

La estructura de las inmunoglobulinas de peces

M.C. Sánchez Torres y J. Coll

Departamento de Sanidad Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, CRIDA 06. Madrid.

ESTRUCTURA GENERAL

Los peces existentes en la actualidad pueden dividirse en: peces sin mandíbulas (agnatos), como las lampreas; peces cartilaginosos (elasmobranchios), como las rayas y los tiburones, y peces óseos (entre los que se encuentran los teleósteos), como la trucha, la carpa y la mayoría de los peces de importancia comercial en acuicultura.

En todos estos grupos se ha podido demostrar la presencia de polímeros de la unidad monomérica típica de las Inmunoglobulinas (Ig) de mamífero, consistente en 2 cadenas

pesadas y dos ligeras, como las moléculas específicamente inducidas por la inyección de antígenos¹. Las Ig del suero se han estudiado en muchas de estas especies. Los resultados permiten las siguientes generalizaciones:

1) Los peces sin mandíbulas tienen Ig poliméricas, pero no asociadas covalentemente; las cadenas J no se detectan²; 2) los peces cartilaginosos tienen Ig pentaméricas, diméricas y monoméricas; se ha descrito la existencia de una segunda clase de Ig³; 3) las Ig pentaméricas se encuentran en asociación con cadenas J⁴⁻⁶, y 4) los peces óseos tienen Ig

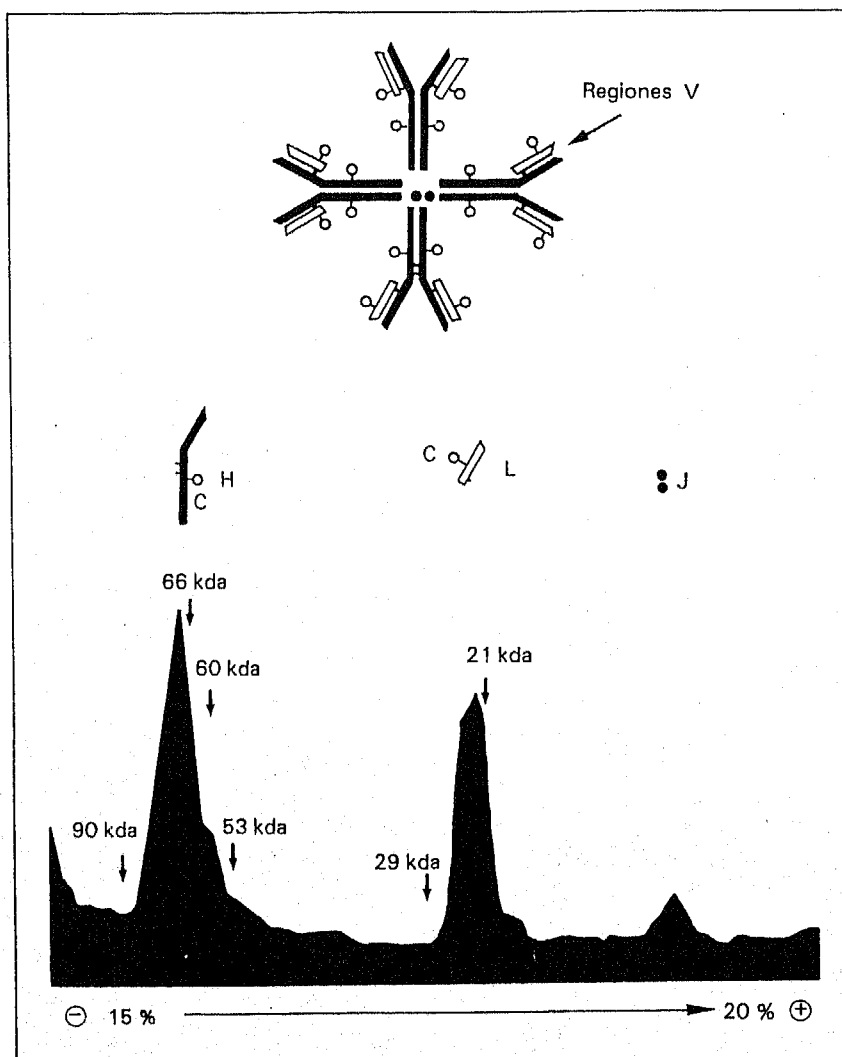


Fig. 1. Densitometría de inmunoglobulinas de trucha separadas por electroforesis en gradiente de poliacrilamida en presencia de SDS y mercaptoetanol. H: cadenas pesadas; L: cadenas ligeras; J: cadena J; V: regiones variables; C: hidratos de carbono.

Correspondencia: J. Coll Morales.
c/ Embajadores, 68. 28012 Madrid.

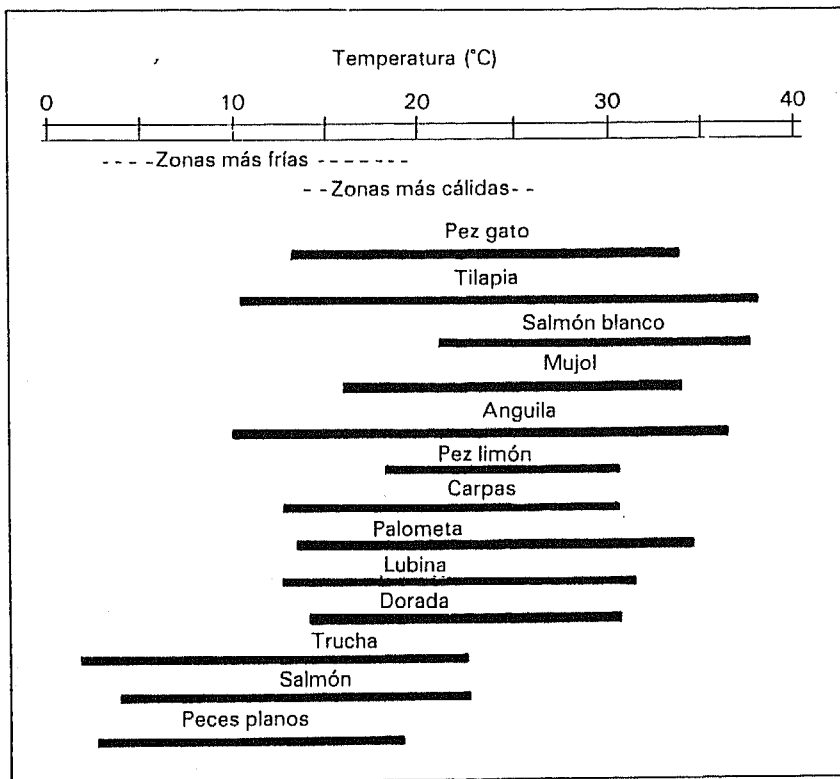


Fig. 2. Rangos de temperaturas de supervivencia y óptimas de las especies importantes en acuicultura. La dependencia de la biología de los peces con la temperatura puede definirse por los siguientes criterios: temperaturas letales (mínima y máxima), temperatura óptima de crecimiento, rango de temperaturas de crecimiento, temperatura óptima de conversión del alimento, temperatura de reproducción y temperaturas óptimas de desarrollo, principalmente. Los valores y límites de cada una de estas temperaturas no son definidos y varían mucho con otros factores de calidad del agua y con distintas razas o variedades de la misma especie, además de otros factores, como tiempo, temperatura de aclimatación, etc.¹³. En la trucha, por ejemplo, el máximo de producción de anticuerpos in vitro está a 10 °C¹⁵. La temperatura óptima de cada especie está alrededor del nombre. Las líneas negras horizontales marcan las temperaturas letales.

tetraméricas y algunos diméricas y monoméricas; las cadenas J no siempre se detectan⁷⁻¹¹.

Aunque todos los vertebrados son capaces de formar anticuerpos, la diversidad de clases parece estar restringida en la mayoría de los peces¹. Prácticamente sólo una clase principal definida por una cadena pesada de 70 kilodaltons (kda) (análoga a la cadena μ de las IgM de mamíferos) está presente en peces, mientras que, al menos, una clase adicional se encuentra en todos los grupos de vertebrados. En todos los peces, las Ig mayoritarias están formadas por pentámeros o tetrámeros del clásico monómero constituido por 2 cadenas pesadas (H), dos cadenas

ligeras (L) y una cadena J detectable o no. Es decir, en general se ajustan a la fórmula $(H_2L_2)_n J$. Por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y mercaptoetanol todos estos componentes pueden ser separados por completo (fig. 1).

Debido a que los peces son animales cuya temperatura corporal depende de la del medio ambiente en el que viven, la temperatura ambiente influye en todos sus procesos metabólicos, incluyendo la respuesta inmune. Más aún, no sólo parece que influye la temperatura, sino también la estación del año¹².

A cada especie¹³ le corresponden unos rangos de temperatura óptima (fig. 2), por lo que los resultados de

los experimentos deben tener siempre presente dichas condiciones térmicas¹⁴. Asimismo, la temperatura óptima de producción de anticuerpos *in vitro* varía con la especie. Así, para la trucha, es de 10 °C, mientras que para peces de agua caliente, tales como el pez gato o la carpa, la temperatura óptima es de unos 20 °C¹⁵⁻¹⁷.

La proporción entre respuestas primarias y secundarias no alcanza los altos niveles de los mamíferos (alrededor de 10 en peces *versus* 100 en mamíferos). Rijkers et al¹⁸ demostraron que a 18 °C las carpas producen una respuesta secundaria que no se incrementa respecto de la primaria y que sólo se diferencia de ésta por su menor período de latencia y su mayor duración. A 20 °C la respuesta secundaria supera a la primaria en unas 10 veces y a 24 °C la proporción es mayor de 50^{19,20}.

En este trabajo se pasará revisión a las cadenas pesadas (H) determinantes de la clase de Ig, a las cadenas ligeras (L), a la cadena J de las Ig poliméricas, a la región variable (V), determinante del repertorio de uniones posibles con los antígenos, y a la porción de hidratos de carbono.

LAS CADENAS PESADAS (H)

Las Ig del suero de peces se caracterizan por tener una sola clase de cadenas pesadas. Estas cadenas tienen 70 kda de peso molecular como las cadenas pesadas de la IgM de mamíferos. Sólo en algunos peces como en las rayas, se han podido aislar Ig de suero con cadenas pesadas de unos 50 kda parecidas a la IgG de mamíferos. Las concentraciones en suero fueron de 3,9 mg/ml para las IgM y 0,07 mg/ml para las IgG³.

La estructura de las Ig del suero de peces cartilaginosos ha sido estudiada principalmente en tiburones⁴⁻⁶. El aislamiento y la caracterización serológica y fisicoquímica de las Ig ha permitido aislar Ig de alto (185 kda) y de bajo (75 kda) peso molecular, pero todas pertenecientes a la misma clase (cadena pesada de 70 kda). Las Ig estudiadas poseen un alto grado de similitud en términos de reactividad cruzada serológica

tanto por inmunodifusión como por ELISA, composición de aminoácidos, secuencias parciales de aminoácidos y composición de hidratos de carbono⁵. Tanto por técnicas de electroforesis como por ultracentrifugación, se ha llegado a la fórmula $(H_2L_2)_5$. La naturaleza pentamérica de las Ig del suero de los peces cartilaginosos ha sido confirmada por microscopía electrónica³.

El estudio de la estructura de las Ig en suero, mucus y bilis se ha llevado a cabo principalmente en el pez óseo marino sargo, *Archosargus probatocephalus*²¹⁻²⁴. La concentración de Ig sólo era abundante en el suero (3 mg/ml), necesitando radioyodización para la detección de las Ig de mucus y de bilis (0,09 mg/ml). Las Ig se aislaron por filtración en gel y cromatografía de DEAE, identificándose con un antisuero anti-Ig de sargo de alto peso molecular (APM). Por ultracentrifugación y electroforesis en SDS pudo demostrarse la existencia de Ig de alto (165, 700 kda, Ig-APM) y de bajo (65, 140 kda Ig-BPM) peso molecular. El peso molecular de las cadenas H totalmente reducidas de las Ig-APM fue de 70 kda, mientras que el de las Ig-BPM fue de 45 kda. Las cadenas L reducidas eran siempre de 25 kda (fig. 3). Las Ig-APM en geles en presencia de SDS se disociaban en dos componentes: uno de 700 kda (tetrámeros ligados por puentes disulfuro) y otro de 350 kda (procedentes de dos dímeros ligados por uniones no covalentes). Las Ig-BPM en geles en presencia de SDS estaban formadas exclusivamente por dímeros de 70 kda ligados uno a otro de forma no covalente y constituidos por una cadena H y otra L²¹. La Ig aislada del mucus era muy semejante a la descrita para la Ig-APM del suero. Sin embargo, el dímero de 350 kda podía disociarse a su vez por cromatografía en DEAE en dos subpoblaciones, una de las cuales tenía asociado covalentemente un péptido de 95 kda. Este péptido podría ser análogo al componente secretor asociado a las Ig secretoras en mamíferos. En bilis se descubrió una Ig-APM, pero diferente de aquellas halladas en suero y mucus. Se presenta como un dímero de 320

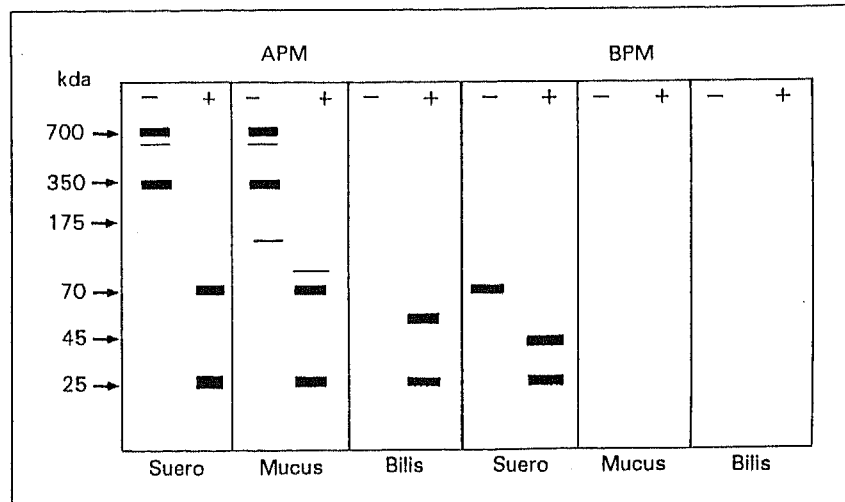


Fig. 3. Esquema de los geles de poliacrilamida en presencia de SDS y +/- betamercaptoetanol de las Ig del sargo. Las Ig se aislaron por cromatografía de filtración en agarosa A-5 m, definidas según su reacción con un anticuerpo anti-Ig de sargo de alto peso molecular aislado previamente²¹⁻²³. Las Ig de mucus y bilis se analizaron después de radioyodización debido a su baja concentración. Todos los geles se llevaron a cabo en 4 % de concentración de poliacrilamida. Por ultracentrifugación y filtración en gel, las Ig tenían un peso molecular de 165, 700 kda (APM) y de 65, 140 kda (BPM). APM: alto peso molecular; BPM: bajo peso molecular.

kda en condiciones fisiológicas, comprobado por datos de filtración en gel y análisis por electroforesis de inmunoprecipitados. En presencia de SDS existe predominantemente en formas monoméricas de 160 kda, lo que sugiere que la Ig de la bilis se muestra como un dímero formado por dos monómeros unidos entre sí a través de enlaces no covalentes. Después de la reducción con mercaptoetanol se observa que la Ig biliar está compuesta de 2 cadenas polipeptídicas H y L. La cadena H es de 55 kda y la cadena L tiene el mismo peso molecular que las del suero, 25 kda.

Inyectando Ig-APM e Ig-BPM, marcadas con radioisótopos, en sargo, pudo demostrarse que las Ig del mucus y de la bilis no son transferidas desde el suero²⁴. El interés de las Ig de mucus radica en que muy probablemente ésta sea la primera línea de defensa de los peces y es de interés su conocimiento para la obtención de vacunas²⁵⁻²⁸.

Los pocos estudios existentes de Ig en membranas de linfocitos de peces se han centrado en la demostración de su presencia por inmunofluorescencia y en la caracterización

de su estructura por radioyodización²⁹.

Todos los linfocitos de peces (en timo, bazo, sangre y pronefros) muestran una típica reacción positiva con anticuerpos policlonales de conejo frente a Ig sérica³⁰. Este resultado difiere de las observaciones frecuentes en aves y mamíferos, en las que sólo los linfocitos B son positivos para Ig de membrana. Una posible explicación de este hecho sería la presencia de antihidratos de carbono en los antisueros utilizados³¹. Por ello se han utilizado anticuerpos monoclonales anti-Ig para examinar más a fondo esta cuestión. Los anticuerpos monoclonales frente a Ig de pez gato y carpa reaccionaron sólo con una subpoblación de linfocitos en estos peces, sugiriendo que puede existir una posible dicotomía de células en base a la expresión de Ig en membranas^{32,33}. De Luca³⁴ obtuvo un monoclonal anti-Ig de suero de trucha purificada por cromatografías de filtración en gel e intercambio iónico que no iba dirigido a un hidrato de carbono. Mediante técnicas de inmunofluorescencia y *panning* demostró que este mAb separaba a los linfocitos en dos sub-

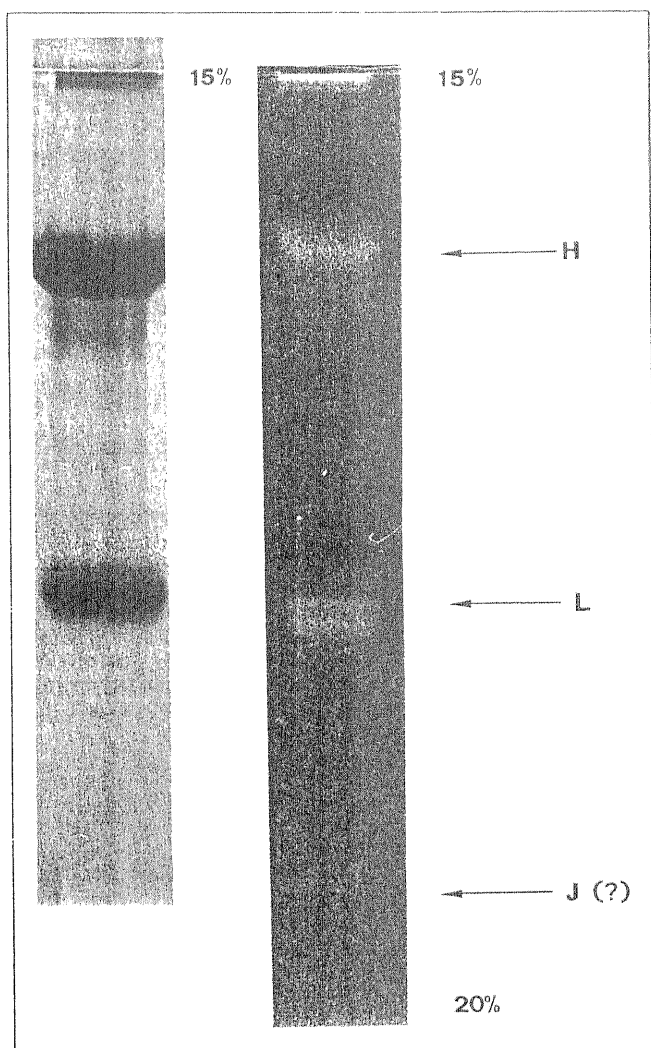


Fig. 4. Inmunoglobulinas de trucha separadas por electroforesis en 15 % o en gradiente del 15 % al 20 % de poliacrilamida en presencia de SDS y mercaptoetanol³⁸. H: cadenas pesadas; L: cadenas ligeras; J: cadena J.

poblaciones. La población IgM + era capaz de responder *in vitro* a ensayos mitogénicos con LPS, mientras que la respuesta a concanavalina A no se alteraba al retirar las células IgM +. Por analogía con la relación establecida en mamíferos entre células B y respuesta mitogénica a LPS se podría concluir que la población reconocida por este monoclonal es del tipo B. Estos resultados no descartan la presencia de Ig o una molécula similar en las membranas de células T, ni tampoco demuestran su existencia.

En algunos casos se ha marcado, extraído y caracterizado la Ig de membrana. En el caso de la carpa se ha demostrado que la cadena H de la Ig de membrana tiene un peso molecular de 10 kda menor que la del

suelo³⁵. Otros estudios son muy parciales y no aportan más detalles de tipo estructural²⁹.

CADENAS LIGERAS (L)

Las cadenas L de los peces cartilaginosos y óseos tienen un peso molecular de entre 20 y 26 kda por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y con completa reducción de los puentes de disulfuro²⁻¹¹. Solamente en el caso de los peces óseos: pez gato^{36,37} y trucha³⁸ se han podido separar las cadenas L en especies moleculares de distinto peso molecular. Esta separación es posible en el pez gato utilizando geles de 10 % de poliacrilamida³⁶, mientras que en la

trucha hay que utilizar gradientes de poliacrilamida del 15-20 % (fig. 4). La necesaria utilización de la mayor resolución de los geles en gradientes de poliacrilamida para detectar estas variantes es quizá la razón por la cual no se hayan descrito en otros peces.

En los peces cartilaginosos no se han detectado clases de cadenas L. Las cadenas L aisladas de Ig total de tiburones individuales tienen una composición de aminoácidos muy similar, péptidos generados por bromuro de cianógeno idénticos y una heterogeneidad similar por isoelectroenfoque³⁹. Los mapas peptídicos tras digestiones con tripsina indican que las cadenas L tienen regiones constantes y variables como las que aparecen en mamíferos⁴⁰.

En los peces óseos parece que hay indicios de la existencia de clases de cadenas L³⁶. Las cadenas L del pez gato son claramente heterogéneas por tres criterios. En primer lugar, las cadenas L difieren en peso molecular: 26, 24 y 22 kda; en segundo, el hapteno dinitrofenil en el pez gato parece inducir preferentemente Ig con cadenas L de 24 y 22 kda, mientras que con fluoresceína se encuentran las tres formas en una proporción similar. En tercer lugar, las cadenas L son antigénicamente diferentes por los anticuerpos monoclonales G y F. El G sólo identifica la Ig que contiene la cadena L de 26 kda y el F reconoce la Ig que contiene las dos formas de menor peso molecular, 22 y 24 kda.

Por ensayos ELISA se demostró que estos dos monoclonales se unían preferentemente a las cadenas L aisladas, así como que las cadenas L identificadas por un monoclonal no reaccionaban con el otro monoclonal. Estos estudios se confirmaron por experimentos con columnas de afinidad y con inmunoprecipitación. Estos dos monoclonales eran aditivos cuando se utilizaban juntos para fraccionar Ig que contenía los dos tipos de cadenas L. Cuando se analizaron las cadenas L identificadas por los monoclonales G y F por mapeos peptídicos se obtuvieron algunas diferencias entre ellas. Por lo tanto, las cadenas L del pez gato presentan diferencias en: masa relativa, crite-

rios antigénicos y composición estructural, aunque en estas investigaciones no quedó excluida una posible relación precursor-producto entre ellas.

En todos los sueros individuales examinados del pez gato se encontró Ig reconocida por los dos monoclonales. Estos análisis también demostraron la proporción relativa de los dos tipos de cadenas L: 60 % para la definida por F y 40 % para la definida por G. En un trabajo posterior, Lobb³⁷ trató de establecer si había o no una expresión diferencial de alguna de estas cadenas en anticuerpos inducidos por dinitrofenil en el pez gato. Los resultados indicaron que si bien los anticuerpos tempranos (1-2 semanas) producidos por la primera inmunización contenían cantidades significativas (20 %) de cadenas G, la gran mayoría (90 %) de los anticuerpos producidos después (entre 3 semanas y 1 año) correspondían al isotipo F. El dominio de F en las poblaciones de anticuerpos antidinitrofenil fue observado asimismo cuando el dinitrofenil se conjugaba con distintas proteínas *carrier* en la inmunización. Igualmente, se observó que las especies de 24 y 22 kda del isotipo F se encontraban en distintas cantidades en las numerosas poblaciones de anticuerpos examinadas. En muchas de ellas sólo había esencialmente una de esas especies, pero el hecho de que se tratase de una u otra variaba según cada animal individual. Se desconocen aún las bases funcional y estructural de la diferencia entre las dos cadenas.

CADENA J

Una característica distintiva de las Ig poliméricas de mamíferos consiste en la presencia de la cadena J⁴⁰⁻⁴². La cadena J viene determinada por las siguientes propiedades⁴³: 1) Tamaño de unos 10-15 kda, determinado por su migración en filtración en gel y en electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS. 2) Carga positiva según su migración en electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo urea a pH alcalino. 3) Aislamiento de la cadena J a partir de la Ig polimérica por reducción débil y alquilación en

ausencia de agentes desnaturizantes, ya que sólo los enlaces internos de las cadenas H y L son resistentes a la reducción en estas condiciones. 4) Existe una molécula de cadena J por cada molécula de Ig polimérica (medible por carboximetilación con precursores radiactivos). 5) Composición de aminoácidos rica en lisina y arginina y secuencia 77 % idéntica entre ratón y hombre.

Los estudios sobre la estructura y posible función (polimerización de las Ig, transporte a través del epitelio, síntesis de Ig, etc.) de la cadena J de peces son muy escasos. Los ensayos realizados hasta la actualidad demuestran que tanto en elasmobranchios como en teleosteos existen especies que poseen cadena J con las características electroforéticas conocidas hasta ahora, como el tiburón leopardo (*Triakis semifasciata*), pez gato (*Ictalurus nunctatus*) o sargo (*Archosargus probatocephalus*), así como especies que no la poseen como el tiburón nurse (*Ginglymostoma cirratum*), aguja (*Lepisosteus osseus*) y el pez espátula (*Polydon spathula*)^{44, 45}.

Los análisis electroforéticos en geles de urea²¹, indican que la Ig-APM del sargo contiene un péptido de rápida movilidad anódica (característica de la cadena J). Por su porcentaje densitométrico parece probable que sólo una de las dos subpoblaciones de Ig-APM contengan la cadena J. En un trabajo posterior, Kobayashi et al⁷ estudian la existencia de cadena J de otro teleosteo, el salmón del Pacífico, tanto por electroforesis en gel de urea como por tests inmunológicos con antisueros frente a las cadenas J de humanos y pollos. En el caso de este salmón no se detecta la presencia de cadena J según los patrones electroforéticos conocidos, si bien los autores no descartan su existencia en una forma con distinto patrón. La ausencia o una abundancia menor de la esperada deben interpretarse con precaución, ya que la cadena J es muy susceptible a proteólisis⁴³. La no detección en geles de poliacrilamida puede también deberse al empleo de concentraciones de poliacrilamida demasiado bajas³⁷. Un polipéptido de 11-12 kda se detecta asociado a las

Ig de trucha, aisladas por cromatografía de afinidad sobre anticuerpos monoclonales inmovilizados y separados por electroforesis desnaturizante en gradientes de poliacrilamida del 15 al 20 % (fig. 4). Además, la pequeña cantidad y tamaño de la cadena J implica que para su detección deban sobrecargarse los geles.

REGIÓN VARIABLE (V)

La región variable se define en Ig de mamíferos por parte de la porción aminoterminal de las cadenas H y L. La secuencia de aminoácidos varía de unas moléculas a otras y es la responsable de la unión a los antígenos. El conjunto de regiones V distintas que posee un individuo se denomina repertorio. El repertorio de Ig en mamíferos puede reconocer alrededor de 10⁷ determinantes antigénicos y un único determinante puede estimular 10³ regiones V distintas.

La estructura de la región variable de las Ig de peces (diversidad de anticuerpos) se ha estudiado por sondas de DNA, por isoelectroenfoque de las Ig, por estudios de afinidades y por análisis idiotipo-antiidiotipo.

La organización de los genes V en un pez cartilaginoso, el tiburón *Heterodontus*⁴⁶⁻⁴⁸, se ha estudiado mediante una sonda de DNA obtenida de la cadena H, región V del ratón. La secuencia completa del gen V del tiburón aislado por hibridización con dicha sonda exhibe una homología muy fuerte con la región V del ratón. Además, demostró que los segmentos que articulan la región V con la región constante de la cadena H del tiburón se encuentran agrupados en grupos de 10 kilobases (kb), lo que a su vez pudiera reducir las posibilidades de combinaciones de estos segmentos (combinaciones que son una fuente de diversidad en mamíferos).

La emigración en isoelectroenfoque (punto isoelectrico) de cada cadena individual depende de la secuencia específica de su dominio variable. En tencas, carpas y carpines las Ig naturales antidinitrofenol se purificaron y se analizaron en condiciones reductoras por isoelec-

troenfoque⁴⁹. En un pH entre 5 y 7, aparecían unas 30-40 bandas con asombrosa similitud entre las distintas especies. En un estudio similar realizado en truchas salvajes y en truchas obtenidas por autofecundación, las Ig inducidas por inyección de dinitrofenol se purificaron por cromatografía de afinidad y se analizaron después por isoelectroenfoque en condiciones reductoras y por *immunoblotting*, utilizando un anticuerpo monoclonal anticadena H de Ig de trucha⁵⁰. En un pH entre 3 y 7 aparecían unas 15-20 bandas que variaban bastante en cuanto a su posición entre individuos. Esta variación disminuía en las truchas obtenidas por autofecundación. El análisis paralelo de una Ig monoclonal de ratón daba lugar a unas 7 bandas de cadena H entre pH 6 y 7. Los autores concluyen que la posible herencia del repertorio de Ig podría utilizarse para la selección genética de truchas resistentes a enfermedades. Sin embargo, estos experimentos son difíciles de interpretar, ya que en la identificación de las bandas debe tenerse en cuenta que el análisis no se efectúa en moléculas individuales, sino en cadenas H y L, puede haber microheterogeneidad debida a la pérdida de amidas, composición de hidratos de carbono y modificaciones químicas postraduccion. Todo ello puede redundar en una mayor heterogeneidad aparente.

En mamíferos se produce un incremento en la afinidad de sus anticuerpos durante la respuesta inmune, que está acompañada por un cambio en la clase de Ig. En peces, los trabajos llevados a cabo con la finalidad de determinar el incremento de afinidad de los anticuerpos frente a la inmunización con distintos antígenos han mostrado resultados variables. Voss et al⁵¹ caracterizan las propiedades de unión de la Ig tetramérica presente en el suero de salmón. La determinación de la constante de equilibrio demostró bajas afinidades ($4-5 \times 10^5 M^{-1}$), semejantes a valores observados para otros sistemas de IgM. Además, no había cambios significativos en la constante de asociación durante un período de 120 días tras la inmunización secundaria. Los factores de

avidez generados por la polivalente Ig ($n = 8$) serían suficientes para proporcionar al pez una adecuada protección en su ambiente; en otras palabras, la avidez a través de la polivalencia compensaría la relativamente baja afinidad de cada zona activa del anticuerpo. Sin embargo, otros estudios han encontrado algunas diferencias. Secombes y Resink⁵² encontraron un aumento de la capacidad de precipitación de Ig en la respuesta secundaria de la carpa frente a un antígeno proteico. Lobb⁵³ estudió la heterogeneidad y afinidad de anticuerpos antidinitrofenil, obtenidos en pez gato, a períodos cortos (1-2 meses) o largos (1-2 años) tras la inmunización primaria; este autor observó que las zonas de alta afinidad eran muy homogéneas. Las afinidades de los anticuerpos en ambos grupos eran similares ($10^6 M^{-1}$), pero a períodos cortos los anticuerpos tenían menor afinidad que los encontrados a tiempos más prolongados. En resumen, el aumento de afinidad de las Ig de peces con la inmunización, si existe, es muy pequeño. Ello vuelve a evidenciar una menor diversidad del repertorio de Ig en peces⁵⁴.

Una alta reactividad cruzada entre Ig antidinitrofenil, aisladas de carpas individuales, se demostró mediante suero antiidiotípico. Nuevamente, este resultado indica un repertorio restringido en peces⁵⁵.

HIDRATOS DE CARBONO

Componente obligado de todas las Ig descritas, es frecuentemente olvidado al estudiar su estructura y función. Sin embargo, disponemos de pocos estudios acerca de esta porción de las Ig, especialmente en peces.

Entre los peces cartilaginosos, los hidratos de carbono constituyen un 9-18 % del peso molecular de la Ig⁵. Se han identificado fucosa (0,1-0,5 %), manosa (2,4-4,3 %), galactosa (1,6-4,7 %), glucosamina (5-8,6 %) y ácido siálico (0,3-0,47 %). La importancia que la presencia de hidratos de carbono puede tener para los estudios que utilizan antisueros anti-Ig fue puesta de manifiesto por Yamaga et al³¹ al

descubrir un alto contenido en anti-fucosa en los antisueros de conejo, obtenidos con Ig purificada de suero de trucha. En los pocos estudios que se han realizado utilizando anticuerpos monoclonales anti-Ig, se ha tenido en cuenta descartar a aquellos que pudieran reaccionar con los hidratos de carbono^{34, 35}.

PERSPECTIVAS EN LA INVESTIGACIÓN

En contraste con los estudios sobre Ig de mamíferos, aquellos acerca de Ig de peces están distribuidos entre varias especies, algunas realmente exóticas. Es por ello por lo que resulta difícil hacerse una idea clara sobre la inmunología humoral de, al menos, un tipo de pez. Si se desea conocer, por ejemplo, información de idiotipos habrá que acudir a la carpa; si de variación de cadenas L, al pez gato; si de posibles isotipos, a la raya; si de variaciones entre Ig de bilis, mucus y suero, al sargo, etc. A menudo, se generalizan los resultados para peces, pero parece razonable que no se puedan comparar las lampreas (grupo de peces no mandibulados), con los tiburones y rayas (peces cartilaginosos) o con la trucha y el pez gato (peces óseos), aunque todos formen parte del grupo de los peces. Por otra parte, para cada uno de los peces se dispone de pocos estudios si se comparan, por ejemplo, con los existentes para ratón u hombre. Quizá deberían concentrarse esfuerzos en una o dos especies representativas. La dispersión de investigaciones y de modelos, de otro modo, seguirá constituyendo un serio *handicap* para lograr entender el funcionamiento del sistema inmunológico de los peces, tanto para un planteamiento básico en los estudios filogenéticos⁶⁰, como para un planteamiento más aplicado para producción de proteína en acuicultura¹³.

Es frecuente la justificación filogenética de los trabajos en este campo, si bien la comparación entre las Ig de las formas que se conservan en la actualidad conduce a conclusiones poco ortodoxas. Por ejemplo, la existencia de dos clases de

cadena pesada en un vertebrado considerado como muy primitivo, un pez cartilaginoso³, hace pensar que estos peces han conseguido un sistema humoral más avanzado que los peces óseos. Los peces cartilaginosos se consideran más primitivos que los óseos, pero estos resultados, así como la posesión de una Ig pentamérica más semejante a la IgM de mamíferos que la Ig tetramérica de los peces óseos, pone en duda este concepto. La aparición de diversificación de Ig, al contrario de lo que se piensa mayoritariamente, puede ser un fenómeno mucho más anterior⁵⁹.

La capacidad de un organismo para producir una innumerable cantidad de respuestas inmunológicas, el repertorio, y la generación de la diversidad de anticuerpos ha sido uno de los aspectos más provocativos en biología molecular. ¿Cómo se genera esa diversidad? La compleja estructura de cada cadena que forma parte del anticuerpo da lugar a otra pregunta: ¿en qué consiste la relación entre el gen y su proteína?

En peces, las inmunoglobulinas están empezando a ser estudiadas casi siempre por homología con Ig de mamíferos. ¿Se han conservado los mismos mecanismos para generar la diversidad de anticuerpos? ¿Por qué la Ig de peces es polimérica de tipo M? ¿Por qué no existen mecanismos para producir Ig monoméricas de tipo G con una mayor afinidad por el antígeno y con memoria? ¿Qué ventajas le aporta esa multivalencia a un organismo en estrecho contacto con el medio acuático?

Es difícil obtener más información detallada acerca de la estructura de las Ig de peces mediante el examen de las proteínas debido a su heterogeneidad. Proteínas de mielomas o anticuerpos monoclonales todavía no se han encontrado en estos animales. Sin embargo, los métodos y tecnologías del DNA recombinante pueden ser un nuevo medio para examinar este problema. La información acerca de sus secuencias puede ser obtenida a través de genes clonados más fácilmente que a través de las proteínas. Los estudios en el DNA pueden aportar, además, pruebas sobre la conservación de la

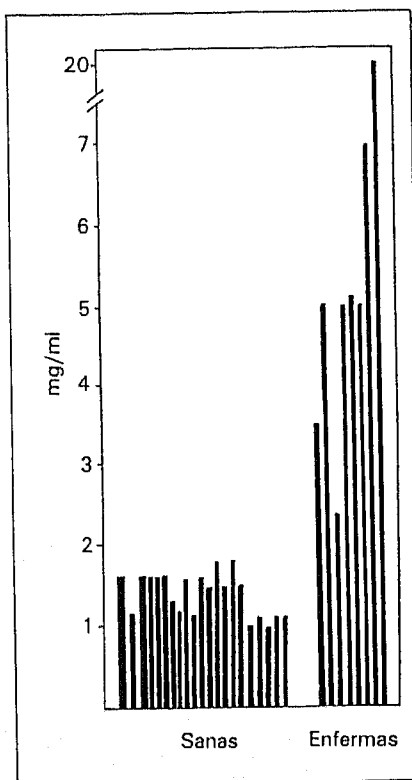


Fig. 5. Ig total en suero de truchas *Salmo gairdneri* sanas y procedentes de una piscifactoría con necrosis pancreática. La concentración de Ig en suero se midió por ELISA, tomando como referencia Ig de trucha purificada por filtración en gel y cromatografía en DEAE⁵⁸. Resultados similares se han descrito mediante inmunodifusión radial con truchas sanas y enfermas⁵⁶.

organización de genes y su reagrupamiento, así como la regulación del cambio de clase aparentemente ausente en peces.

La cuantificación de Ig en suero se está empezando a considerar como un posible marcador del estado de salud de un pez⁵⁷⁻⁶⁰. Recientemente, Olessen y Jorgensen⁵⁶ comprobaron por inmunodifusión radial que las truchas procedentes de piscifactorías con enfermedades tenían 3 a 4 veces más nivel de Ig en el suero que las truchas sanas. En nuestro laboratorio, y mediante un ELISA basado en anticuerpos policlonales hemos comprobado resultados muy similares (fig. 5). En la actualidad, se está desarrollando el test con una batería de 22 anticuerpos monoclonales. La caracteriza-

ción de estos anticuerpos monoclonales y la definición estructural que se alcanza con su utilización permitirán en el futuro un mayor conocimiento de la estructura de las Ig de trucha, de su cuantificación en suero y de las poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune de la trucha durante las infecciones.

El estudio de la defensa inmunitaria de los peces es de importancia capital en el desarrollo de la acuicultura como una de las fuentes de proteína más importantes para el futuro de la humanidad. Los problemas patológicos, que ya aparecen en las especies sometidas a cultivo (especialmente las virosis de salmónidos), constituyen un ejemplo real de la importancia que puede tener el desarrollo de vacunas para peces. No obstante, actualmente las vacunas presentan problemas debido, en gran parte, al desconocimiento de los mecanismos de defensa inmunitaria de los peces. El estudio de las estructuras de las Ig es el inicio del conocimiento de estos mecanismos.

Bibliografía

1. Dorson M. Role and characterization of fish antibody. Int Sympos Fish Biologics: serodiagnostics and vaccines. Leetown, EE.UU., 1981; 49:307-319.
2. Raison RL, Hull CJ, Hildemann WH. Characterization of immunoglobulin from the Pacific hagfish, a primitive vertebrate. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75:5.679-5.682.
3. Kobayashi K, Tomanaga S, Kajii TA. Second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of a cartilaginous fish, the skate raja *Kennojei*: isolation and characterization. Mol Immunol 1984; 21:397-404.
4. Morrow WJW, Harris JE, Davies D, Pulsford A. Isolation and partial characterization of dogfish (*Scyliorhinus canicula*) antibody. J Mar Biol Ass UK 1983; 63:409-418.
5. Rosenshein IL, Marchalonis JJ. The immunoglobulins of carcharhine sharks: a comparison of serological and biochemical properties. Comp Biochem Physiol 1987; 86:737-747.
6. Sánchez GA, Gajardo MK, Ioanes AE. IgM-like natural hemagglutinin from ratfish serum: isolation and physico-chemical characterization (*Callorhynchus callorhynchus*) Dev Comp Immunol 1980; 4:667-678.

7. Kobayashi K, Hara A, Takano K, Hirai H. Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Mol Immunol* 1982; 19:95-103.
8. Ourth DD. Purification and quantitation of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) immunoglobulin. *MJ Ichthyol* 1986; 3:140-143.
9. Vilain C, Wetzel MC, Du Pasquier L, Charlemagne L. Structural and functional analysis of spontaneous antinutritional antibodies in three cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and tench (*Tinca tinca*). *Dev Comp Immunol* 1984; 8:611-622.
10. Warr GW. Immunoglobulin of the toadfish, *Spheroideus glaber*. *Comp Biochem Physiol* 1983; 76:507-514.
11. Clem LW, MacLean WE. Phylogenetic of immunoglobulin structure and function. VII. Monomeric and tetrameric immunoglobulins of the margate, a marine teleost fish. *Immunology* 1975; 29:791-799.
12. Yamaguchi N, Teshina C, Kurasige S, Saito T, Mitsuhashi S. Seasonal modulation antibody formation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). En: Solomon, JB ed. Aspects of developmental and comparative immunology. 1st Congress of Dev Comp Immunol 1980; 483-484. Pergamon Press.
13. Coll JM. Acuicultura marina animal. Ed. Mundi Prensa, Madrid, 1983.
14. Avtalion RR, Wojdani A, Malik Z, Shahrabani R, Duczynimer M. Influence of environmental temperature on the immune response in fish. *Curr Top Microbiol Immunol* 1973; 61:1-35.
15. Van Ginkel FW, van Muiswinkel WB, Merchany B, Lizzio EF, Dixon OW, Anderson DP. Temperature comparisons for antibody production *in vitro* by plaque-forming cells from trout, *salmo gairdneri* (Richardson) and mice. *Fish Soc Br Isles* 1984; 5:264-272.
16. Clem LV, Faulmann E, Miller NW, Ellsaesser C, Lobb CJ, Cuchens MA. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects on *in vitro* and *in vivo* temperatures on mitogenic responses of channel cat fish lymphocytes. *Dev Comp Immunol* 1984; 8:313-322.
17. Bureson EM, Frizzell LJ. The seasonal antibody response in juvenile summer flounder (*Paralichthys dentatus*) to the hemoflagellate trypanoplasma bullock. *Vet Immunol Immunopathol* 1986; 12:395-402.
18. Rijkers GT, Wiegerinck JAM, van Oosterum R, van Muiswinkel WB. Temperature dependence of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). En: Solomon JB, ed. Aspects of developmental and comparative immunology. 1st Congress of Dev Comp Immunol, Pergamon Press, 1980; 477-482.
19. Rijkers GT. The immune system of cyprinid fish. Thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands, 1980.
20. Desvaux FX, Charlemagne J. They goldfish immune response characterization of the humoral response to particulate antigens. *Immunology* 1981; 43:755-762.
21. Lobb CJ, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. X. Humoral immunoglobulins of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*. *Dev Comp Immunol* 1981; 5:271-282.
22. Lobb CJ, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XI. Secretory immunoglobulins in the cutaneous mucus of the sheepshead (*Archosargus probatocephalus*). *Dev Comp Immunol* 1981; 5:587-596.
23. Lobb CJ, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XII. Secretory immunoglobulins in the bile of the marine teleost: *Archosargus probatocephalus*. *Molec Immunol* 1981; 18:615-619.
24. Lobb CJ, Clem LW. The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus and bile. *J Immunol* 1981; 127:1.525-1.529.
25. Bradshaw CM, Richards AS, Siegel MM. Immunoglobulin M antibodies in fish mucus. *Proc Soc Esp Bio Med* 1971; 136:1.122-1.124.
26. Di Conza JJ, Halliday WJ. Relationship of catfish serum antibodies to immunoglobulin in mucus secretions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1971; 49:517-519.
27. Fletcher TC, Grant PT. Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*) *Biochem J* 1969; 115:65-75.
28. Fletcher TC, White A. Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture* 1973; 1:417-428.
29. Warr GW, Deluca D. Thymocyte plasma membrane of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: associated immunoglobulin and heteroantigens. *Comp Biochem Physiol* 1983; 76:515-521.
30. Warr GW, De Luca D, Marchalonis JJ. Phylogenetic origins of immune recognition: lymphocyte surface immunoglobulins in the goldfish, *Carassius auratus*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; 73:2.476-2.480.
31. Yamaga KM, Kubo RT, Etlinger HM. Studies on the question of conventional immunoglobulin on thymocytes from primitive vertebrates. I. Presence of anticarbohydrate antibodies in rabbit anti-trout Ig sera. *J Immunol* 1978; 120:2.068-2.073.
32. Lobb CJ, Clem LW. Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. *Dev Comp Immunol* 1982; 6:473.
33. Emmrich F, Richter RF, Ambrosius H. Immunoglobulin determinants on the surface of lymphoid cells of carps. *Eur J Immunol* 1975; 5:78-82.
34. De Luca D, Wison M, Warr GW. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to immunoglobulin. *M Eur J Immunol* 1983; 13:546-551.
35. Warr GW, Marchalonis JJ. Lymphocyte surface immunoglobulins of the goldfish differs from its serum counterpart. *Dev Comp Immunol* 1977; 1:15-22.
36. Lobb CJ, Olson J, Clem LW. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish. *J Immunol* 1984; 132:1.917-1.923.
37. Lobb CJ. Preferential expression of catfish light chain immunoglobulin isotypes in anti-dinitrophenyl antibodies. *J Immunogenet* 1986; 13:19-28.
38. Sánchez C, Domínguez J, Coll J. Immunoglobulin heterogeneity in the trout *Salmo gairdneri* (Richardson). *J Fish Diseases* (en prensa).
39. Litman GW, Scheffeld C, Gerber-Jenson B. Immunoglobulin diversity in the phylogenetically primitive shark, *Heterodontus francisci*. I. Suggested lack of structural variation between light chain isolated from different animals. *J Immunogenet* 1980; 7:197-206.
40. Clem LW, Leslie GA. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XIV. Peptide map and aminoacid composition studies of shark antibody light chains. *Dev Comp Immunol* 1982; 6:263-269.
41. Weinheimer PF, Mestecky J, Acton RT. Species distribution of chain. *J Immunol* 1971; 107:1.211-1.212.
42. Beale D. Molecular fragmentation. Some applications in immunology. *Dev Comp Immunol* 1987; 11:287-296.
43. Koshland ME. The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Ann Rev Immunol* 1985; 3:425-453.
44. Klapper DG, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function; characterization of the cysteine-containing peptide involved in the pentamerization of shark IgM. *Dev Comp Immunol* 1977; 1:81-92.
45. Mestecky J, Kulhavy R, Schrohloher RE, Tomana M, Wright GP. Identification and properties of J chain isolated from catfish macroglobulin. *J Immunol* 1975; 115:993-998.
46. Litman GW, Berger L, Murphy K, Litman R, Hinds K, Erickson BW. Im-