

CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA Y FISICOQUIMICA DE LOS
ANTICUERPOS SERICOS DE BAJO PESO MOLECULAR DE *Octodon lunatus*

Tesis
presentada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas con mención en
Biología Celular
Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

por

MARIA EUGENIA CIFUENTES SOZA

Director de Tesis:

Dr. Alfredo De Ioannes I.
Laboratorio de Microbiología e Inmunología
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Profesor Patrocinante:

Dr. Tito Ureta
Laboratorio de Bioquímica
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

1 9 8 4



FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N

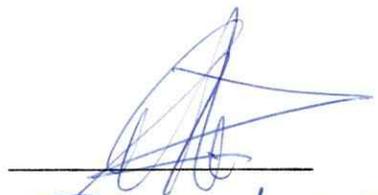
TESIS MAGISTER

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la tesis de Magister presentada por la candidata:

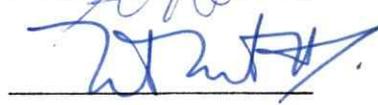
MARIA EUGENIA CIFUENTES SOZA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Biología Celular.

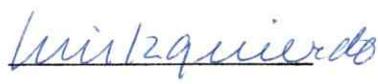
Director de Tesis:
Dr. Alfredo De Ioannes



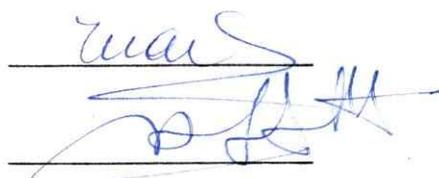
Patrocinante de Tesis:
Dr. Tito Ureta



Comisión Informante:
Dr. Luis Izquierdo



Prof. Antonieta Valenzuela



Dr. Mario Roseblatt

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo quiero dar las gracias a todos aquellos que de alguna manera me ayudaron a lograrlo:

Al Dr. Alfredo De Ioannes, quien además de jefe ha sabido ser amigo de todos los que hemos trabajado con él, le agradezco su interés y los valiosos consejos que guiaron mis primeros pasos por la Ciencia y que seguro seguirán haciéndolo.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología: a Leo, Daniza, Malena, Lisette, Macarena, por su amistad y por hacer del Laboratorio un lugar de trabajo grato y estimulante; a María Inés le agradezco además, su cooperación en la etapa "sanguinaria" del trabajo y, especialmente a Beltrán por estar conmigo cada vez que lo necesité, dándome ánimo y compañía.

A mis amigos del Laboratorio de Fisiología: Jaime, Inés y Pilar, por su apoyo incondicional, tanto moral como "logístico".

En forma muy especial a mi familia, por su apoyo y comprensión en todo momento y además, por su compañía y ayuda en los "safaris" a Punta de Tralca.

INDICE

	pág.
AGRADECIMIENTOS	i
INDICE	ii
RESUMEN	v
ABSTRACT	IX
ABREVIATURAS	XIII
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	18
Materiales	18
Animales	18
Reactivos	18
Varios	19
Equipos	20
Métodos	21
I SANGRADO Y OBTENCION DEL SUERO DE <i>O. lunatus</i>	21
II INMUNIZACION DE LOS ANIMALES	21
Inmunización de <i>O. lunatus</i> con Hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>	21
III FRACCIONAMIENTO DEL SUERO	22
Fraccionamiento en columna Proteína A-Sepharose 4B	22
Fraccionamiento y estimación de pe- sos moleculares por filtración de gel	23
Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel	24
Separación de cadenas peptídicas com- ponentes de las Igs por filtración en Sephacryl S-200/SDS	24

IV	PRODUCCION DE FRAGMENTOS POR DEGRADACION ENZIMATICA DE Igs	26
	Digestión con papaína	26
	Separación de los fragmentos papaínicos principales	27
	Determinación de actividad de los fragmentos papaínicos	27
V	ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD INMUNO LOGICA Y SUS FRAGMENTOS	28
	Electroforesis en geles de poli acrilamida en presencia de SDS	28
	Estimación de pesos moleculares en sistema PAGE-SDS	29
VI	TECNICAS INMUNOLOGICAS	30
	Determinación de actividad por ELISA	30
	Inmunolectroforesis simple	31
	Inmunolectroforesis bidimensional ..	32
	Hemaglutinación pasiva	34
VII	SECUENCIACION POR EL EXTREMO AMINO- TERMINAL DE LAS PROTEINAS	35
	Secuenciación manual de la región aminoterminal	35
	Determinación de residuos amino- terminales	36
 RESULTADOS		
1.	Inmunización de <i>O. lunatus</i> con Hemocianina de Conchole pas concholepas	38

2.	Fraccionamiento del suero por cromatografía de afinidad en columna. Prot. A-Sephrose.	38
3.	Inmunolectroforesis simple y bidimensional	41
4.	Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel	45
5.	Estimación de pesos moleculares de fracción Prot. A ⁺ por filtración en gel	47
6.	Análisis de la composición polipeptídica de la fracción Prot. A ⁺ por PAGE-SDS	47
7.	Estimación de pesos moleculares de cadenas H y L en sistema PAGE-SDS	49
8.	Análisis de la secuenciación aminoterminal	49
9.	Digestión con papaína	54
10.	Filtración en gel de los fragmentos papaínicos	54
	DISCUSION	59
	CONCLUSIONES	69
	BIBLIOGRAFIA	71

RESUMEN

La aparición de inmunoglobulinas (Igs), físico-química y antigénicamente distintas a IgM y que puedan clasificarse como IgG (similar a IgG humana), ocurre sólo en mamíferos. Más aún, la presencia de subclases de IgG en el suero de mamíferos, es un evento evolutivamente muy reciente y por lo tanto, puede ser un buen modelo para estudiar la evolución de una familia tan compleja de proteínas como son las Igs.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar físico-química y antigénicamente la fracción correspondiente a Igs del tipo G presentes en el suero de roedores de la especie *Octodon lunatus*, y además compararlas con las de otras especies de mamíferos.

El primer paso fue inducir un suero inmune en estos roedores mediante inmunización con Hemocianina de loco (*Concholepas concholepas*). Los animales presentaron luego de inmunización secundaria y terciaria, altos títulos de anticuerpo anti-Hemocianina, medidos por ELISA (enzimainmunoensayo en fase sólida), $1/2^9$ y $1/2^{12}$ respectivamente.

La cromatografía de afinidad en columna de Proteína A-Sepharose del suero, permitió fraccionarlo en

dos componentes: i) La fracción Prot. A⁻, que fue excluida de la columna y que contiene la mayor parte de las proteínas del suero y, ii) la fracción Prot. A⁺, absorbida específicamente a la columna desde donde fue eluida a un pH cercano a 4,3.

Esta fracción es la principal responsable de la actividad anti-Hemocianina y representa un 18% de las proteínas séricas totales.

El análisis inmunolectroforético de la fracción Prot. A⁺ mostró dos arcos de inmunoprecipitación que indican identidad antigénica parcial entre al menos 2 poblaciones de moléculas. Estas poblaciones no pudieron ser separadas mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel y no mostraron heterogeneidad en cuanto a su peso molecular, estimado en 160 kD por cromatografía en Sephacryl S-300.

Se analizó la composición peptídica de las proteínas de la fracción Prot. A⁺ mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y filtración en Sephacryl S-200, en condiciones disociantes y reductoras, lo que mostró la presencia de dos péptidos, H y L, con pesos moleculares estimados en 55 y 27 kD respectivamente, unidos covalentemente.

Por otro lado, se determinó la secuencia aminoterminal de las cadenas H, mediante degradación

sustractiva de Edman. En la primera posición se detectaron dos aminoácidos, GLU y ASP, mientras que en la segunda posición se encontró sólo VAL. Esto sugiere la presencia de más de un subgrupo para las regiones V_H .

La degradación con papaína, en ausencia del L-CYS, de la IgG de estos animales, mostró dos tipos principales de fragmentos, $F(ab')_2$ y Fab que fueron visualizados por electroforesis en condiciones no reductoras y separados mediante filtración en Sephadex G-100; ambos métodos permitieron estimar sus pesos moleculares en 100 y 50 kD respectivamente. Ambos fragmentos mantienen su capacidad de unir hemocianina en ELISA, sin embargo, difieren en su valencia, como se deduce de que sólo el de ~100 kD fue capaz de aglutinar glóbulos rojos de oveja sensibilizados con Hemocianina, así éste sería bivalente, mientras que el de ~50 kD sería univalente. La observación de estos dos tipos de fragmentos, implica que hay dos sitios de corte por papaína en la población de proteínas de la fracción Prot. A⁺.

Todos estos resultados apuntan a que la fracción del suero de *O. lunatus*, que es Prot. A⁺, corresponde a inmunoglobulinas del tipo G, con una heterogeneidad tal que puede ser el reflejo de al menos dos

poblaciones de moléculas. Estas poblaciones no han po
dido ser aisladas y representarían subclases de IgG, o
formas alélicas de la inmunoglobulina.

ABSTRACT

The appearance of an immunoglobulin physico-chemically and antigenically different from IgM, which could be classified as IgG (human IgG-like), occurs only in mammals. Moreover, the presence of IgG subclasses in mammalian serum is a recent evolutionary event. Therefore, they could be a good model for studying the evolution of such a complex family of proteins as immunoglobulins.

The purpose of this work was to characterize both physicochemically and antigenically the fraction of the serum corresponding to IgG-like immunoglobulins present in the serum of the rodent species *Octodon lunatus*, and to compare it with those found in other mammalian species.

The first step was to induce an immune serum in the rodent through immunization with *Concholepas concholepas* Hemocyanin. The animals showed after secondary and tertiary immunization, high titres of anti-Hemocyanin antibodies, $1/2^9$ and $1/2^{12}$ respectively, measured by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Affinity chromatography of the serum with Protein A⁻- Sepharose column allowed to separate it into two components: i) the protein A⁻ fraction, which was excluded from the column and which contains most of the serum protein; and ii) the protein A⁺ fraction specifically bound to the column which was eluted to a pH of about 4.3. The latter fraction is the main responsible for the anti-Hemocyanin serum activity and represents 18% of the whole serum proteins.

Immuno-electrophoretic analysis of the protein A⁺ fraction showed two immunoprecipitation arcs, indicating partial antigenic identity between at least two populations of molecules. These populations could not be separated through ion-exchange chromatography in DEAE-Sephacel and they did not show heterogeneity as for their molecular weight, which was estimated at 160 kD by means of Sephacryl S-300 chromatography.

The polypeptidic composition of protein A⁺ fraction proteins was analyzed by means of polyacrilamide gel electrophoresis and Sephacryl S-200 filtration, under denaturing and reducing conditions, which disclosed the presence of two peptides, H and L, with estimated molecular weights of 55 kD and 28 kD, respectively, held together by covalent bonds.

On the other hand, the aminoterminal sequence of the H chain was determined by Edman's subtractive degradation. On the first position, two aminoacids, Glu and Asp, were detected, whereas only Val was obtained on the second position. This suggests more than one subgroup for the V_H regions.

IgG papain digestion in the absence of L-Cys showed two main types of fragments, $F(ab')_2$ and Fab, which were seen by electrophoresis, without reducing agents; they were separated by filtration through Sephadex G-100. The two methods allowed to estimate the $F(ab')_2$ and Fab molecular weights at 100 kD and 50 kD respectively. Both fragments maintain their capacity of binding Hemocyanin at ELISA; however, they differ in their valence, as evidenced by the ability only shown by 100 kD fragments of agglutinating sheep blood cells sensitized with Hemocyanin; hence, these fragments would be bivalent, whereas 50 kD fragments would be monovalent. Observation of the two kinds of fragments would mean two papain cleavage sites in the pool of Protein A⁺ fraction proteins.

These findings suggest that the Protein A⁺ serum fraction proteins of *O. lunatus* are IgG-like proteins whose heterogeneity would imply at least two populations of molecules, which so far have not been

isolated. These groups of proteins would represent IgG subclasses or allotypes of the immunoglobulin.

ABREVIATURAS USADAS

Ag	: Antígeno
Dansil	: 5-dimetilaminonaftalen 1-sulfonil
DEAE	: Dietil-amino-etil
Dns-Aa	: Derivado aminoacídico dansilado
Dns-Cl	: Cloruro de dansilo
EDTA	: Etilendiaminotetraacetato de sodio
ELISA	: Enzima inmuno ensayo en fase sólida
GRO	: Glóbulos rojos de oveja
Hc	: Hemocianina de loco (<i>Concholepas concholepas</i>)
Ig(s)	: Inmunoglobulina(s)
kD	: 10^3 daltons
PAGE-SDS	: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio 0,1%
PBS	: Tampón fosfato salino
PITC	: Fenilisotiocianato
PM	: Peso molecular
Prot. A	: Proteína A
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
TCA	: Acido tricloroacético
TEMED	: N,N,N',N', tetrametilendiamina

TFA : Acido trifluoroacético
Tris : Tris(hidroximetil)aminometano

INTRODUCCION

La respuesta inmune constituye un importante proceso adaptativo que contribuye a reconocer lo propio y rechazar lo extraño, defendiendo al organismo del ataque de microorganismos o toxinas secretadas por ellos y también de la proliferación de células neoplásicas (1).

En vertebrados, la respuesta inmune posee 3 características fundamentales que son: la especificidad, que le permite distinguir antígenos cercanamente relacionados; la multiplicidad, o capacidad de responder a un número casi ilimitado de antígenos; y memoria, propiedad que se refleja en una respuesta más rápida y efectiva a una segunda exposición al mismo antígeno.

Los mecanismos por los cuales se llevan a cabo las funciones de reconocimiento y eliminación del antígeno están mediados por la interacción de las células que conforman el sistema inmune y que son los linfocitos T, B y células accesorias. De esta manera, la entrada de un antígeno al organismo desencadena la diferenciación de células específicas del antígeno, los linfocitos T encargados de la respuesta inmune celular y de la regulación de la respuesta inmune humoral, y los linfocitos B encargados de síntesis de anticuerpos capaces, simultáneamente,

de unirse al antígeno y por sus funciones efectoras promover la eliminación de él, por medio de las células accesorias. Estos anticuerpos pertenecen al grupo de proteínas conocidas como inmunoglobulinas (Igs).

Una característica distintiva de la respuesta inmune humoral es su alta heterogeneidad aún ante el estímulo de antígenos simples (2). Esta característica hace difícil la interpretación de los resultados de estudios tanto a nivel celular como molecular. Sin embargo, la disponibilidad de Igs homogéneas producidas por células de mieloma - un cáncer de células productoras de anticuerpo o hibridomas, ha permitido un mayor desarrollo de la investigación en cuanto a la estructura, genética y evolución de las Igs.

Así se ha descrito que la unidad estructural de las Igs, que se ha mantenido con variaciones muy pequeñas a través de la evolución, es una molécula glicoprotéica de aproximadamente 150 kD, compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas: dos de ellas livianas (L) de 23 kD y dos pesadas (H) de 50 kD. Cada cadena L está unida a una cadena H por un puente disulfuro y por enlaces no covalentes, a su vez las cadenas H están unidas entre sí por enlaces disulfuro en una región denominada región de la *ing*. La interacción entre cada par de cadenas H y L conforma, en sus extremos N-terminales, el sitio de unión de antígeno (3). (Fig. 1).

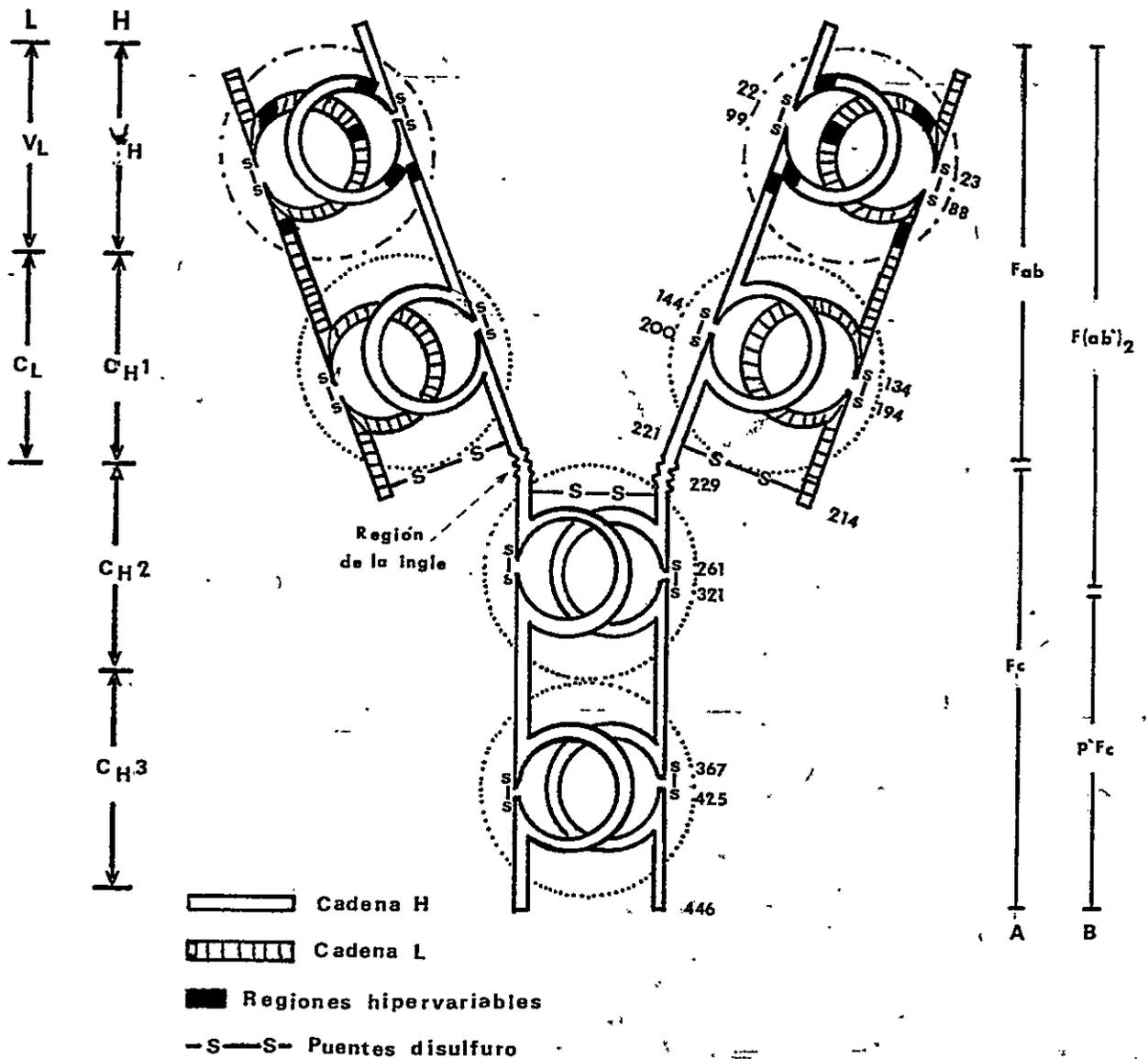


FIGURA 1. Unidad estructural básica de las Igs (IgG conejo).

Al lado izquierdo de la Figura se señala la nomenclatura de dominios de la IgG y al lado derecho A y B señalan los fragmentos producidos por la digestión enzimática con papaína y pepsina, respectivamente.

Las cadenas polipeptídicas componentes de las Igs se pueden dividir en base a su composición antigénica, así se han descrito dos tipos de cadenas L (κ y λ) y en mamíferos superiores cinco tipos de cadenas H ($\mu, \gamma, \delta, \epsilon$ y α). Estas últimas determinan la existencia de cinco clases y varias subclases de Igs, con propiedades físicoquímicas y funciones efectoras diferentes (isotipos) (4).

Estudios de secuencia de aminoácidos de cadenas L de mieloma, mostraron que la mitad N-terminal variaba notablemente de una molécula a otra, en cambio la mitad C-terminal tenía una secuencia con variabilidad restringida para las Igs de la misma clase. Estas regiones fueron llamadas V_L y C_L respectivamente, siendo cada una de aproximadamente 110 aminoácidos. Igualmente para cadenas H se describe una región variable V_H , que comprende los 110 residuos aminoterminales y una región constante, C_H , de una longitud aproximadamente 3 veces mayor que la región C_L . Dentro de las regiones V_H y V_L se han descrito además, zonas de mayor variabilidad, las regiones hipervariables, Hv , y entre ellas zonas de menor variabilidad o zonas de marco, FR. Las primeras son las que tendrían interacción directa con Ag, mientras que las segundas estarían involucradas en la mantención de la estructura del sitio de combinación (1).

En base a comparaciones de estructura primaria dentro de las cadenas H y L, se han distinguido unidades de homología o dominios, con secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional similares. Cada una de estas unidades es de 110 aminoácidos, incluye un enlace disulfuro intracatenario y está plegada formando un dominio globular. Se describen entonces, los dominios variables que corresponden a las regiones V_H y V_L y los dominios constantes formados por las regiones C_L y tres subregiones de la región C_H , designadas C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} para el caso de IgG (5,6).

Es en estos dominios donde se encuentran distribuidas las dos funciones primordiales de la molécula de anticuerpo: reconocimiento del Ag, mediado por los dominios V y las funciones efectoras (tal como fijación de complemento y opsonización) que llevan a su eliminación, mediados por los dominios C (7). Así, la estructura tridimensional es un reflejo de la dualidad funcional de éstas moléculas.

Por otro lado, la organización de las familias de genes de anticuerpo, también refleja esta dualidad funcional. Estas familias de genes deben ser capaces de almacenar y generar información para posiblemente millones de moléculas diferentes de anticuerpo.

A estas familias de genes se las ha definido como familias multigénicas, pues exhiben cuatro

propiedades fundamentales: multiplicidad, ligazón estrecha, homología de secuencia y funciones fenotípicas relacionadas o superpuestas de sus productos. Además de estas características, las familias multigénicas comparten un rasgo evolutivo original: la selección natural parece operar sobre ellas como un todo y no sobre miembros genéticos individuales. (8). Ejemplo de otras familias multigénicas son las de los genes rRNA, genes de histonas, genes tRNA y aún las secuencias simples que codifican para DNA satélite (8).

La formulación de modelos que expliquen la organización de estas familias de genes ha sido posible gracias a la tecnología de enzimas de restricción y DNA recombinante. Estos estudios se han hecho principalmente en ratones, pero estudios recientes en otros mamíferos han confirmado la universalidad de los principios básicos (9).

De esta forma se describe que las cadenas de Ig están codificadas en tres familias génicas separadas: la de los genes para cadena L tipo k, la de los genes para cadena L tipo λ , y la de los genes de cadena H.

Cada una de estas familias está formada por al menos 3 grupos de genes (10, 11). Las cadenas L están codificadas por los segmentos génicos V_L (variable), J_L (unión) y C_L (constante), mientras que las cadenas

H lo están por los segmentos génicos V_H , D (diversidad), J_H y C_H el que a su vez está subdividido en el ratón por los genes C_{μ} , C_{δ} , C_{γ_3} , C_{γ_1} , $C_{\gamma_{2b}}$, $C_{\gamma_{2a}}$, C_{ϵ} y C_{α} , que codifican para las distintas clases de Igs. Estos segmentos génicos están separados por DNA de intervención en el genoma de células indiferenciadas desde el punto de vista de la expresión de genes de anticuerpo (12), (Fig. 2).

Durante la diferenciación de las células productoras de anticuerpos o linfocitos B, ocurren dos tipos de rearrreglo a nivel del DNA (13,14). Primero, se unen los segmentos V_L y J_L ó V_H , D y J_H para generar una secuencia codificadora contigua, para las regiones variables de las cadenas L ó H respectivamente. Este proceso es llamado "unión V(D)J" y restringe cada clon de células B a una especificidad.

Para la expresión de los genes así rearrreglados, se transcriben tanto las regiones codificadoras como las secuencias de intervención entre los segmentos génicos J_L y C_L ó J_H y C_{μ} , en un transcripto nuclear de alto peso molecular, siendo luego removidas las regiones de intervención para producir un mRNA de cadena L con los segmentos V_L , J_L y C_L contiguos e igualmente los segmentos V_H , D, J_H y C_{μ} en un mRNA para cadena H tipo μ .

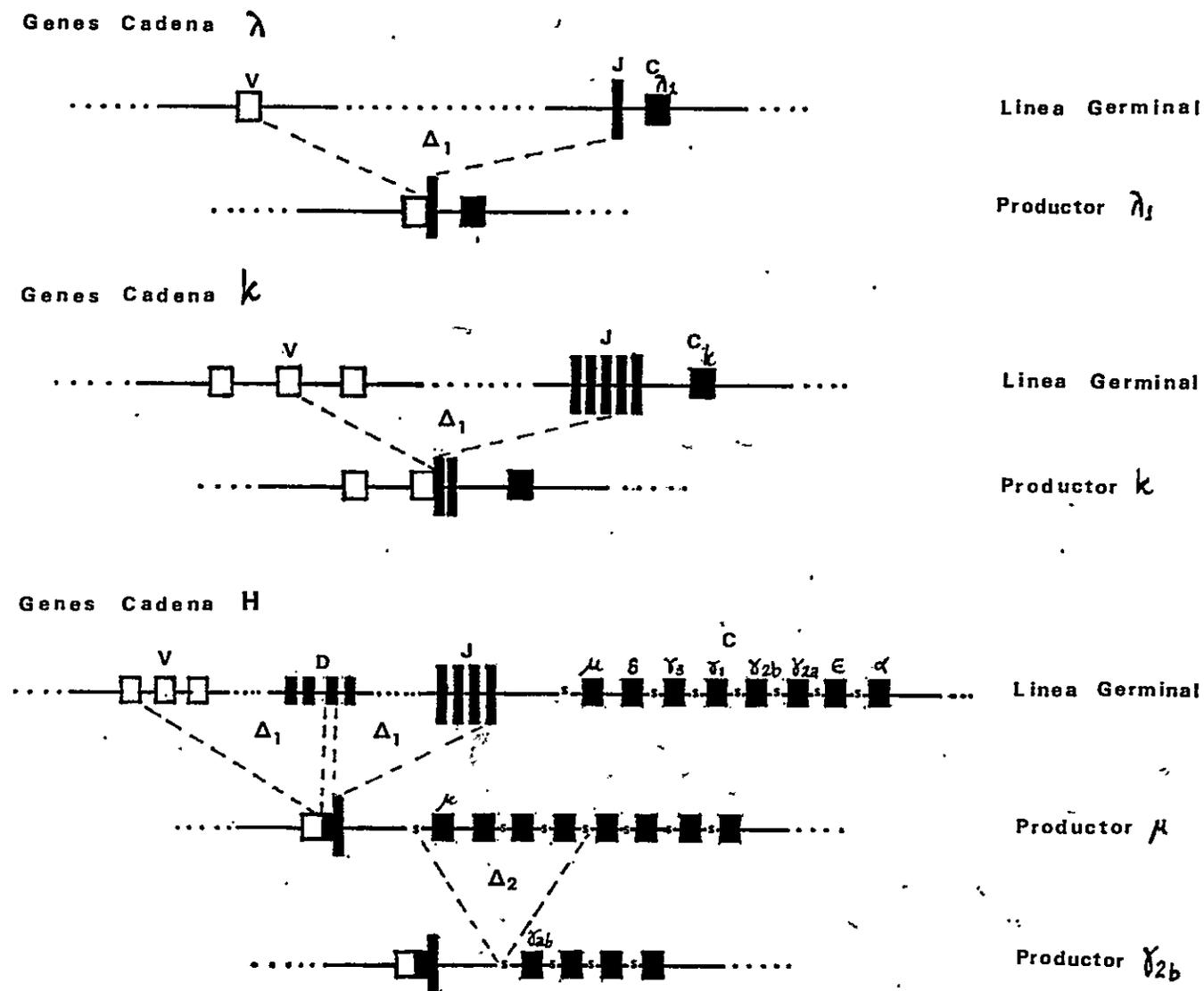


FIGURA 2. Estructura de las familias de genes de anticuerpo. Δ_1 Y Δ_2 indican rearreglo de V(D)J y "switch" de clases respectivamente.

El segundo rearrreglo de DNA es conocido como "switch de clases", ocurre en la región C_H y permite que un clon de linfocitos cambie la clase de Ig que expresa, manteniendo la misma región variable y por lo tanto, la misma especificidad. Este proceso implica la unión de la región V(D)J con distintos genes C_H provocada por la delección del DNA entre las regiones 5' ó regiones S de cada gen involucrado (15).

Además de los dos procesos de rearrreglo de DNA descritos, existe un fenómeno denominado exclusión alélica, debido al cual cada célula productora de anticuerpo expresa solo un alelo de cadena H y uno de cadena L. La suma de estos mecanismos determina que cada linfocito exprese, a partir de una familia multigénica, un producto génico único, con un sitio de unión de Ag específico que puede estar asociado a diferentes funciones efectoras o regiones C_H .

Otro punto de vista que resulta interesante analizar, es el evolutivo. Lo cual implica estudios tanto a nivel de estructura de Igs en especies filogenéticamente relevantes, como estudios comparativos a nivel de secuencia de aminoácidos y de DNA, entre clases de Igs, principalmente murinas y humanas.

Así, dada la alta homología en la secuencia de aminoácidos tanto intra como inter cadenas, se ha

formulado un modelo tentativo para explicar el origen genético de las Igs (16) (Fig. 3).

De acuerdo a él, se postula un gen primordial que codificaba para una molécula de aproximadamente 110 aminoácidos, el cual luego de sufrir una duplicación dio origen a los segmentos V y C ancestrales. Posteriormente, a través de mecanismos tales como duplicación génica, translocación, crossing-over dispar homólogo, etc., habría generado las familias multigénicas para las Igs que ya han sido descritas.

Este modelo se ve apoyado por la organización de exones e intrones encontrados para los genes C_H , de modo que los segmentos que codifican para los dominios de la región constante y para la región de la inglete, están separados por secuencias de intervención en cada gen C_H (17,18).

Estudios comparativos de secuencia de nucleótidos de dominios de genes C_H , muestran gran similitud entre distintas cadenas, lo que implicaría que los dominios de los distintos genes evolucionaron durante la misma época. Por lo tanto, los genes para las distintas clases parecen haber divergido después de establecida la estructura multidominios (19).

Estas conclusiones se apoyan los resultados obtenidos de análisis de estructura de Igs bajo una perspectiva filogenética.

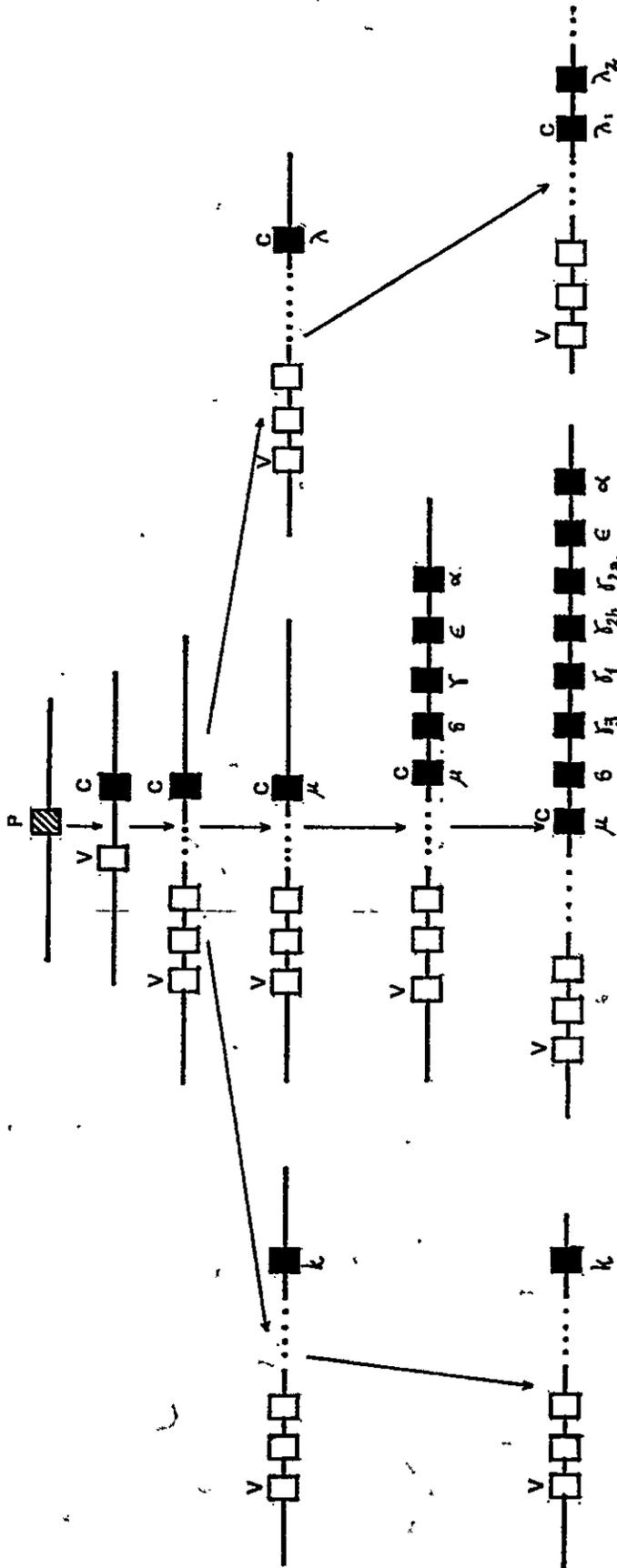


FIGURA 3. Esquema hipotético del origen de las Igs.

Se postula un gen primordial P que por eventos de duplicación génica dio origen a los genes V y C ancestrales. Los que a su vez, mediante eventos tales como duplicación génica, traslocación, crossing over dispar, habrían generado las familias multigénicas para anticuerpos existentes en la actualidad. El modelo usado para esta representación corresponde a las de las Igs de ratón.

Cabe señalar aquí, que en cualquier estudio de este tipo, las especies analizadas son contemporáneas y que sólo se puede suponer que aquellas que llamamos "arcaicas" conservan algunas características de sus ancestro; por lo tanto, las conclusiones que se obtienen, poseen un cierto grado de incertidumbre.

Los análisis de la estructura de las Igs en el curso de la evolución, muestran por un lado que la capacidad de los organismos de responder ante un antígeno produciendo Igs, aparece sólo en los vertebrados y por otro, indican un aumento de la complejidad de ellas expresado como aumento de las clases y subclases de Igs y probablemente con aumento de la diversidad de genes (Fig. 3).

La asignación de una Ig de un vertebrado inferior a una clase particular, se ha hecho por comparación con homólogos de mamíferos o más específicamente con Igs humanas, en base a peso molecular y composición polipeptídica y funciones efectoras. Idealmente, esta asignación debería basarse además en la secuencia de aminoácidos; sin embargo, son muy limitados los datos relevantes en especies distintas de mamíferos.

La información disponible hasta aquí, ha sido extensamente revisada (20) y puede resumirse como sigue:

- La primera clase de Ig sérica que aparece tanto en la ontogenia como en la filogenia de la respuesta inmune

humoral, corresponde a IgM, una Ig pentamérica.

- Ya en Condroictios y Actinopterigios hay dos especies moleculares de Igs séricas, las cuales se diferencian en peso molecular pero son antigénicamente idénticas.
- Las especies más primitivas en cuyo suero se ha demostrado la presencia de dos clases de Igs con PM y propiedades antigénicas diferentes, son los peces pulmonados (dipnoos), representantes de los Sarcopterigios.
- En Anfibios y Reptiles la existencia de dos clases de Igs ya es clara, aún cuando la de menor peso molecular no puede clasificarse como IgG propiamente tal.
- En Aves se describe la aparición de una Ig similar a una IgA de mamíferos.
- En mamíferos inferiores como los monotremas, se describe por primera vez una Ig de tipo G propiamente tal.
- Encontrándose finalmente en Mamíferos superiores las 5 clases de Igs antigénica, fisicoquímica y funcionalmente diferentes: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, mencionadas anteriormente.

Si se centra la atención en las Igs de tipo G, se observa que sólo se han descrito en mamíferos desde los Monotremas en adelante (21), siendo de especial interés la aparición de subclases de IgG, evento muy reciente dada la alta homología entre ellas. Cabría esperar que ésto fuera un reflejo del grado de evolución de las distintas especies, es así como en conejo, paleontológicamente muy arcaico, se observa sólo una clase, en



cuy ya existen dos (22), mientras que grupos de roedores más recientes como ratón y rata y también el Hombre, poseen 4.

Las diferencias entre subclases de IgG, donde se destacan las diferencias en la región de la inglete en cuanto a posición y número de enlaces disulfuro intercatenarios, les confieren propiedades antigénicas funcionales diferentes (Tabla I), permitiéndoles así, que aún cuando se mantiene una cierta sobreposición de funciones exista mayor especialización, lo cual redundaría en una mejor adaptabilidad del organismo al medio.

El objetivo principal de esta Tesis es analizar la presencia de subclases de IgG en el suero de una especie de roedor que es endémica de Chile, *Octodon lunatus* y compararlas además, con las subclases de otras especies de mamíferos en cuanto a número y características fisicoquímicas y antigénicas.

El género *Octodon*, al que pertenece la especie en estudio, es paleontológicamente uno de los roedores caviomorfos sudamericanos más arcaicos (23) (Tabla II). Se supone que este grupo de roedores proviene de Norteamérica y que habrían llegado a Sudamérica en el Eoceno-Oligoceno, momento en que se supone los continentes ya se habrían separado encontrándose con un territorio lleno de nichos disponibles, los que les permitió gran radiación adaptativa.

TABLA I. ALGUNAS PROPIEDADES Y FUNCIONES DE SUBCLASES DE IGG DE VARIAS ESPECIES DE MAMIFEROS

PROPIEDADES Y FUNCIONES	Humanas			Ratón			Cuy		Conejo Igg
	IgG1	IgG2	IgG3 IgG4	IgG1	IgG2a	IgG2b IgG3	IgG1	IgG2	
Nº de enlaces S-S entre cadenas H	2	4	11 - 4	.3	3	3	∅	∅	1
Concentración en suero normal (mg/ml)	8	4	1 0,4	0,3	0,8-5	∅	0,1	0,3-1	5-10
Transmitida a través de la placenta	+	±	+	+	+	+	+	∅	+
Unión a macrófagos	++	+	++ ±	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Fijación de complemento (vía clásica)	++	+	++ -	-	+	+	-	-	+
Anafilaxis pasiva en la misma especie (homocitotrópico)	∅	∅	∅	+	-	-	-	+	∅
Anafilaxis pasiva en otra especie (heterocitotrópico)	+	-	+	+	+	+	∅	-	+

Nota: +, ++ : Indican presencia de la función con poca, media y alta actividad, respectivamente.
 - : Indica ausencia de la función.
 ∅ : Indica datos no disponibles.

TABLA II. CLASIFICACION TAXONOMICA DE DOS ORDENES DE MAMIFEROS

Orden: Lagomorfa

(conejo, liebre)

Orden: Rodentia

Sub-Orden: Caviomorfa

Superfamilia: Octodontoidea

Familia: Octodontidae

(Octodon, Spalacopus)

Familia: Abrocomidae

(Ratón chinchilla)

Superfamilia: Chinchilloidea

Familia: Chinchillidae

(Chinchilla)

Superfamilia: Caviioidea

Familia: Caviidae

*(Cuy)*Sub-Orden: ~~Miomorfa~~

Superfamilia: Muroidea

Familia: Cricetidae

(Hamster, Ratón ciervo)

Familia: Muridae

(Rata, ratón)

Dentro del género *Octodón* se han descrito 3 especies: *O. degus*, *O. bridgesi* y *O. lunatus*, siendo la principal diferencia entre ellos su ubicación geográfica. Mientras *O. degus* se ubica en la zona central, *O. bridgesi* está un poco más al sur, en la zona cordillerana y *O. lunatus* en la costa central (24).

Además de la importancia de este género desde un punto de vista filogenético, tienen la ventaja de que son animales que pueden ser mantenidos en cautiverio, bajo las mismas condiciones de cualquier animal de experimentación y pueden ser manipulados con relativa facilidad.

Inicialmente se proyectó trabajar con roedores de la especie *O. degus*, para los cuales ya se disponía de un suero anti-proteínas séricas totales en conejo, pero su captura se vio dificultada por la disminución de sus comunidades en el área Metropolitana. Por esta razón se trabajó con animales de la especie *O. lunatus*, los cuales están estrechamente relacionados a los de la especie *O. degus*, lo que se refleja en la dificultad de distinguirlos con certeza a través de los caracteres taxonómicos descritos. Además, los perfiles inmunolectroforéticos de las proteínas totales y de las fracciones de γ -globulinas, son similares a los encontrados para *O. lunatus*.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Animales

Los animales de la especie *Octodon lunatus*, todos pertenecientes a una misma comunidad, con pesos corporales que fluctuaban entre 80 y 160 gr fueron capturados en la localidad de Punta de Tralca, litoral central chileno ($33^{\circ} 25'$ latitud sur, $71^{\circ} 41'$ longitud oeste), por medio de trampas Sherman en las cercanías de las cuevas y caminos más transitados, como ya ha sido descrito (25).

Durante el desarrollo del trabajo, los animales fueron mantenidos en el vivero del Instituto de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Reactivos

Ayudante de Freund completo de Calbiochem, Los Angeles, California, USA. Sephacryl S-200, S-300 y Agarosas de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia.

Acrilamida, Bisacrilamida, Proteína A-Sepharose 4 B y p-nitrofenilfosfato, se compraron a Sigma Chemical Co. St. Louis, USA. Los reactivos y estándares empleados en técnicas de secuenciación, fueron todos Pierce Sequential Grade, excepto los solventes orgánicos de grado pro-análisis fabricados por Merck, Darmstadt, Alemania. Todos los otros reactivos de grado analítico fueron provistos por Merck y Sigma Chemical Co.

Antisueros

Antisuero contra proteínas séricas totales de *Octodon degus* fue preparado en conejo en el Laboratorio de Inmunología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, y usado en lugar de un antisuero contra proteínas séricas de *O. lunatus*, que dada la escasez de material no logró ser inducido.

Varios

Placas de poliamida de Cheng Ching Trading Co. Taipei, Taiwan. Placas de polivinilo compradas a Dynatech Lab. Inc. Bolsas de diálisis de 6 mm. que excluye proteínas de peso molecular menor de 12 kD fueron compradas a A.H. Thomas, Filadelfia, USA.

Equipos

- Colector de fracciones automático LKB (Ultrorac 700), provisto de bomba peristáltica Gilson minipuls 2.
- Columnas de vidrio borosilicato con adaptadores de Pharmacia Fine Chemicals.
- Espectrofotómetro Shimadzu de doble haz, Modelo UV 150-02.
- Cámara electroforética Charlin, para inmunoelectroforesis.
- Cámara para electroforesis vertical en placas construida en el Laboratorio.
- Lámpara de luz UV mineralógica de onda corta, Ultra Violet Product Inc., Modelo UVS-54.

METODOS

I. SANGRADO Y OBTENCION DEL SUERO DE *O. lunatus*

Debido a la rapidéz de coagulación que presentan estos animales, el sangrado a blanco se hizo especialmente difícil. Por ello, después de anestesiar al animal se procedió en forma secuencial a extraer sangre por el ojo, mediante pipeta Pasteur; luego extracción por arteria abdominal y finalmente punción cardíaca, ex trayendo en cada etapa el máximo posible.

Así, se obtuvo un volumen promedio de 4 ml de sangre, la cual se dejó coagular a 4°C durante la noche y luego se centrifugó a 500 g por 15 min, se aspiró el máximo de suero y se volvió a centrifugar a 12000 g por 20 minutos.

Este suero se guardó con azida sódica 0,2% a 4°C.

II. INMUNIZACION DE LOS ANIMALES

Inmunización de *Octodon lunatus* con hemocianina de loco (*Concholepas concholepas*)

Los animales fueron inmunizados para identificar las fracciones séricas que contenían anticuerpos, de acuerdo al siguiente protocolo de inmunización.

Día 0 : (1a. dosis): 400 µg de hemocianina (Hc) emulsionada con Adyuvante de Freund completo, vía subcutánea.

- Día 15 : (2a. dosis): 400 µg de Hc emulsionada con Adyuvante de Freund incompleto, vía intramuscular.
- Día 28 : Extracción de sangre por el ojo mediante pipeta Pasteur, para determinar título de anticuerpo.
- Día 30 : (3a. dosis, inyección de refuerzo): 400 µg de Hc sin Adyuvante, vía intramuscular.
- Día 40 : Sangrado a blanco.

III. FRACCIONAMIENTO DEL SUERO

Fraccionamiento en columna de Proteína A-Sepharose

4B. (26)

Alícuotas de hasta 1,5 ml del suero ajustado a pH 8 fueron aplicadas a una columna de 9 ml de Prot. A-Sepharose, equilibrada en PBS pH 8. La cromatografía se realizó a un flujo descendente de 10 ml/hr recolectando fracciones de 1 ml mediante colector automático.

Luego de pasar la muestra se lavó la columna con PBS pH 8 y se eluyó con una gradiente lineal entre pH 5,5 y pH 2,7 en Tampón Citrato 0,1 M (50 ml por lado). Las fracciones de eluido fueron neutralizadas rápidamente a pH cercano a 7 con Tris 1 M.

El perfil de elución se determinó espectrofotométricamente a 280 nm.

Se juntaron las fracciones de cada pico, se llevaron a volumen inicial mediante diálisis por presión negativa, se dializaron contra PBS y se guardaron congeladas.

Fraccionamiento y estimación de pesos moleculares por filtración en gel.

Para estimar los pesos moleculares de las proteínas obtenidas en la elución de la columna de Prot. A-Sepharose, se utilizó una columna de Sephacryl S - 300 (130 cm x 0,9 cm) equilibrada con Tampón S-200 (NaCl 0,5 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Azida sódica 0,02% ajustada a pH 7 con HCl) a la cual fueron aplicadas alícuotas de 1 ml que contienen aproximadamente 2 mg/ml de proteína.

Para el caso de la fracción Prot. A⁻, antes de la cromatografía, se precipitó con igual volumen de solución de Sulfato de Amonio saturado (4,7 M), se dejó a 4°C durante la noche, se lavó tres veces con Sol. Sulfato de amonio 50% y se resuspendió el precipitado en el Tampón de la columna.

Se usó un flujo descendente de 10 ml/hr y se recolectaron fracciones de 2 ml de eluido por tubo, mediante colector automático. El perfil de elución se determinó espectrofotométricamente a 280 nm.

Bajo estas mismas condiciones se cromatografía ron proteínas de peso molecular conocido: IgM (960 kD), IgG (150 kD), Ovoalbúmina (45 kD) y Citocromo C (11,7 kD). Con ellas se construyó la curva de calibración Volumen de elución vs LN peso molecular, donde se extra poló el peso molecular de las muestras problema.

Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel
Alícuotas que contenían 5 mg de proteína fueron dializadas exhaustivamente contra Tampón Tris 20 mM-NaCl 20 mM pH 7,9 y aplicadas a una columna de 3 ml de DEAE - Sephacel equilibrada en el mismo Tampón.

La cromatografía se realizó a un flujo descendente de 10 ml/hr; se lavó con Tris 20 mM-NaCl 20 mM pH 7,9 y se eluyeron las proteínas retenidas en la columna mediante un gradiente de fuerza iónica desde 20 mM a 400 mM de NaCl en Tris 20 mM pH 7,9. Se colectaron fracciones de 1 ml, las que se sometieron a lectura es pectrofotométrica a 280 nm, para determinar el perfil de elución de proteínas, a lectura de conductividad para de terminar la concentración de NaCl equivalente.

Este método es el descrito para IgG ratón (27)

Separación de cadenas peptídicas componentes de las Igs por filtración en Sephacryl S-200/SDS:

Para ésto se carboximetilaron las muestras obte nidas de la columna Sephacryl S-300, de acuerdo al

método descrito por Crestfield y col. (28), en el cual 5 mg de proteínas fueron, primero reducidos totalmente con 2-Mercaptoetanol 0,12 M en presencia de Urea 8 M, EDTA 0,2% en Tampón Tris 0,375 M - HCl pH 8,6 bajo atmósfera de N₂ por 4 hr a temperatura ambiente. Y luego, alquilados en oscuridad con ácido Iodoacético neutralizado con NaOH 1 N por 15 minutos. Mediante diálisis exhaustiva a 4°C contra agua destilada, se eliminaron el ácido Iodoacético y el exceso de reactivos, para ser posteriormente concentrados por liofilización.

Más o menos 5 mg de esta proteína carboximetilada fueron disueltas en 1-2 ml de Tampón S-200/SDS (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%, Azida sódica 0,02% ajustado a pH 6,8 con HCl) y se les agregó SDS hasta una concentración 4 veces la cantidad de proteína y 100 µl de 2-Mercaptoetanol. Se calentó a 100°C por 2-3 min en baño de agua y luego se dializó contra Tampón S-200/SDS.

La muestra así preparada se aplicó a una columna de Sephacryl S-200 (240 x 1,6 cm), equilibrada con Tampón S-200/SDS. La cromatografía se realizó a un flujo ascendente de 5-6 ml/hr recogiendo fracciones de 2,6 ml por tubo. El perfil de elución se determinó por lectura espectrofotométrica a 280 nm.

IV. PRODUCCION DE FRAGMENTOS POR DEGRADACION ENZIMATICA DE INMUNOGLOBULINAS

Digestión con papaína

La degradación con papaína se realizó de acuerdo a un método desarrollado para IgG₁ de ratón (29), que se diferencia del método tradicional de Porter (30) en que no se utiliza cisteína en el medio de reacción, sino que la papaína se activa previamente y luego se hace reaccionar con la proteína; esto tiene la ventaja de que se evita el paso de F(ab')₂ a Fab por reducción con la cisteína directamente.

Así, el procedimiento consistió en preactivar la papaína en 1 ml de Tampón Acetato 0,1 M que contenía EDTA 3 mM y cisteína 50 mM pH 5,5 incubando por 30 min a 37°C, luego se retiró la cisteína filtrando en una columna de Sephadex G-25 superfino (20 cm x 1 cm) equilibrada a T° ambiente con Tampón Acetato 0,1 M con EDTA 3 mM pH 5,5. Se colectaron fracciones de 1 ml que se leyeron espectrofotométricamente a 280 nm. De estas fracciones se eligió la de mayor concentración para realizar la digestión, la cual se llevó a cabo en una razón enzima : sustrato de 10% (p/p), con una concentración aproximada de 10 mg/ml de Ig. La mezcla de reacción se incubó 9 hr a 37°C, bajo N₂. Transcurrido

ese tiempo se volvió a agregar la misma cantidad de papaína, incubando otras 9 horas. Se detuvo la reacción agregando Iodoacetamida hasta una concentración de 30 mM.

El análisis de los fragmentos papaínicos se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente lineal entre el 11% y el 20%, en condiciones no reductoras.

Separación de los fragmentos papaínicos principales

La purificación de estos fragmentos se realizó mediante cromatografía en columna de Sephadex G-100 (150 cm x 0,9 cm), equilibradas en PBS pH 7,4 a un flujo de 5 ml/hr, colectando fracciones de 1 ml. El perfil de elución se determinó por lectura espectrofotométrica a 280 nm ó 230 nm para aumentar la sensibilidad cuando había baja concentración de proteínas.

Determinación de actividad de los fragmentos papaínicos

La determinación de actividad anti-Hc de los fragmentos se realizó mediante ELISA y paralelamente mediante hemaglutinación pasiva de glóbulos rojos de oveja sensibilizados con Hc. Ambas mediciones de actividad se realizaron tomando alícuotas de las fracciones

eluidas de la columna de Sephadex G-100.

VI. ANALISIS ELECTROFORETICOS DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD INMUNOLOGICA Y SUS FRAGMENTOS

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

Se usó el sistema descrito por Laemli y Favre (31), con algunas modificaciones. El gel separador estaba compuesto de poliacrilamida cuya concentración variaba linealmente entre un 20% en el extremo inferior hasta un 11% en la superficie SDS 0,1%, TEMED 0,05%, Perulfato de Amonio 0,05% en Tris 0,375 M-HCl pH 8,8. Una vez polimerizado el gel bajo Isobutanol saturado en agua, se depositó el gel concentrador que está compuesto por poliacrilamida al 3% con SDS 0,1%, TEMED 0,1%, Perulfato de Amonio 0,03% en Tris 0,0125 M - HCl pH 6,8.

El sistema para la construcción de la gradiente lineal de poliacrilamida (20 ml x lado), estaba compuesto por 2 vasos - sumergidos en hielo para retardar la polimerización - conectados por un tubo de plástico flexible. Uno de los vasos estaba conectado a una bomba peristáltica, que impulsaba la solución mezclada por un agitador magnético, al equipo electroforético; este

vaso contenía la solución de poliacrilamida al 20% con Sacarosa al 20% como agente estabilizante de la gradiente. El otro vaso contenía la solución de poliacrilamida al 11%.

Los compartimientos de los electrodos se llenaron con Tampón Tris 0,025 M, Glicina 0,19 M, SDS 0,1%, pH 8,6.

Entre 5 y 20 μ g de proteína fueron disueltas en un volumen final de 0,4 ml que contenía Tris 0,094 M - HCl pH 6,8, SDS 3%, Glicerol 15%, 2-Mercaptoetanol 1,5% (omitido en algunos experimentos) y una gota de Azul de Bromo Fenol; se calentaron a 100°C durante 2 min y con ellas se cargaron los pocillos. Se corrió la electroforesis a 40 ó 45 V durante la noche.

El gel se tiñó por inmersión en una solución que contenía Azul de Coomassie 0,25%, ácido Acético 10%, Metanol 50%. Se eliminó el exceso de colorante con solución de ácido Acético 10%, Metanol 50%, haciendo el último lavado en ácido Acético 5% y Glicerol 5%. Se secó mediante vacío sobre papel Whatman N°1.

Estimación de pesos moleculares en sistema PAGE-
SDS

Para la estimación de pesos moleculares mediante este sistema, se estandarizó con las siguientes

proteínas: Fosforilasa b (94 kD), Seroalbúmina bovina (70 kD), Ovoalbúmina (45 kD), Anhidrasa Carbónica (30 kD), Inhibidor de Tripsina (20 kD) y α -Lactoalbúmina (14 kD), y se graficó la migración relativa vs el Ln Peso Molecular.

VII. TECNICAS INMUNOLOGICAS

Determinación de actividad por ELISA

El método ELISA (Enzima inmunoensayo en fase sólida) permite determinar unión del anticuerpo a un antígeno en fase sólida mediante una reacción enzimática acoplada (32). Para ello se sensibilizó una placa de cloruro de polivinilo, agregando 50 μ l de Hc por pocillo de una solución de aproximadamente 50 μ g/ml, después de 5 h de incubación se bloquearon los sitios remanentes llenando los pocillos con una solución que contenía una proteína no relacionada (Ovoalbúmina) al 1% en PBS por 18 horas. Luego de lavada la placa, al menos tres veces, con Tween 20 al 1% en PBS, se incubó dos hr a temperatura ambiente con 50 μ l de solución de anticuerpo en diluciones seriadas. Se lavó nuevamente con PBS-Tween, se agregaron 50 μ l de una dilución 1/200 de antisuero contra proteínas séricas totales de *Octodon degus* y se incubó 1 hr a 37°C. Esta etapa permite aumentar la sensibilidad del método.

Se volvió a lavar y se incubó 3 hr a 37°C, con 50 µl de una dilución 1/200 del conjugado Proteína A-Fosfatasa Alcalina en PBS-Ovoalbúmina al 1%. Después de lavadas las placas, los complejos inmunes se revelaron agregando el sustrato p-Nitrofenilfosfato en una concentración de 1 mg/ml en Tampón Carbonato 0,05 M, MgCl₂ 1 mM, pH 9,6. Luego de 30 min a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 50 µl de NaOH 3 M y se diluyó la mezcla de reacción a un volumen de 200 µl con agua destilada, registrando en forma cuantitativa la liberación de p-Nitrofenol por absorbancia a 405 nm.

Immunolectroforesis simple

La immunolectroforesis se realizó de acuerdo a la microtécnica descrita por Williams (33), en placas de Agarosa A 1% en Tampón Veronal pH 8,6 (Barbiturato de Sodio 75 mM y ácido Barbitúrico 15 mM). Una vez solidificada la Agarosa sobre la lámina de vidrio (7,5 cm x 2,5 cm) se colocaron las muestras en 2 pocillos equidistantes de un canal longitudinal central, hechos en la Agarosa y se agregó un cristal de Azul de bromofenol como indicador de la migración.

La fase electroforética se llevó a cabo colocando las placas en la cámara de immunolectroforesis,

llenando las cubetas de los electrodos con Tampón Veronal pH 8,6 y aplicando una corriente constante de 5 mA por placa hasta que el indicador se encontraba cercano al extremo catódico de la placa.

En la fase siguiente, se llenó el canal central con antisuero contra proteínas séricas totales de *O. degus* y se dejó difundir en cámara húmeda hasta la aparición de bandas de inmunoprecipitación (24 a 28 hr). Las bandas se tiñeron sumergiendo las placas previamente lavadas y secas en Solución de AmidoBlack 11% (p/v) en Tampón Acetato 0,55 M pH 3,7 (Acetato de Sodio 0,1 M y ácido Acético 1 M mezclados v/v), durante 20 minutos. Se lavó el exceso de colorante con ácido Acético 2%. Finalmente, se tratan con una solución ácido Acético 2%, Glicerol 5% y se dejaron secar al aire.

Inmunolectroforesis bidimensional

Esta técnica es especialmente útil para el análisis de mezclas de antígenos. Consta de dos procesos electroforéticos: i) electroforesis simple en geles de Agarosa y, ii) electroforesis perpendicular a la anterior, que hace migrar las proteínas a través de un soporte de Agarosa que contiene el antisuero.

La técnica se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Clark y Freeman (34), utilizando Tampón Veronal pH 8,6. La electroforesis en la primera dimensión se realizó igual que para inmunolectroforesis simple. Para la segunda dimensión se cortó el gel por la línea longitudinal que separaba los pocillos y se transfirieron las tiras de Agarosa al borde de las placas de vidrio (9,0 cm x 7,5 cm). Se cubrió el resto de la placa con una mezcla de Agarosa 1% en Tampón Veronal que contenía una dilución 1/20 de antisuero, contra proteínas séricas totales de *O. degus*, dializado previamente contra el mismo Tampón.

Una vez solidificado el gel, se montó la placa en la cámara electroforética de modo que la región que contenía el gel de la primera dimensión quedara en el extremo anódico. La electroforesis se realizó a 4°C y a voltaje constante de 30 V durante 20 a 30 hr, hasta que aparecieron bandas de precipitación. Después de esto se lavó la placa en una solución NaCl 0,2 M, EDTA 1 mM, para eliminar las proteínas solubles incluidas en el gel y luego en agua destilada para eliminar las sales. El procedimiento de secado y tinción fue el mismo que para las I.E. simples.

Hemaglutinación pasiva

La hemaglutinación pasiva consiste en sensibilizar GRO con un antígeno determinado y hacerlos reaccionar con el anticuerpo correspondiente (35). Es un método rápido y sensible que a la vez permite analizar la bivalencia de los anticuerpos, ya que para que haya aglutinación de los GR se requiere la integridad de los dos sitios de unión de antígeno de la molécula.

La sensibilización de los GRO se realizó como sigue: 0,2 ml de una suspensión de GRO 50% en PBS con la modificación de Golub (NaCl 75 mM, KH_2PO_4 18 mM, Na_2HPO_4 72 mM, pH 7,2), fueron mezclados con 4,5 ml de una solución de Hc 10 mg/ml en el mismo Tampón y se les agregó 200 mg de Carbodiimida (Clorhidrato de 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)Carbodiimida) disueltos en 1 ml de PBS Golub. Se incubó 1 hr a t° ambiente y se detuvo la reacción lavando los GR tres veces con PBS Golub, después de lo cual fueron resuspendidos en 5 ml de PBS Golub adicionado con suero normal de conejo absorbido con GR al 1%.

Se hicieron reaccionar 25 μl de estos GRO-Hc con 25 μl de solución de anticuerpo, después de incubar 1 hr a t° ambiente se observó la aglutinación en forma cualitativa.

VII. SECUENCIACION POR EL EXTREMO AMINOTERMINAL DE LAS PROTEINAS

Secuenciación manual de la región amino-terminal

Esta se realizó por degradación sustractiva de Edman en presencia de SDS, de acuerdo a la técnica descrita por Weiner y col. (36).

Básicamente el método consiste en: 10 nmoles de proteína disueltos en 200 μ l de Tampón de Acoplamiento-SDS (NaHCO_3 0,5 M ajustado a pH 9,8 con NaOH, adicionado con SDS 1,4 veces en exceso sobre la proteína agregada), se hacen reaccionar con 10 μ l de PITC y se incubaron bajo atmósfera de N_2 a 50°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo precipitando con 9 volúmenes de Acetona, se centrifugó, el precipitado se lavó con 2 ml de Acetona, y se secó al vacío durante 30 min en un desecador temperado a 50°C.

La ciclación y liberación de los derivados feniltiohidantoinados se efectuó agregando 0,2 ml de TFA anhidro e incubando a 50°C en un tubo sellado bajo N_2 durante 5 minutos; finalizado este tiempo, se agregó un cristal de SDS, una vez disuelto se retiró el TFA con un flujo de N_2 y luego al vacío en un desecador a 50°C.

El residuo obtenido se disolvió en 200 μ l de Tampón de acoplamiento y se retiró una cantidad

correspondiente a 0,5 nmoles de proteína para dansilación, de acuerdo al método descrito más abajo.

La degradación se continuó agregando PITC al remanente, y repitiendo el ciclo.

Determinación de residuos aminoterminales

Se empleó la técnica de dansilación de Hartley (37), en presencia de SDS 1% y con algunas modificaciones de Gross y Labouesse (38).

Entre 0,5 y 10 nmoles de proteína fueron disueltos en 50 μ l de Tampón de Dansilación (Tampón Fosfato de Sodio 0,25 M pH 7,8, SDS 1%), y se hicieron reaccionar con medio volumen de DNS-Cl 5 mg/ml en Acetona. La reacción se hizo bajo atmósfera de N_2 de tubos de vidrio (8 cm x 0,9 cm) cubiertos con Parafilm y se incubó a t° ambiente durante 30 minutos. Se detuvo la reacción por adición de TCA a 4°C hasta una concentración final de 20%, se centrifugó 10 min a 500 g y el precipitado se lavó con 200 μ l de HCl 6 N, se selló el tubo y se hidrolizó la proteína a 110°C entre 6 y 18 horas.

Transcurrido el tiempo de hidrólisis se removió el ácido al vacío en un desecador temperado por un baño de agua a 50°C y los hidrolizados se disolvieron en 10 a 20 μ l de Piridina 50% en agua bidestilada.

Los aminoácidos dansilados se identificaron por cromatografía en placas de poliamida de 5 cm x 5 cm, la muestra se sembró a 0,5 cm de los bordes lateral e inferior; al reverso de la placa se sembró un estándar de DNS-Aminoácidos, los cuales sirven como patrones de comparación.

La cromatografía se llevó a cabo usando tres sistemas de solventes: el Solvente I (Ac. Fórmico 1,5 % en agua) se corrió en la primera dimensión hasta alcanzar 0,5 cm del extremo superior, se dejó secar la placa y perpendicularmente al anterior se corrieron el Solvente II (Benceno:Ac. Acético, 9:1) y el Solvente III (Etil Acetato:Ac. Acético:Metanol, 20:1:1). Las placas se secaron con aire caliente entre los dos últimos solventes.

Los DNS-Aa se visualizaron bajo luz UV de onda corta.

RESULTADOS

1. Inmunización de *O. lunatus* con Hemocianina de loco (Hc)

La Figura 4 muestra la titulación del suero de un roedor *O. lunatus* antes y después de ser sometido al protocolo de inmunización descrito.

Se observó un aumento considerable del título luego de la inmunización, alcanzando valores de $1/2^9$ en inmunización secundaria (datos no presentados) y de $1/2^{12}$ en inmunización terciaria.

2. Fraccionamiento del suero por cromatografía de afinidad en columna de Prot. A-Sepharose

La cromatografía en columna Prot. A-Sepharose (Fig. 5) permitió fraccionar el suero en dos componentes: i) la fracción Prot. A⁺ excluida de la columna, que contiene la mayor parte de las proteínas del suero, muestra un título específico anti-Hc medido por ELISA de $1/2^{12}$ y, ii) la fracción Prot. A⁺ retenida por la columna, que fue posible eluir a un pH cercano a 4,3 contiene aproximadamente 10 mg/ml de proteína por ml de suero inicial. La actividad anti-Hc de esta fracción, medida por ELISA :

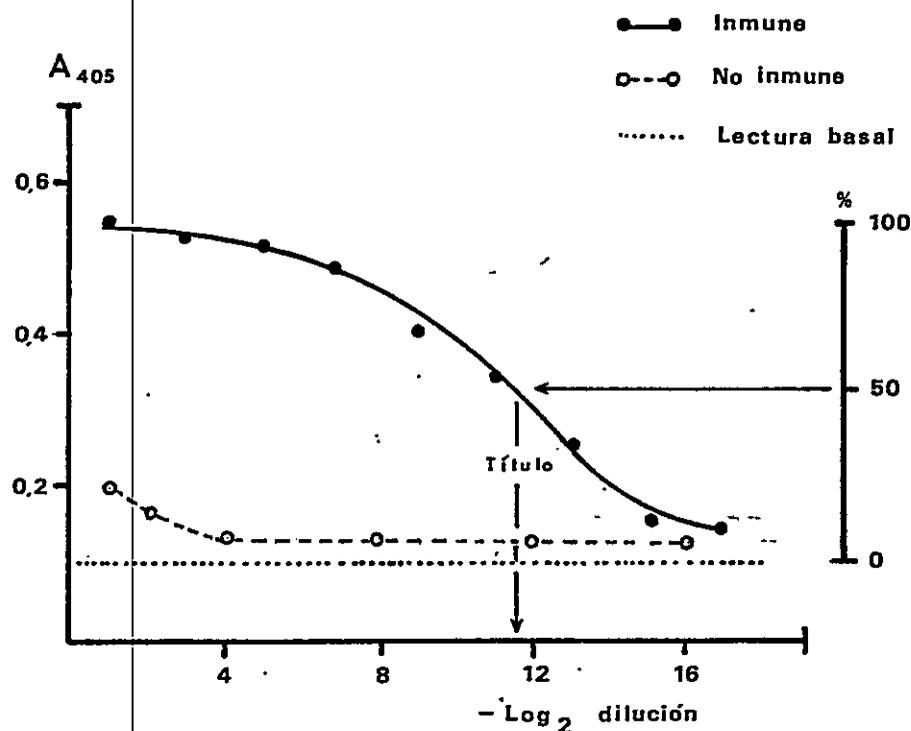
TITULACION ANTI-Hc DE SUERO DE *O. lunatus* POR ELISA

FIGURA 4. Titulación por ELISA del suero inmune (resp. terciaria) y no inmune de *O. lunatus* en placas de polivinilo sensibilizadas con 50 μ l de una solución Hemocianina de loco. 50 μ g/ml.

El título se define como la dilución a la que se obtiene la mitad de la actividad máxima o saturación.

La lectura basal corresponde a las lecturas de A_{405} obtenidas en placa control sensibilizadas solamente con ovoalbúmina.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA-PROTEINA A-SEPHAROSE

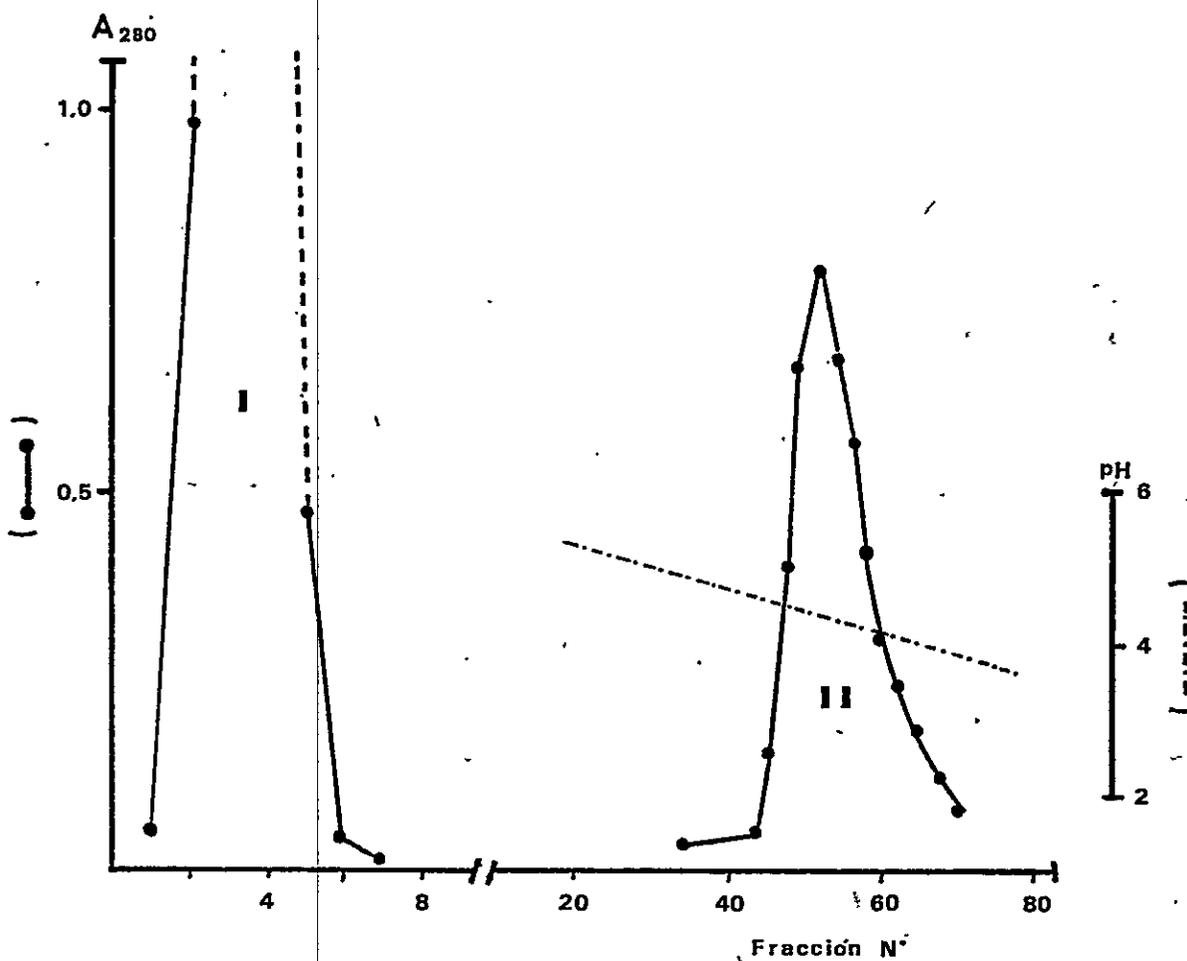


FIGURA 5. Perfil cromatográfico de la columna Prot. A-Sepharose (9 ml), a la que fue aplicado 1 ml de suero completo de *O. lunatus* llevado a pH 8,0 con una solución de Tris 1 M, pH 11.

Para el lavado de la columna se usó PBS pH 8,0 y la elución se realizó con un gradiente de pH desde 5,5 a 2,5 en Tampón citrato 0,1 M. La cromatografía se realizó a un flujo de 10 ml/hr recogiendo fracciones de 1 ml.

- I : Fracción Prot. A₊, excluida de la columna.
 II : Fracción Prot. A₋, retenida específicamente a la columna.

mostró un título de $1/2^{11}$. Esto indica que la actividad anti-Hc del suero completo está asociada principalmente a la fracción Prot. A⁺, lo cual es consistente con la observación de arcos de precipitación cuando se enfrenta esta fracción con una solución que contiene 1 mg/ml de Hemocianina colocada en el canal de la electroforesis simple (Figura 6).

La Tabla III resume los resultados del fraccionamiento del suero por cromatografía de afinidad en columna Prot. A-Sepharose.

3. Inmunolectroforesis (IE) simple y bidimensional

El análisis inmunolectroforético realizado para estimar la pureza de la fracción Prot. A⁺ se muestra en la Figura 7. Este análisis mostró dos arcos de precipitación, un componente principal de

ANALISIS DE PRECIPITACION DE Hc EN INMUNOELECTROFORESIS
SIMPLE

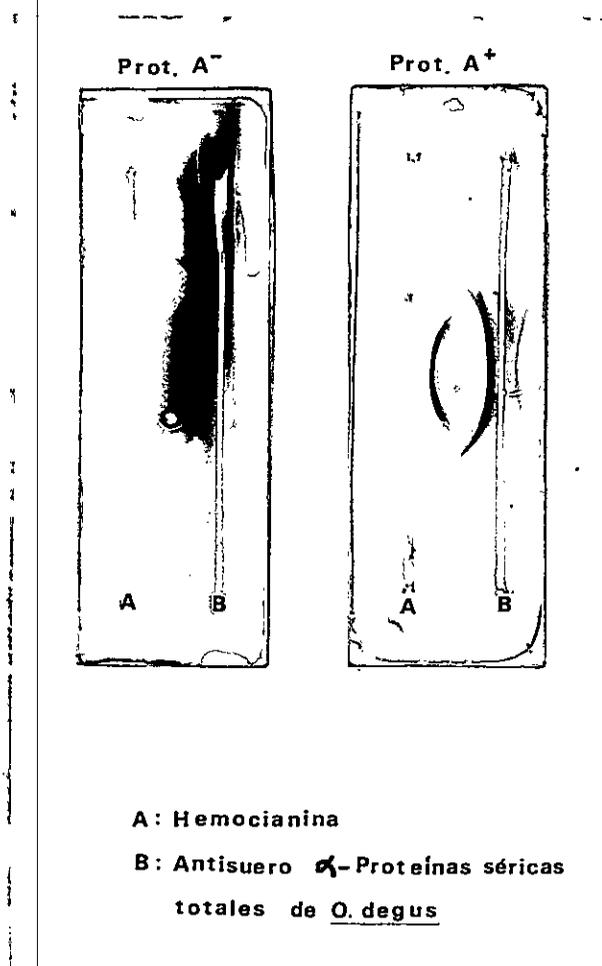


FIGURA 6. Inmunolectroforesis en Agarosa 1% en Veronal pH 8,6 de fracciones Prot. A⁺ y Prot. A⁻, enfrentadas a Hc y a antisuero contra proteínas séricas totales de *O. degus*.

TABLA III. FRACCIONAMIENTO DEL SUERO A TRAVES DE COLUMNA PROT.A-SEPHAROSE

Fracción	Actividad (a)	Proteínas (mg/ml)	%	Actividad específica (b)	Purificación
Suero completo	12	56	100	0,21	1
Fracción Prot.A ⁺	11	10	18	1,10	5,24
Fracción Prot.A ⁻	4	44 (c)	82	0,1	---

- a) La actividad es expresada como $-\text{Log. en base } 2 \text{ del título.}$
- b) La actividad específica es calculada como el cuociente entre la actividad (a) y las proteínas por ml de suero.
- c) Calculado por sustracción: % proteína suero completo
- % proteína fracción Prot. A⁺

ANÁLISIS INMUNOELECTROFORÉTICO

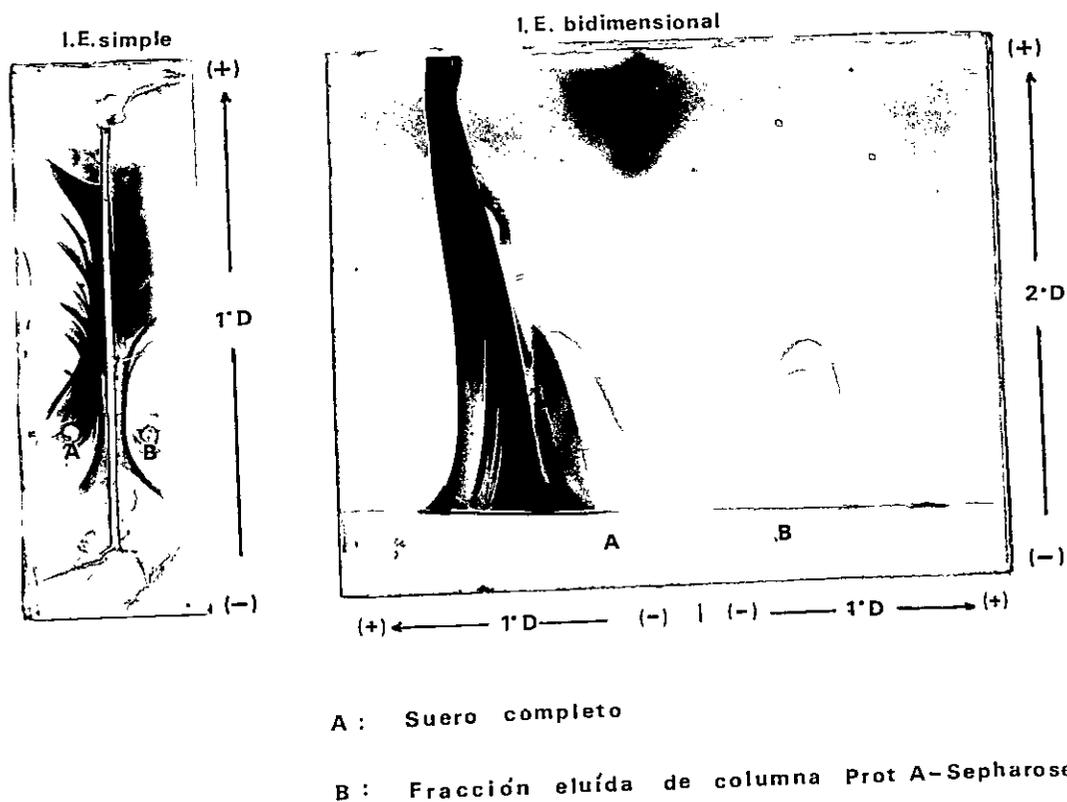


FIGURA 7. Análisis del suero completo de *O. lunatus* (A) y fracción Prot. A⁺ (B) por inmunoelectroforesis simple y bidimensional en Agarosa.

1°D: En ambos casos la primera dimensión fue realizada en geles de Agarosa 1% en Tampón Veronal pH 8,6 (Barbiturato de sodio 75 mM, Ac. Barbitúrico, 15 mM), durante aproximadamente 1 h.

2°D: Segunda dimensión, las proteínas separadas en la primera dimensión, se hicieron migrar a través de gel de Agarosa 1% en Tampón Veronal pH 8,6 que contenía una dilución 1/20 de antisuero anti-proteínas séricas totales de *O. degus*, inducido en conejo.

migración electroforética rápida que se sobrepone en uno de sus extremos con un componente de movilidad electroforética menor. Estos resultados sugieren que la fracción Prot. A⁺ no es totalmente homogénea, aún cuando poseen identidad inmunológica parcial.

4. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel

Se intentó separar los componentes visualizados en el perfil inmunolectroforético de la Fracción Prot. A⁺, aprovechando la aparente diferencia de carga que se observó, mediante cromatografía en DEAE-Sephacel.

El perfil de elución de esta columna (Fig. 8), muestra 2 picos de proteína con actividad anti-Hc medida por ELISA. Una fracción fue excluida de la columna, mientras que la otra fue retenida y eluida a una fuerza iónica equivalente a 60 mM de NaCl. Estos dos picos, sin embargo, muestran un comportamiento inmunolectroforético similar al de la fracción Prot. A⁺ que se muestra en la Figura 7 (datos no mostrados) con 2 bandas de precipitación.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL DE LA FRACCION
 PROT. A⁺

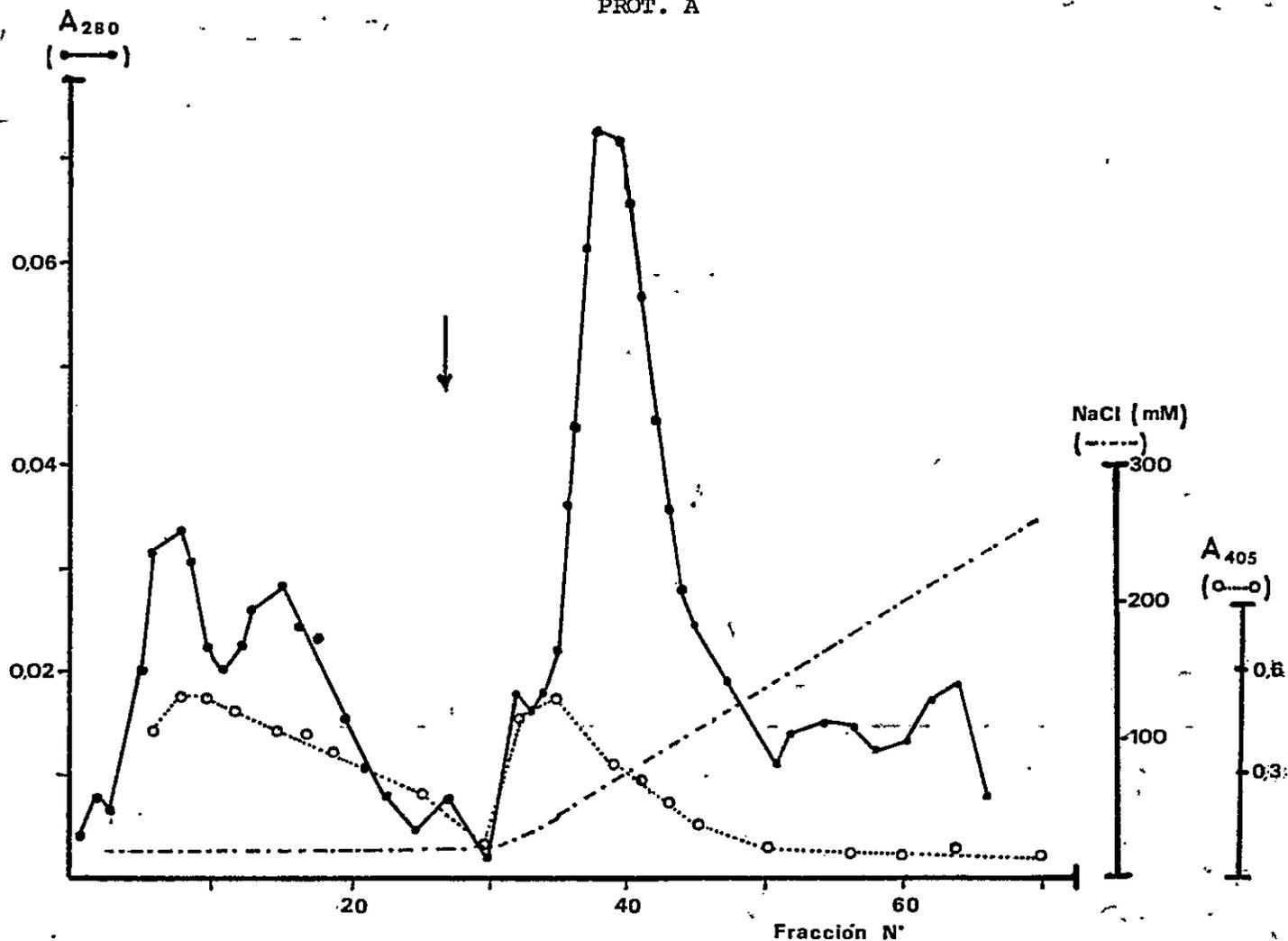


FIGURA 8. Perfil de elución de proteínas (●-●) de columna de DEAE-Sephacel (3 ml). Flujo: 10 ml/hora.

El lavado se realizó con Tris 20 mM-NaCl 20 mM, pH 7,9. La elución se realizó con un gradiente de fuerza iónica equivalente de 20 mM a 400 mM de NaCl (---).

Se colectaron fracciones de 1 ml.

(○-○) Determinación de actividad en ELISA se grafica como lectura espectrofotométrica a 405 nm.

La flecha indica inicio de la gradiente.

5. Estimación de pesos moleculares de fracción Prot. A⁺
por filtración en gel

La estimación de pesos moleculares se realizó mediante cromatografía en Sephacryl S-300 (Figura 9), previamente calibrada con proteínas de peso molecular conocido, con las cuales se construyó la curva $\ln \text{pm}$ vs Volumen de elución. El coeficiente de correlación para esta curva fue de 0,998.

Así se calculó un peso molecular de aproximadamente 160000 D, para la fracción Prot. A⁺.

Análisis similar realizado para la fracción Prot. A⁺ mostró dos picos de proteínas, pero la actividad anti-Hc medida por ELISA no mostró picos definidos por lo que los resultados no fueron concluyentes.

6. Análisis de la composición polipeptídica de la fracción proteina A⁺ por PAGE-SDS

La electroforesis realizada en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes y reductoras (SDS más 2-Mercaptoetanol) permitió observar la presencia de dos tipos de cadenas (H y L), componentes de las proteínas de la fracción Prot. A⁺, que mostraron bandas predominantes con una migración similar a cadenas γ y L típicas.

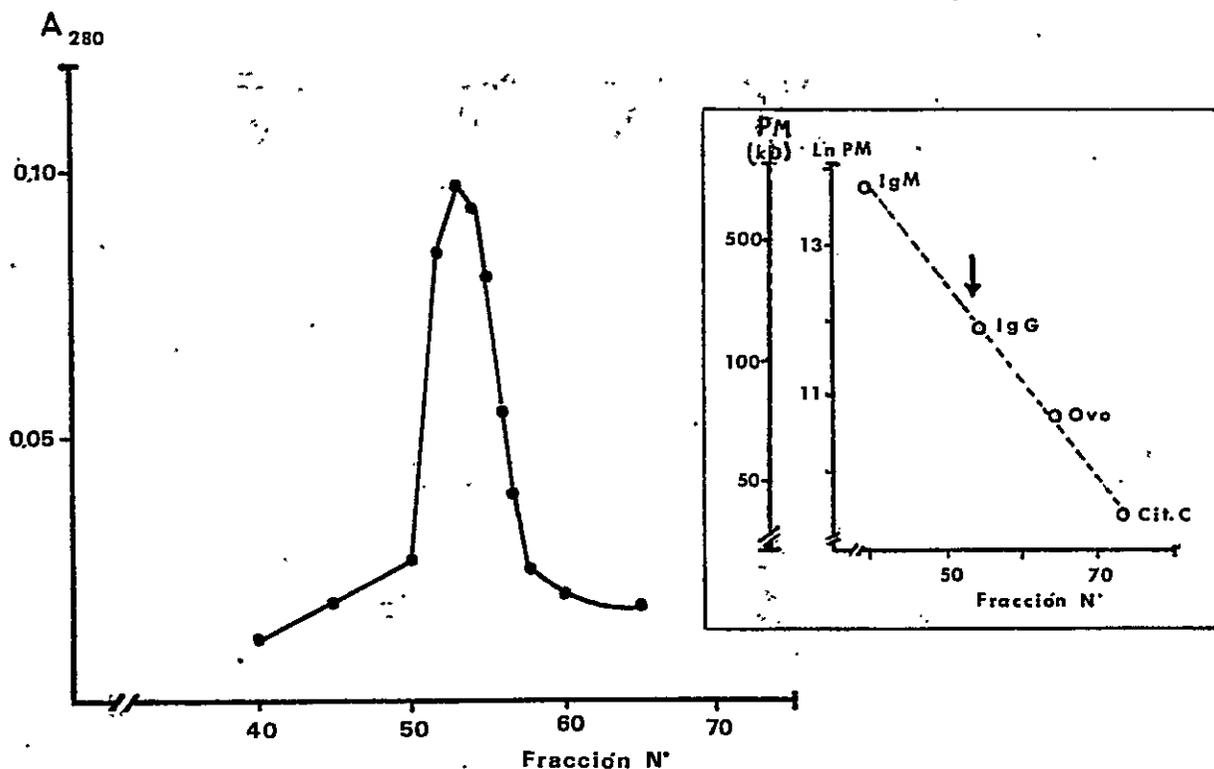
CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-300 DE LA FRACCION PROT.A⁺

FIGURA 9. Perfil cromatográfico de las proteínas de la fracción Prot.A⁺ de suero de *O. lunatus*, eluidas de la columna Sephacryl S-300 (130 cm x 0,9 cm) equilibrada con Tampón S-200 (Tris 10 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 1 mM, Azida sódica 0,02%, llevado a pH 7 con HCl).

Alícuotas de 1 ml que contenían 2 mg de proteína fueron aplicados a la columna a un flujo de 10 ml/hr, recogiendo fracciones de 1 ml por tubo.

En el recuadro los círculos abiertos indican el tubo de elución de las proteínas usadas como estándares, y con las que se construyó la curva de calibración.

(IgM pejejallo: 960 kD), IgG humana: 150 kD; Ovoalbúmina: 45 kD y Citocromo C: 11,7 kD). La flecha indica el lugar de elución de la fracción Prot. A⁺.

La unión covalente de estas cadenas se puso de manifiesto al realizar la electroforesis en condiciones disociantes no reductoras (SDS), bajo las cuales se observó sólo una banda predominante de baja migración (Figura 10) de $pM \approx 160$ kD.

7. Estimación de pesos moleculares de cadenas H y L en sistemas PAGE-SDS

Los pesos moleculares se estimaron de la curva de calibración $\ln PM$ vs R_f , obtenida de la mezcla de estándares sometida a las mismas condiciones que las muestras.

El peso molecular estimado para la cadena H fue de 55000 D y para las cadenas L fue de 27000 D (Figura 11), valores compatibles con los descritos para los polipéptidos de una IgG típica.

8. Análisis de la secuencia aminoterminal

Las cadenas H usadas para la secuenciación aminoterminal fueron purificadas por cromatografía en Sephacryl S-200 en presencia de 1% SDS (Figura 12).

La cromatografía en capa fina de los residuos DNS-Aa obtenidos luego de la degradación sustractiva (Figura 13), mostró dos aminoácidos en la primera

ELECTROFORESIS EN GRADIENTE DE GELES DE POLIACRILAMIDA - SDS

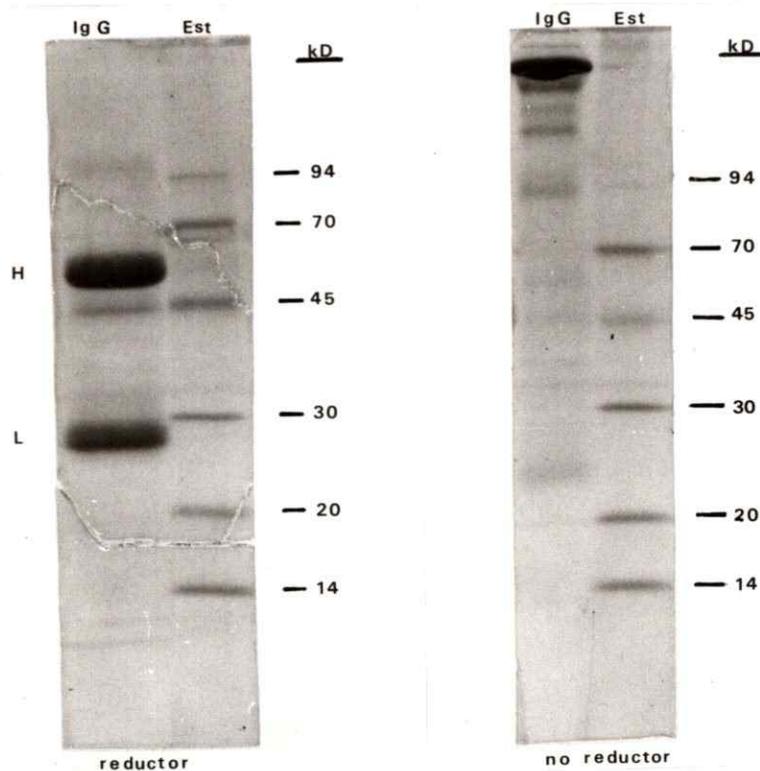


FIGURA 10. Análisis electroforético de la fracción Prot. A⁺ en geles en gradientes de poliacrilamida-bisacrilamida 11% a 20%, bajo condiciones disociantes tanto reductoras (SDS y 2-Mercaptoetanol) como no reductoras (SDS).

Cada canal se cargó con 50 µg de proteína en 50 µl de mezcla disociante con o sin 2-Mercaptoetanol.

El sistema se calibró con los siguientes patrones: fosforilasa b (94 kD), Seroalbúmina bovina (70 kD), Ovoalbúmina (45 kD), Anhidrasa carbónica (30 kD), Inhibidor de Tripsina (20 kD) y α-Lactoalbúmina (14 kD).

ESTIMACION DE PESOS MOLECULARES EN SISTEMA PAGE-SDS

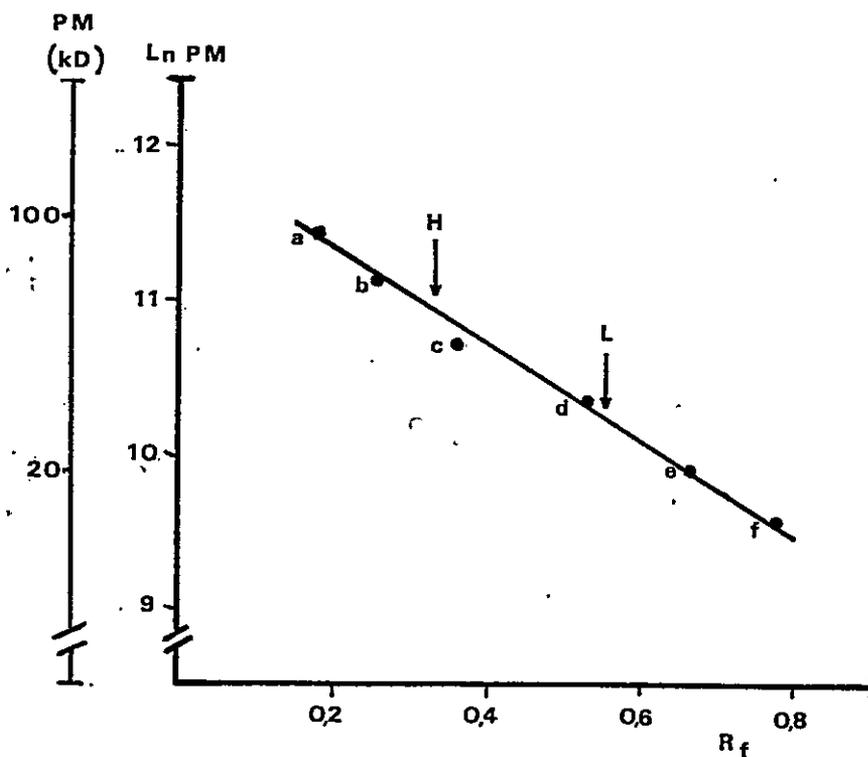


FIGURA 11. Los pesos moleculares se estimaron de la curva de calibración construida con los siguientes patrones:

- a) Fosforilasa b (94 kD),
- b) Seroalbúmina bovina (70 kD),
- c) Ovoalbúmina (45 kD),
- d) Anhidrasa carbónica (30 kD),
- e) Inhibidor de Tripsina (20 kD), y
- f) α -Lactoalbúmina (14 kD).

Donde R_f corresponde a la migración relativa.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA SEPHACRYL S-200/SDS

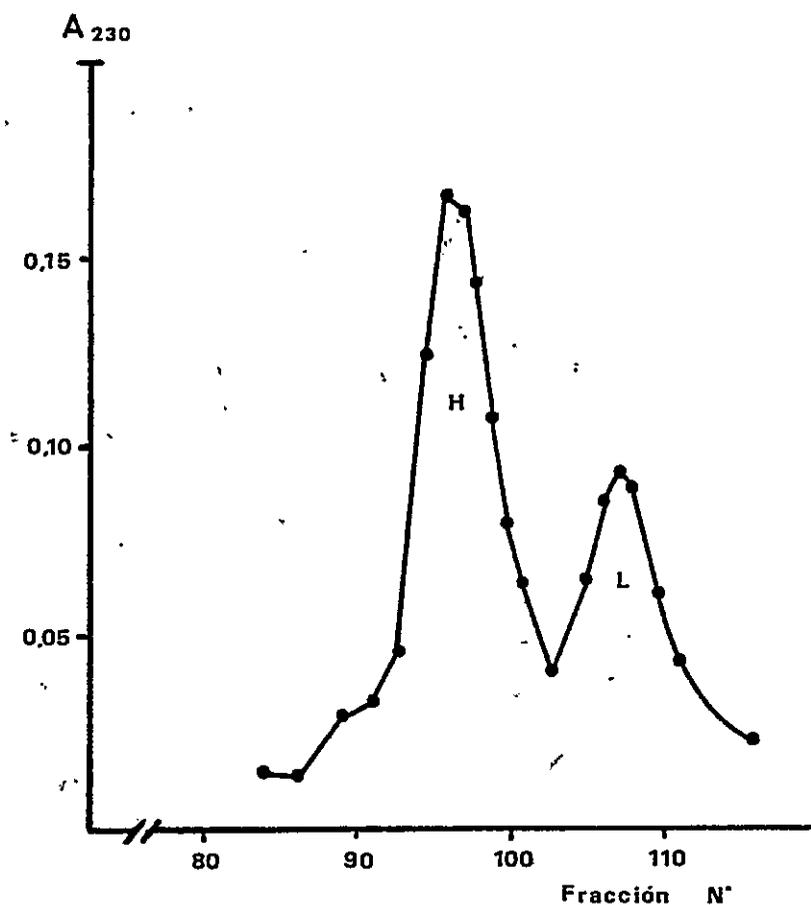


FIGURA 12. Perfil cromatográfico de las proteínas eluidas de la columna de Sephacryl S-200 (240 cm x 4,6 cm) equilibrada en Tampón S-200/SDS (Tris: 40 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%, Azida sódica 0,02% ajustado a pH 6,8 con HCl), a la que se aplicaron 4 mg de proteína de la fracción Prot. A⁺, previamente reducidas y alquiladas, disueltas en 1 ml del mismo Tampón. Se usó un flujo ascendente de 5 ml/hr, recogiendo fracciones de 2,6 ml por tubo.

Las letras H y L indican el tipo de cadena a que corresponde cada pico.

ANALISIS DE SECUENCIA AMINOTERMINAL DE CADENA H

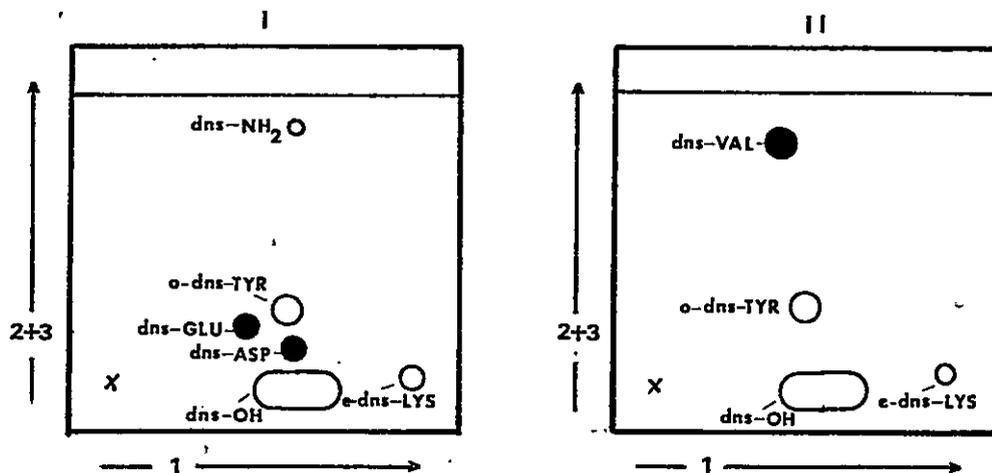


FIGURA 13. I y II: Cromatogramas bidimensionales en placas de poliamida de los residuos aminoterminales de la cadena H de IgG de *O. lunatus* dansilados, representando los aminoácidos 1 y 2 respectivamente.

Las manchas oscuras corresponden a los dns-Aa detectados para cada posición. Las manchas claras corresponden a derivados dansilados de cadenas laterales de Aa y a productos de degradación del dns-Cl.

Las flechas indican la dirección de corrida de cada solvente.

- 1) Acido Fórmico 1,5%
- 2) Benceno : Acido Acético, 9:1
- 3) Etil Acetato : Acido Acético : Metanol, 20:1:1

posición, Asp y Glu, mientras que en la segunda posición solo se visualizó Val. La microheterogeneidad característica de las cadenas polipeptídicas de anticuerpos policlonales dificultó la observación de los aminoácidos siguientes.

9 . Digestión con papaína

La digestión enzimática con papaína de la fracción Prot. A⁺ generó los fragmentos que se muestran en la Figura 14, que corresponde a una electroforesis en condiciones disociantes, no reductoras. Usando proteínas estándares en estas mismas condiciones, pudo hacerse una estimación de los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos (Tabla IV).

10. Filtración en geles de los fragmentos papaínicos

La cromatografía en columna de Sephadex G-100 y posterior determinación de actividad α -Hc de las fracciones obtenidas permitió separar dos fragmentos principales cuyos pesos moleculares estimados en estas condiciones fueron de aproximadamente 100 y 50 kD respectivamente (no se graficaron las proteínas medidas por absorbancia a 230 nm, porque las lecturas obtenidas eran muy bajas). (Fig. 15).

ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS FRAGMENTOS PAPAÏNICOS

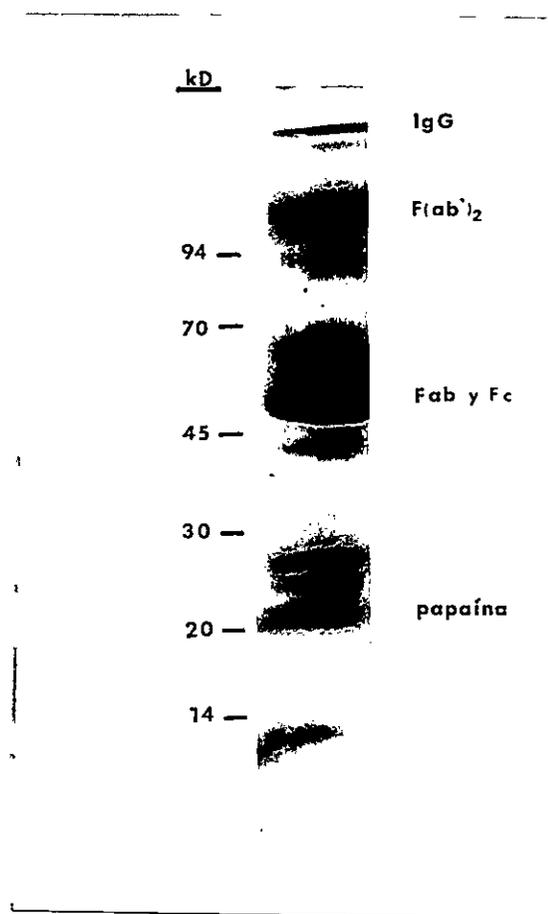


FIGURA 14. Electroforesis en gel en gradiente de poliacrilamida-bisacrilamida desde 11% a 20%, de la mezcla de fragmentos.

Los números de la izquierda indican los pesos moleculares de las proteínas cuya migración indican (Fosforilasa b : 94 kD, Seroalbúmina: 70 kD, Ovoalbúmina: 45 kD, Anhidrasa carbónica: 30 kD, Inhibidor de Tripsina: 20 kD y α - Lactoalbúmina: 14 kD).

TABLA IV. PESOS MOLECULARES ESTIMADOS DE FRAGMENTOS PAPAÍNICOS
(kD)

Fragmento	PAGE-SDS no-reductor	SEPHADEX G-100 (a)	PAGE-SDS reductor
A (IgG)	158,079	-	55-27
B F(ab')	109,781	100.549	∅
C Fab y Fc	48,999	46.126	∅
D ---	26,685	-	-
E papaína	20,927	-	-
F ---	13,015	-	-

Nota: ∅ : Indica que no se dispone de estos datos debido a que no pudieron ser visualizados, por la baja concentración de proteínas con que se contaba.

(a): Estimados por perfil de actividad.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX G-100 DE LOS FRAGMENTOS
PAPAINICOS

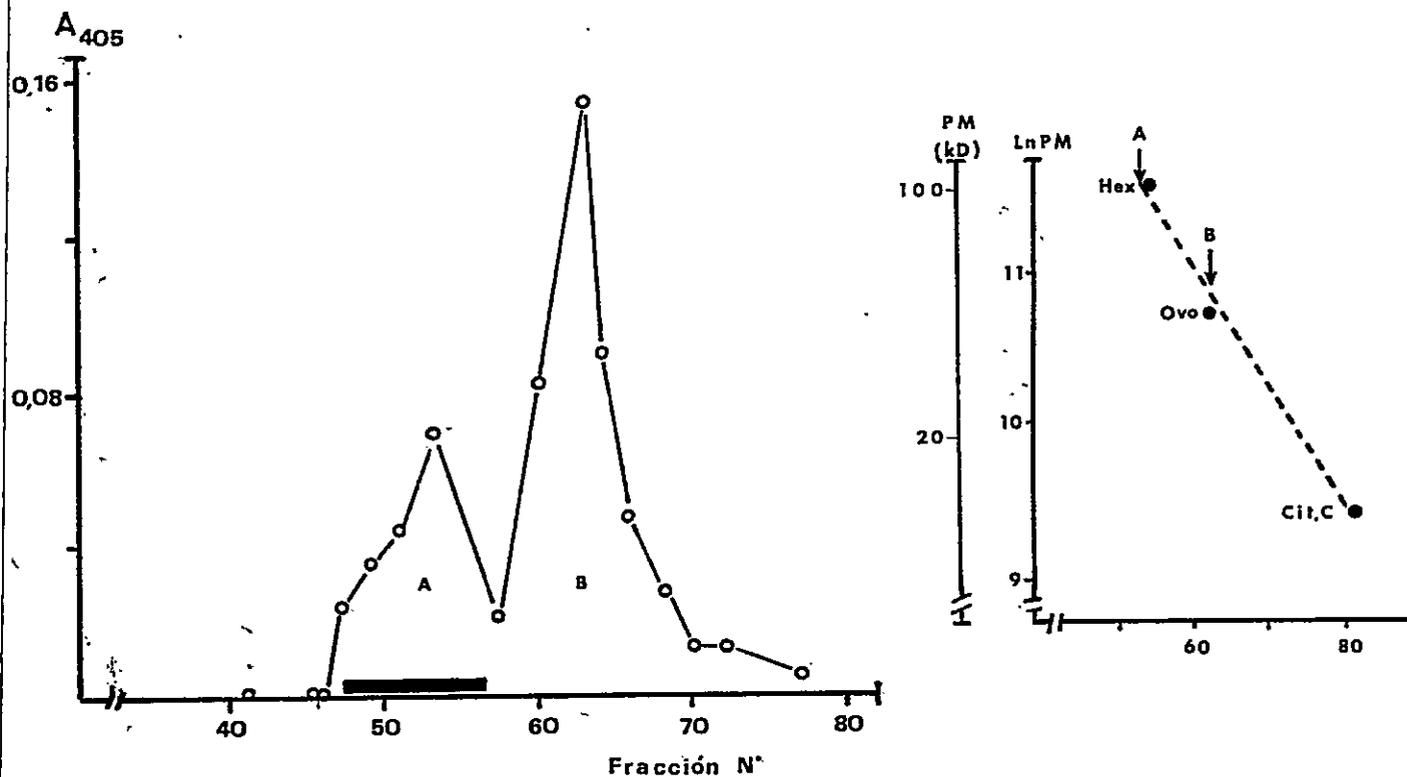


FIGURA 15. I: Perfil de actividad α -Hc medido por ELISA (o-o) de los fragmentos papaínicos cromatografiados en columna de Sephadex G-100 (150 cm x 0,9 cm) equilibrada en PBS pH 7,4. Se usó un flujo de 5 ml/hr y se recogieron fracciones de 1 ml por tubo.

La barra gruesa muestra las fracciones positivas en la hemaglutinación pasiva de GRO-Hc.

II: Curva de calibración de la columna construida con los siguientes patrones: Hexoquinasa (comercial): 100 kD, Ovalbúmina: 45 kD y Citocromo C: 11,7 kD.

Las flechas A y B indican las fracciones de elución de los fragmentos F(ab')₂ y Fab, respectivamente.

Mediante ELISA pudo determinarse que ambos poseen la capacidad de unir Hc; sin embargo, a través de la técnica de hemaglutinación pasiva pudo detectarse una característica diferencial entre ellas y que es la que dice relación con su valencia. Esto es, el fragmento de 100 kD es capaz de unir antígeno en forma bivalente como se ve reflejado en su capacidad de aglutinar GRO-Hc; en cambio el de 50 kD que no aglutina sería univalente. Estos resultados concuerdan con los pesos moleculares estimados y llevan a definir estos fragmentos como $F(ab')_2$ y Fab respectivamente.

DISCUSION

La heterogeneidad de los anticuerpos presentes en el suero de los vertebrados superiores, dificulta el estudio de la estructura y función de clases y subclases de inmunoglobulinas. A pesar de esto, en la actualidad se cuenta con una técnica que da muy buen rendimiento en la purificación de Igs de tipo G del suero de muchas especies de mamíferos. Esta técnica es la cromatografía en columna de Proteína A-Sepharose (26).

La Proteína A es un componente de la pared celular de varias cepas de *Staphylococcus aureus*, la cual ha demostrado tener la propiedad de unir específicamente las IgG's de muchas especies animales y se ha postulado que esta unión ocurre en sitios localizados entre los dominios C_{H2} y C_{H3} de éstas moléculas (39), esto ha permitido usarla en inmunología con fines tanto analíticos como preparativos (40). La cromatografía de afinidad en columna de Prot. A-Sepharose puede ser también usada para separar las IgG en subclases, si éstas presentan afinidad diferencial por ella (26,41). Esta propiedad ha sido útil para análisis de Igs desde un punto de vista filogenético (42, 43). Todos

estos antecedentes fundamentan el uso de la Proteína A como una herramienta útil para purificar y caracterizar las Igs de tipo G presentes en el suero de *O. lunatus*. Los resultados muestran que dado el protocolo de inmunización, la mayoría o casi todas las fracciones del suero de estos animales, con actividad anti-Hc son retenidos por Prot. A. La elución de la columna Prot. A - Sepharose mostró un solo pico con un máximo a pH 4,3, comportamiento que es similar al observado para IgG de conejo y para las subclases IgG_{2a} e IgG₃ de ratón.

La fracción Prot. A⁺ del suero de *O. lunatus* fue caracterizada como una población de inmunoglobulinas del tipo G, considerando que su peso molecular, es timado en 160 kD (Fig. 9) y su composición polipeptídica de cadenas H (55 kD) y L (27 kD) unidas en forma co valente en una relación equimolar (Fig. 10), correspon den a las características de una IgG típica.

Por otro lado, si bien la secuencia aminotermi nal (Fig. 13) no da evidencias directas sobre estructu ra de subclase u otros parámetros relacionados a las regiones constantes y además están sujetos a presiones selectivas diferentes; puede sernos útil para comparar la organización de subgrupos de región variable de cadenas H entre *O. lunatus* y otros mamíferos para dar indicios sobre su diversidad y considerarla como una

caracterización estructural adicional. Así, los aminoácidos encontrados en el extremo aminoterminal de la cadena H de IgG de *O. lunatus* (GLU/ASP y VAL) corresponden con los descritos para subgrupos V_H de rata y ratón, cuy y algunos subgrupos V_H humanos, y se diferencian, a la vez, de los de conejo en que estos últimos se encuentran bloqueados (44). Sin embargo, no es posible descartar la existencia de subgrupos con su extremo aminoterminal bloqueado y que por esta razón no sean detectados.

El análisis inmunolectroforético (Fig. 7) de la fracción Prot. A⁺ del suero de *O. lunatus* puso de manifiesto que la población de Igs de tipo G, no era homogénea en cuanto a su carta y reactividad antigénica, mostrando la existencia de al menos dos poblaciones de moléculas que difieren en propiedades antigénicas y movilidad electroforética. Sugiriendo la existencia de subclases de IgG, en el suero de *O. lunatus*.

Tomando en consideración las pequeñas diferencias en movilidad electroforética, se intentó disectar esta población heterogénea mediante cromatografía en columna de DEAE-Sephacel - lo cual había dado buenos resultados para IgG's de otros roedores (26, 45) sin poder separar las especificidades antigénicas a pesar de la obtención de 2 picos en el perfil de elución de la columna, que

presentaban igual comportamiento inmunolectroforético al mostrado por la fracción Prot. A⁺ (Fig. 7). La presencia de estos 2 picos podría explicarse considerando la heterogeneidad intrínseca de esta familia de proteínas, sin embargo, como todo resultado negativo requiere del análisis crítico de las condiciones de absorción y elución de la columna, que no pudieron realizarse, por no disponer de la cantidad suficiente de proteína.

El análisis de la estructura de subclases de IgG humanas y murinas, han mostrado a nivel de la secuencia de aminoácidos, que las principales diferencias entre ellas radican en la región de la inglete, zona muy flexible, rica en enlaces disulfuro, y que está expuesta al solvente. Esta última condición permite la acción de una serie de enzimas proteolíticas tales como papaína y pepsina, las cuales generan fragmentos de acuerdo a la presencia de aminoácidos específicos.

Los análisis de degradación de Igs con papaína han sido especialmente útiles en la caracterización estructural de las IgG de conejo (30), de rata (46), humanas (47, 48), bovinas (49) y caprinas (50), utilizando el método descrito por Porter (30).

Sin embargo, la activación de la papaína requiere el uso de L-Cisteína; la cual si no es removida, transforma los fragmentos F(ab')₂ que hipotéticamente podrían haberse generado en Fab perdiéndose así valiosa

información sobre los sitios de corte de la enzima. Por esta razón, hemos preferido seguir la metodología descrita por Parham y col. (29) que consiste básicamente en eliminar la L-cisteína por filtración en gel; este tratamiento preserva la integridad de los fragmentos $F(ab')_2$, dando información más precisa sobre el sitio de corte. Este protocolo fue exitosamente usado por ese autor para la degradación de IgG_1 murina, constituyendo un ejemplo clásico de las ventajas de este método en comparación al usado por Porter.

El análisis electroforético de los digeridos papáinicos de la IgG de *O. lunatus*, mostró la presencia de fragmentos principales con pesos moleculares de ~100 kD y ~50 kD que corresponden a movilidades electroforéticas de $F(ab')_2$ y Fab o Fc, respectivamente. El digerido papáinico fue fraccionado posteriormente por cromatografía en Sephadex G-100 y las fracciones eluidas de esta columna fueron analizadas en base a su actividad de unión a Hc en ELISA, y a su capacidad de aglutinar GRO sensibilizados con Hc.

Los resultados de estas determinaciones muestran que las fracciones de ~100 kD y ~50 kD mantienen la capacidad de unir Hc característica que presenta la molécula completa, sin embargo, sólo el fragmento de mayor peso molecular es capaz de aglutinar GRO-Hc.

Se sabe que la aglutinación de elementos figurados requiere la formación de entrecruzamientos, reacción que necesita la bivalencia del anticuerpo. Estos resultados indican la presencia de fragmento $F(ab')_2$ y Fab en las fracciones de 100 y 50 kD respectivamente, siendo el primero bivalente y el segundo univalente. No se debe olvidar que la fracción de 50 kD debería contener también Fc si es que no ha sido degradado, el cual no tiene actividad de unión al antígeno.

La presencia de $F(ab')_2$ y Fab en la digestión de la IgG de *O. lunatus* con papaína preactivada, indica la presencia de al menos dos sitios de corte para la enzima, en la población de IgG's.

Los modelos más simples que explicarían estos hallazgos son presentados en la Figura 16. El primero (I) postula una sola población de IgG con dos sitios de corte para papaína en cada molécula, uno por arriba y otro por debajo de los enlaces disulfuro que mantienen unidas las cadenas H; para que este modelo dé cuenta de los fragmentos encontrados, se requiere que el sitio de corte sobre el enlace S-S esté desfavorecido cinética y estéricamente con respecto al segundo, así no fuera así, el fragmento $F(ab')_2$ estaría siendo transformado rápidamente en Fab por la acción de la papaína en este sitio. Este tipo de mecanismo fue postulado

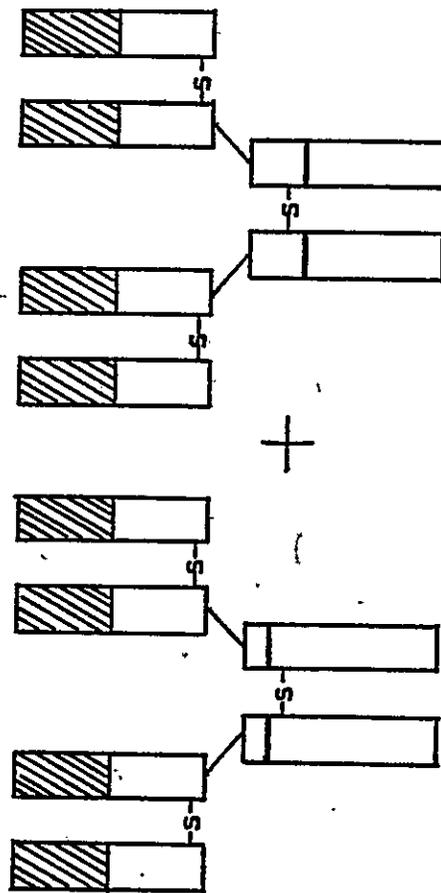
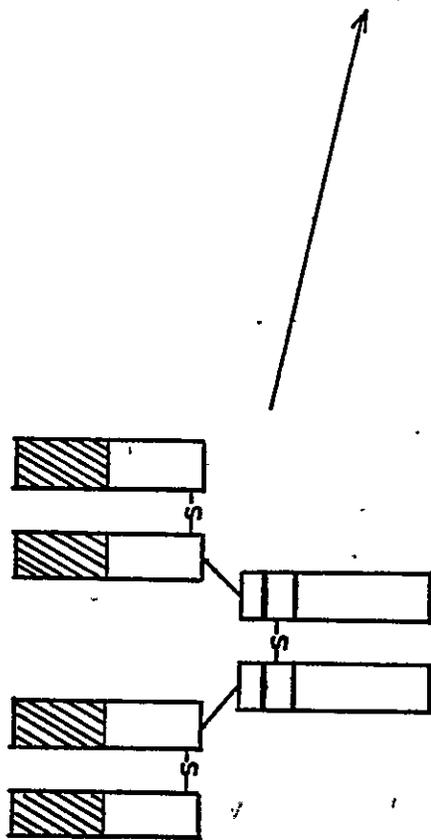
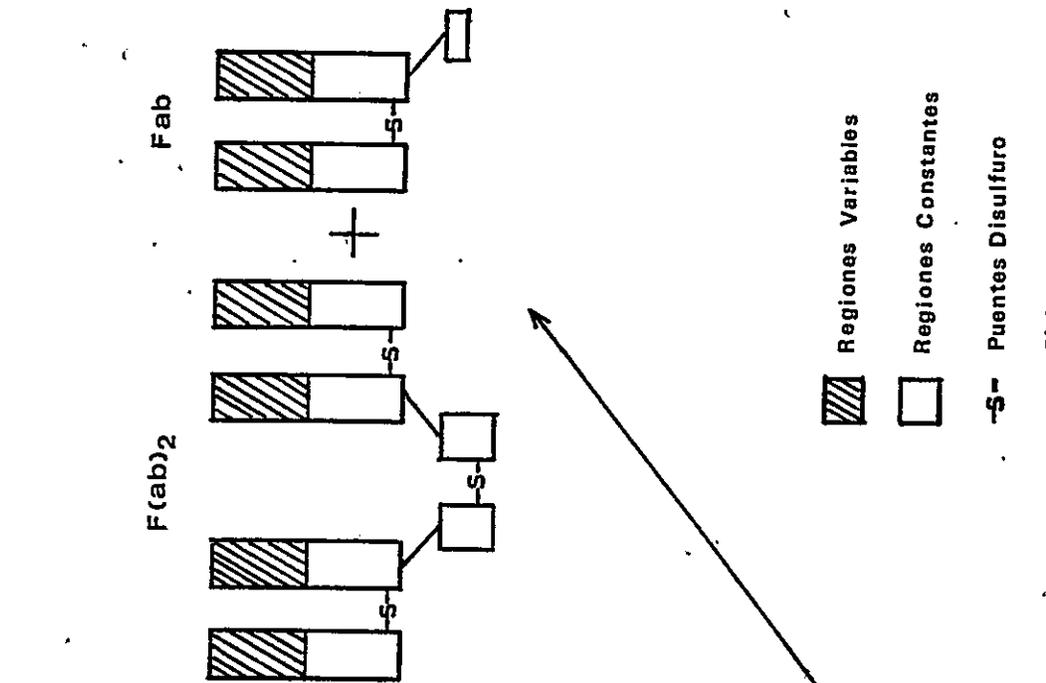


FIGURA 16. Modelos postulados para explicar la presencia de $F(ab)_2$ y Fab entre los fragmentos papainicos de IGG *O. lunatus*.

recientemente para IgG₁ humana (51), pero en este caso la enzima cortaba primero en el sitio por arriba del enlace S-S para dar Fab y Fc y luego en un sitio por debajo del enlace, degradando el Fc.

El segundo modelo (II) postula dos poblaciones de IgG con diferentes sitios de corte para la enzima, ambas probablemente con una susceptibilidad similar. Estas dos poblaciones podrían representar subclases de IgG, lo cual sería similar a lo descrito para las de Igs de ratón.

Si se analiza la factibilidad del primer modelo podría argumentarse en su contra, que dado el largo tiempo de digestión utilizado en el ensayo - más de 18 horas - se esperaría un aumento en la producción de Fab, a expensas del F(ab')₂, aún cuando este paso esté desfavorecido, cosa que no es compatible con los resultados obtenidos.

Por otro lado, la existencia de dos poblaciones con sitios de corte por papafna diferentes, implica cambios de aminoácidos en al menos dos sitios, esto es, uno para crear un nuevo sitio de corte y otro para eliminar el preexistente. Cambios de este tipo se hacen difíciles de explicar para formas alélicas en IgG donde las diferencias son mucho menores, sin embargo, esto puede ser válido para subclases de IgG. Para

probar si son formas alélicas, se debe contar con alo-antisueros obtenidos por inmunizaciones entre individuos de la misma especie.

Si bien el comportamiento inmunolectroforético y los productos de digestión enzimática de la fracción Prot. A⁺, sugieren fuertemente la presencia de poblaciones de moléculas diferentes, probablemente isotipos, la relación entre estas dos observaciones no es posible de establecer *a priori*, pues los parámetros involucrados en cada uno de estos experimentos son diferentes y se requeriría para relacionarlos, tener aisladas las dos poblaciones.

En cualquier caso, las evidencias presentadas en este trabajo reflejan la simplicidad de las Igs de *O. lunatus*, desde el punto de vista de subclases de IgG, estando reducido a uno o tal vez dos de estas subclases lo que concuerda con el carácter arcaico que le han otorgado los paleontólogos a estos animales.

Los resultados presentados aquí, constituyen el primer estudio de la inmunología humoral de roedores pertenecientes al género *Octodon*. El conocimiento de la estructura y organización de clases y subclases de Igs es un primer paso, en el uso de estos animales como modelos de experimentación, como por ejemplo en cuanto a la incidencia natural de enfermedades del sistema

inmune, propia de poblaciones que a consecuencia de su conducta y organización social, presentan alto "inbreed" con poco intercambio genético con otras poblaciones.

Por otro lado, el estudio de animales de las especies *O. lunatus* y *O. degus* desde un punto de vista molecular, podría aportar datos a la controversia existente en cuanto a clasificar a estos animales con mayor certeza, ya sea en una sola especie o dos especies diferentes. Estudios preliminares en este sentido, muestran gran similitud en el comportamiento inmunolectroforético de ambos grupos de roedores, haciendo imposible a este nivel, distinguir entre ellos.

CONCLUSIONES

1. En el suero de *O. lunatus* existen Igs de tipo G que presentan afinidad a Proteína A.
2. El análisis inmunolectroforético muestra la heterogeneidad de la población de IgG's.
3. El protocolo de inmunización usado induce preferentemente Igs de tipo G.
4. El PM estimado para las IgG fue de 160 kD.
5. La composición polipeptídica muestra cadenas H (55 kD) y cadenas L (27 kD) unidas covalentemente y en una relación molar 1:1.
6. La secuenciación aminoterminal de cadenas H de la IgG (Glu/Asp, Val) sugiere la existencia de más de un subgrupo V_H .

7. La presencia de $F(ab')_2$ y Fab entre los fragmentos papainicos de la IgG sugieren dos sitios de corte en la población, los cuales podrían representar isotipos diferentes.

8. Así, tanto el comportamiento inmunolectroforético como la degradación con papaína de la IgG de *O. luna*tus, inducen a pensar en la existencia de subclases de IgG en el suero.

BIBLIOGRAFIA

1. Eisen, H.N. (1980) "Immunology" Second Edition. Ed. Harper & Row, Publishers.
2. Richards, F.F., Konigsberg, W.N., Rosenstein, R.W. and Varga, J.M. (1975) "On the specificity of antibodies". *Science* 189, 130.
3. Singer, S.J. and Doolittle, R.F. (1966) "Antibody active sites on immunoglobulin molecules". *Science* 153 (3731), 13.
4. Natvig, J.B. and Kunkel, G.H. (1973) "Human Igs: classes, subclasses, genetic variants and idiotypes". *Adv. Immunol.* 16, 1.
5. Davies, D.R., Padlan, E.A. and Segal, D.M. (1975) "Three-dimensional structure of immunoglobulins". *Annu. Rev. Biochem.* 44, 639.
6. Amzel, L.M. and Poljak, R.J. (1979) "Three-dimensional structure of immunoglobulins". *Annu. Rev. Biochem.* 48, 961.
7. Winkelhake, J.L. (1978) "Immunoglobulin structure and effector functions". *Immunochemistry* 15, 695.

8. Hood, L., Campbell, J.H. and Elgin, S.C.R. (1975) "The organization, expression and evolution of antibodies genes and other multigene families". *Ann. Rev. Genet.* 9, 305.
9. Rabbitts, T.H., Foster, A. and Milstein, C. (1981) "Human immunoglobulin heavy chain genes: evolutionary comparisons of C μ , C γ and C δ genes and associated switch sequences". *Nucl. Acids. Res.* 9(18), 4507.
10. Adams, J.M. (1980) "The organization and expression of immunoglobulin genes". *Immunology today*, Julio, 10.
11. Tonegawa, S. (1983) "Somatic generation of antibody diversity". (review article). *Nature* 302, 575.
12. Maki, R., Truncker, A., Sakano, H., Roeder, W. and Tonegawa, S. (1980) "Exon shuffling generates an Ig heavy chain gene". *PNAS* 77(4), 2138.
13. Davis, M.M., Calame, K., Early, P., Livant, D., Joho, R., Weissman, . and Hood, L. (1980) "An Ig heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events". *Nature* 283, 733.
14. Hood, L., Davis, M., Early, P., Calame, K., Crews, K.S. and Huang, H. (1980) "Two types of DNA rearrangements in immunoglobulin genes". *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 45, 887.

15. Marku, K.B. and Cooper, M.D. (1982) "New views of the immunoglobulin heavy-chain switch". *Nature* 298, 327.
16. Hill, R.L., Delaney, R., Fellows Jr. R. and Lebovitz, H.E. (1966) "The evolutionary origins of the immunoglobulins". *P.N.A.S.* 56, 1762.
17. Sakano, H., Rogers, J.H., Huppi, K., Brack, C., Traunecker, A., Maki, R., Wall, R. and Tonegawa, S. (1979) "Domains and the hinge region of an Ig heavy chain are encoded in separated DNA segments". *Nature* 277, 627.
18. Calame, K., Rogers, J., Early, P., Davis, M., Livant, D., Wall, R. and Hood, L. (1980) "Mouse C_H heavy chain immunoglobulin gene segments contains three intervening sequences separating domains". *Nature* 284, 452.
19. Kamawaki, T., Takahashi, N. and Honjo, T. (1980) "Complete nucleotide sequence of mouse immunoglobulin μ gene and comparison with other immunoglobulin heavy chain genes". *Nucl. Acids Res.* 8(17), 3933.
20. Nisonoff, A., Hopper, J.E. and Spring, S.B. (1975) "Evolution of the immunoglobulins". Cap. 7, pag. 264. En: *The Antibody Molecule*. Acad. Press, N.Y.
21. Atwell, J.L. (1974) "The structure and evolution of immunoglobulins". Tesis de Doctorado en Filosofía. Universidad de Melbourne.

22. Benacerraf, B., Ovary, Z., Bloch, K.J. and Franklin, E.C. (1963) "Properties of Guinea pig γ s antibodies. I. Electrophoretic separation of two types of Guinea pig γ s antibodies". J. Exp. Med. 117, 937.
23. Wood, A.E. and Patterson, B. (1959). "The rodents of the Deseadan Oligocene of Patagonia and the beginnings of South American rodent evolution". Bull. Mus. Comp. Zool. 120 (3), 279.
24. Osgood, W.H. (1943) "The mammals of Chile". Field Mus. Nat. Hist., Zool. Ser. 30, 1.
25. Yañez, J.L. (1976) "Ecoetología de *Octodon degus*". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
26. Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, G.R. (1978) "Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose". Immunochemistry 15, 429.
27. Manual de Cold Spring Harbor Laboratory (1980). "Hybridoma Techniques". pag. 59. Ed. Cold Spring Harbor, N.Y.

28. Crestfield, A.M., Morre, S. and Stein, W.H. (1963)
"The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and s-carboximethylated proteins". J. Biol. Chem. 238, 622.
29. Parham, P., Androlewics, M.J., Brodsky, F.M., Holmes, N.J. and Ways, J.P. (1982) "Monoclonal antibodies: purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens". J. Immunol. Methods 53, 133.
30. Porter, R.R. (1959) "The hydrolysis of rabbit γ - globulin and antibodies with crystalline papein". Biochem. J. 73, 119.
31. Laemli, V.K. and Favre, M. (1973) "Maturarion of bacteriophage T₄". J. Mol. Biol. 80, 575.
32. Crowther, J.R. and Abu Elzein, E.M.E. (1980) "Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using purified staphylococcus A protein conjugated with alkaline phosphatase". J. Immunol. Methods 34, 261.
33. Williams, C.A. (1971) "Immuno-electrophoretic analysis in agar gels". En: Methods in Immunology and Immunochemistry III, pag. 237. Eds. Williams, C.A. and Chase, M.W. Academic Press, N.Y.
34. Minchin Clarke, H.G. and Freeman, T. (1968) "Quantitative immuno-electrophoresis of human serum protein". Clin. Sci. 35, 403.

35. Gunn, D.L. and Roszman, T.L. (1972) "Preparation of sensitive and stable erythrocytes by the carbodiimide method for detection of primary and secondary IgM and IgG antibody". *J. Immunol. Methods* 1, 381.
36. Weiner, A.M., Platt, T. and Weber, K. (1972) "Aminoterminal sequence analysis of proteins purified on a nanomole scale by gel electrophoresis". *J. Biol. Chem.* 247, 3242.
37. Hartley, B.J. (1970) "Strategy and tactics in protein chemistry". *Biochem. J.* 119, 805.
38. Gross, C. and Labouesse, B. (1969) "Study of the dansylation reaction of aminoacids, peptides and proteins". *Eur. J. Biochem.* 7, 463.
39. Lancet, D., Isenman, D., Sjödhahl, J. Sjöquist, J. and Pecht, I. (1978) "Interaction between staphylococcal-Protein A and immunoglobulin domains". *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 85 (2), 608.
40. Goding, J.W. (1978) "Use of Staphylococcal Protein A as an immunological reagent". *J. Immunol. Methods* 20, 241.
41. Mackenzie, M.R., Warner, N.L. and Mitchell, G.F. (1978) "The binding of murine immunoglobulins to Staphylococcal Protein A". *J. Immunol.* 120(5), 1493.

42. Kronvall, G., Seal, U., Finstad, J. and R.C. Williams Jr. (1970) "Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of γ -globulin using Staphylococcal Protein A". J. Immunol. 104(1), 140.
43. Richman, D., Cleveland, P., Oxman, M. and Johnson, K. (1982) "The binding of Staphylococcal Protein A by the sera of different animal species". J. Immunol. 128(5), 2300.
44. Kabat, E.A., Wu, T.T. and Bilofsky, H. (1976) "Variable regions of immunoglobulins chains. Tabulations and analysis of aminoacids sequences". In: Medical Computer Systems. Bolt Beranek and Newman, Inc. Cambridge, Mass.
45. Coe, J.E. (1969) "7s γ_1 , 7s γ_2 and IgM immunoglobulins in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*)". J. Immunol. 104(4), 639.
46. Rousseaux, J., Biserte, G. and Bazin, H. (1980) "The differential enzyme sensitivity of rat IgG subclasses to papain and pepsin". Mol. Immunol. 17, 469.
47. Jefferis, R., Weston, P.D., Stanworth, D.R. and Clamep, J.R. (1968) "Relationship between the papain sensitivity of human γ -G immunoglobulins and their heavy chains subclass". Nature 219, 646.

48. Virella, G. and Parkhouse, R.M.E. (1971) "Papain sensitivity of heavy chain subclasses in normal human IgG and localization of antigenic determinant for the subclasses". *Immunochemistry* 8, 243.
49. Butler, J.E. and Kennedy, N. (1978) "The differential enzyme susceptibility of bovine immunoglobulin G₁ and G₂ to pepsin and papain". *B.B. Acta* 535, 125.
50. Micusan, V.V. and Borduas, A.G. (1975) "Papain hydrolysis of goat IgG immunoglobulins: a mean of subclasses characterization". *Immunochemistry* 12, 345.
51. Wang, A.C. and Wang, I.Y. (1977) "Cleavage sites of human IgG₁ immunoglobulin by papain". *Immunochemistry* 14, 197.