8: 803-812.
- 218.- TONEGAWA, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. Nature 302: 575-581.
- 219.- TORAÑO, A.; TSUZUKIDA, Y.; LIU, Y.-S.V. y PUTNAM, F.W. (1977). Location and structural significance of the oligosaccharides in human IgA1 and IgA2 immunoglobulins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2301-2305.
- 220.- TOURNEFIER, A.; FELLAH, S. y CHARLEMAGNE, J. (1988a). Monoclonal antibodies to axolotl immunoglobulins specific for different heavy chains isotypes expressed by independent lymphocyte subpopulations. Immunol. Lett. 18: 145-148.
- 221.- TOURNEFIER, A.; GUILLET, F.; ARDAVÍN, C. y CHARLEMAGNE, J. (1988b). Surface markers of axolotl lymphocytes as defined by monoclonal antibodies. Immunology 63: 269-276.
- 222.- TRUMP, G.N. (1970). Goldfish immunoglobulins and antibodies to bovine serum albumin. J. Immunol. 104: 1267-1275.
- 223.- UNDERDOWN, B.J. y SCHIFF, J.M. (1986). Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. Ann. Rev. Immunol. 4: 389-417.

- 224.- UNKELESS, J.C. (1977). The presence of two Fc receptors on mouse macrophages: Evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. *J. Exp. Med.* 145: 931-947.
- 225.- van LOON, J.A.A.; van OOSTEROM, R. y van MUISWINKEL, W.B. (1981). Development of the immune system in carp (*Cyprinus carpio*). En "Aspects of developmental and comparative immunology", pp: 469-470. Ed. J.B. Solomon. Pergamon Press, Oxford.
- 226.- VASILOV, R.G. y PLOEGH, H.L. (1982). Biosynthesis of murine IgD: Heterogeneity of glycosylation. *Eur. J. Immunol.* 12: 804-813.
- 227.- VILAIN, C.; WETZEL, M.-C.; Du PASQUIER, L. y CHARLEMAGNE, J. (1984). Structural and functional analysis of spontaneous anti-nitrophenyl antibodies in three cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and tench (*Tinca tinca*). *Dev. Comp. Immunol.* 8: 611-622.
- 228.- VOSS, E.W. Jr.; GROBERG, W.J. Jr. y FRYER, J.L. (1978). Binding affinity of tetrameric coho salmon Ig anti-hapten antibodies. *Immunochemistry* 15: 459-484.
- 229.- VOSS, E.W. Jr.; GROBERG, W.J. Jr. y FRYER, J.L. (1980). Metabolism of coho salmon Ig. Catabolic rate of coho salmon tetrameric Ig in serum. *Mol. Immunol.* 17: 445-452.
- 230.- VOSS, E.W. y WATT, R.H. (1977). Comparison of the microenvironment of chicken and rabbit antibody active site. *Adv. Exp. Med. Biol.* 88: 391-401.
- 231.- WARR, G.W. (1983). Immunoglobulin of the toadfish, *Spheroides glaber*. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B: 507-514.

- 232.- WARR, G.W.; DeLUCA, D. y ANDERSON, D.P. (1983). Thymocyte plasma membrane of the rainbow trout, Salmo gairdneri: associated immunoglobulin and heteroantigens. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B: 515-521.
- 233.- WARR, G.W.; DeLUCA, D. y GRIFFIN, B.R. (1979). Membrane immunoglobulin is present on thymic and splenic lymphocytes of the trout Salmo gairdneri. *J. Immunol.* 123: 910-917.
- 234.- WARR, G.W. y MARCHALONIS, J.J. (1977). Lymphocyte surface immunoglobulin of the goldfish differs from its serum counterpart. *Dev. Comp. Immunol.* 1: 15-22.
- 235.- WARR, G.W. y SIMON, R.C. (1983). The mitogen response potential of lymphocytes from the rainbow trout (Salmo gairdneri) re-examined. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 379-384.
- 236.- WARR, G.W.; TONELLE, C. y SCHLUTER, S.F. (1990). Discussion summary: immunoglobulins. En "Defense molecules", vol. 121 pp: 261-264. Eds. J.J. Marchalonis y L.L. Reinisch. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. New Series*, Wiley-Liss, New York.
- 237.- WEBER, K. y OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4411.
- 238.- WEINHEIMER, P.F.; MESTECKY, J. y ACTON, R.T. (1971). Species distribution of J chain. *J. Immunol.* 107: 1211-1212.
- 239.- WETZEL, M.-C. y CHARLEMAGNE, J. (1985). Antibody diversity in fish. Isoelectrofocalisation study of individually-purified specific antibodies in three teleost fish species: tench, carp and goldfish. *Dev. Comp. Immunol.* 9: 261-270.

- 240.- WIENANDS J.; HOMBACH, J.; RADBRUCH, A.; RIESTERER, C. y RETH, M. (1990). Molecular components of the B cell antigen receptor complex of class IgD differ partly from those of IgM. *EMBO J.* 9: 449-455.
- 241.- WILLIAMS, A.F. y BARCLAY, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6: 381-405.
- 242.- WILSON, M.R.; MARCUZ, A.; van GINKEL, F.; MILLER, N.W.; CLEM, L.W.; MIDDLETON, D. y WARR, G.W. (1990). The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, Ictalurus punctatus: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule. *Nucl. Acids Res.* 18: 5227-5233.
- 243.- WINKELHAKE, J.L. y NICOLSON, G.L. (1976). Aglycosylantibody. *J. Biol. Chem.* 251: 1074-1080.
- 244.- WOODWARD, M.P.; YOUNG, W.W. Jr. y BLOODGOOD, R.A. (1985). Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immunol. Meth.* 78: 143-153.
- 245.- YAMAGA, K.M.; KUBO, R.T. y ETLINGER, H.M. (1978). Studies on the question of conventional immunoglobulin on thymocytes from primitive vertebrates. I. Presence of anti-carbohydrate antibodies in rabbit anti-trout sera. *J. Immunol.* 120: 2068-2073.
- 246.- YAMAGUCHI, N.; TESHIMA, C.; KURASHIGE, S.; SAITO, T. y MITSUHASHI, S. (1981). Seasonal modulation antibody formation in rainbow trout (Salmo gairdneri). En "Aspects of Developmental and Comparative Immunology I", pp: 483-484. Ed. J.B. Solomon. Pergamon Press, Oxford.

## APÉNDICE

Nombres en latín de las especies de teleósteos citadas

- Bacalao del Atlántico: Gadus morhua
- Carpa: Cyprinus carpio
- Carpín: Carassius auratus
- Corocoro: Haemulon album
- Mero: Epinephalus itaira
- Pez dama: Elops saurus
- Pez gato: Ictalurus punctatus
- Pez globo: Spheroides glaber
- Pez limón: Seriola quinqueradiata
- Salmón del Atlántico: Salmo salar
- Salmón chinook: Oncorhynchus tshawytscha
- Salmón chum: Oncorhynchus keta
- Salmón coho: Oncorhynchus kisutch
- Salmón masu: Oncorhynchus masou
- Salmón sockeye: Oncorhynchus nerka
- Sargo: Archosargus probatocephalus
- Tenca: Tinca tinca
- Trucha arcoiris: Oncorhynchus mykiss
- Trucha común: Salmo trutta