

Bisson (Bisson *et al.*, 1983), plantea una utilización indistinta de ambos sistemas para el transporte de glucosa, excepto en los casos en que la levadura no posea sus correspondientes enzimas para la fosforilación de la glucosa, prevaleciendo en estas condiciones el sistema de baja afinidad. Por su parte Serrano (Serrano y De la Fuente, 1974), considera que la existencia de estos dos sistemas está asociada al estado fisiológico de la levadura.

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de una entrada rápida del azúcar, provocando un incremento grande de la vía glicolítica, lo cual desencadena posteriormente los mecanismos de regulación del transporte de glucosa.

La existencia de un mutante con una alta velocidad de transporte de hexosas, (lo cual le impide la utilización de estos azúcares como fuente de carbono) (Alonso y col., 1984), apoya también la idea de un mecanismo regulatorio entre la glicólisis y los sistemas de transporte de hexosas descritos para este género.

REFERENCIAS

- ALONSO, A.; C. PASCUAL; L. HERRERA; J. M. GANCEDO y C. GANCEDO (1984). *Metabolic imbalance in a Saccharomyces cerevisiae unable to grow on fermentable hexoses*. European Journal of Biochemistry, 138, 407-11.
- BISSON, E. L. y G. D. FRAENKEL (1983). *Transport of 6-deoxyglucose in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 155, 995-1000.
- KOBAYASHI, Y. (1973). NEN. LSC. *Applications Laboratory Notes*.
- SERRANO, R. y G. DE LA FUENTE (1974). *Regulatory properties of the constitutive hexose transport system in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biochemistry, 5, 161-171.
- ROMANO, H. A. (1982). *Facilitated diffusion of 6-deoxyglucose in bakers yeast: Evidence against phosphorylation-associated transport of glucose*. Journal of Bacteriology, 152, 1295-1297.
- UMBREIT, W. W.; R. H. BURRIS y J. P. STAUFFER (1964). *Manometric Techniques*, pp. 274. Burgess Publ. Co., Minneapolis. USA.

Elena Martínez¹ y Alberto Alonso²

1) Instituto de Química y Biología Experimental
Ave. 26, No. 1605, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba

2) Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Apdo 6990, La Habana, Cuba

Algunas consideraciones para la identificación del isotipo de inmunoglobulina de los anticuerpos monoclonales murinos obtenidos en líquidos ascíticos malignos

Colega:

El desarrollo del método de obtención de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales (AcM) (Kohler y Milstein, 1975), ha motivado que se le preste mayor atención a las

propiedades físico-químicas y biológicas de las clases y subclases de las inmunoglobulinas murinas, ya que de ahí dependen muchas de sus aplicaciones ulteriores. Es por todos conocido que el ratón posee las clases de inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgE e IgD y las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b, IgA1 e IgA2 (Goodman, 1983), las cuales se encuentran en diversas proporciones en los fluidos biológicos del animal y difieren entre sí por su capacidad de fijar el complemento, atravesar membranas, citofilia, etcétera.

En el vol. 1, No. 3: 29-38, 1984 de su revista Interferon y Biotecnología publicamos un artículo relacionado con la obtención y caracterización del AcM anti-linfocitos T humanos IOR-T1, donde al estudiar los líquidos ascíticos malignos producido por el hibridoma 47/23/F6, utilizando el método de inmunodifusión doble en agar (Ouchterlony y Nielsson, 1978), reportamos que el isotipo de inmunoglobulina de este AcM era una IgG1.

En nuestro laboratorio hemos estado trabajando recientemente con diferentes métodos de purificación de AcM, entre los cuales se encuentra la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharosa CL-4B (*Pharmacia Fine Chem. Suecia*). Este producto tiene la característica de fijar el fragmento Fc de la mayoría de las subclases de la IgG, cuando la columna se encuentra equilibrada con tampón fosfato 0,1 M pH 8,0; posteriormente, al eluir la columna con cambios de pH se logra desprender sucesivamente la IgG1, IgG2a e IgG2b, en el caso del ratón (*Affinity Chromatography. Principles and Methods*, 1983).

Cuando utilizamos este método para purificar el AcM IOR-T1 a partir de líquidos ascíticos malignos, encontramos que el pico mayor de proteínas se obtuvo en la fracción correspondiente a la IgG2a (figura 1), donde resultó estar la actividad del AcM IOR-T1, por su reconocimiento característico sobre células mononucleares periféricas (García *et al.*, 1984).

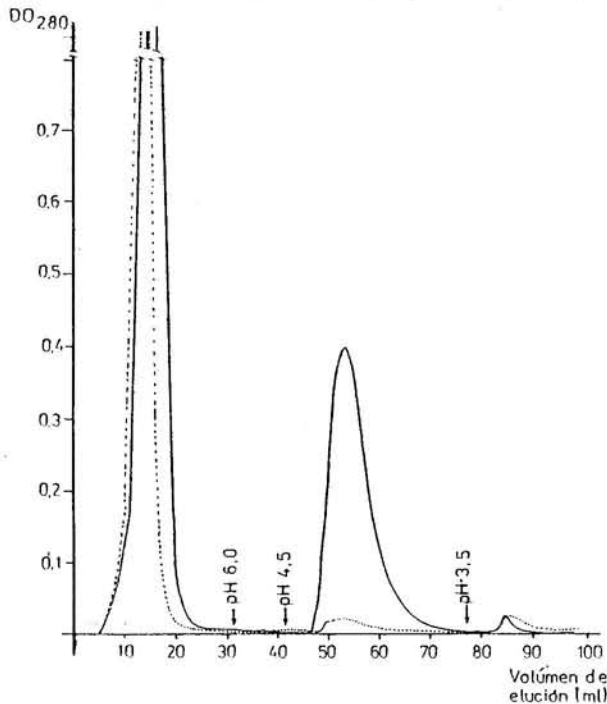


FIG. 1. Cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharosa CL-4B de líquidos ascíticos producidos en ratones inoculados con el hibridoma 47/23/F6 (—) y la línea de mieloma murino P3/X63 Ag8.6.5.3 (.....)

Estos resultados nos hicieron reevaluar el estudio para la determinación del isotipo de inmunoglobulina del IOR-T1.

En primer lugar, verificamos que al realizarle la misma cromatografía de afinidad al líquido ascítico producido por la línea de mieloma parental no secretora P3/X63 Ag8 6.5.3, se obtuvieron los tres picos correspondientes a las subclases de inmunoglobulina murina, aunque en menor cantidad en la fracción correspondiente a la IgG2a con respecto a la fracción equivalente obtenida con el líquido ascítico del IOR-T1 (figura 1).

Es decir, los líquidos ascíticos malignos, y entre ellos los obtenidos con hibridomas, contienen las inmunoglobulinas propias del animal; de hecho es posible obtener grandes cantidades de antiseros policlonales en el ratón, a través de la inducción de tumores ascíticos en animales previamente inmunizados (Brandt *et al.*, 1967; Hronovske, 1978).

En segundo lugar, cuando evaluamos las líneas de precipitación obtenidas en la inmunodifusión doble en agar, al enfrentar los antiseros específicos contra las clases y subclases de inmunoglobulinas murinas (Meloy Lab., USA), observamos que el líquido ascítico del IOR-T1 produce una línea bien definida y otra de bordes difusos. La primera corresponde a las inmunoglobulinas propias del animal y la segunda al AcM, el cual fue identificado definitivamente como una IgG2a.

Por último, los métodos de cromatografía de afinidad con suero de carnero anti-inmunoglobulinas de ratón acoplados a una matriz de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno, utilizado anteriormente para la purificación del IOR-T1 (García *et al.*, 1984), y con proteína A-Sepharosa CL-4B utilizada en este trabajo, no garantizan la separación de los AcM de las inmunoglobulinas propias del animal. Por esta razón, cuando probamos las fracciones correspondientes purificadas, se repitieron las dos bandas de precipitación en la inmunodifusión doble en agar en cada uno de los casos. El criterio que nos llevó anteriormente a realizar una evaluación incorrecta del isotipo de inmunoglobulina del IOR-T1 fue el haber considerado la línea de precipitación definida como la correspondiente al AcM. El hecho de que el IOR-T1 sea una IgG2a, debe ser considerado cuidadosamente cuando se pretenda utilizar *in vivo*, por su capacidad de fijar adecuadamente el complemento, lo cual implicaría la destrucción de los linfocitos T inmunocompetentes.

A pesar de que hay autores que plantean que la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharosa CL-4B no debe ser considerada para la determinación del isotipo de inmunoglobulina de los AcM (Schreier *et al.*, 1980), en nuestro caso particular sí fue de gran utilidad. No obstante, hay que señalar que la proteína A- tiene como desventajas que fija solamente la clase de inmunoglobulina G, y dentro de sus diferentes subclases no fija adecuadamente la IgG1; y por último se ha señalado que las fracciones eluidas con pH 4,5 y 3,5 tienen contaminantes de otras subclases de IgG (Schreier *et al.*, 1980).

Por todas estas razones, actualmente consideramos que para la correcta determinación del isotipo de inmunoglobulina a que pertenece un AcM en estudio, por el método de inmunodifusión doble en agar, es preferible utilizar entre otros el sobrenadante de cultivo diez veces concentrado como mínimo, o fracciones obtenidas de cromatografías de afinidad que tengan el antígeno específico acoplado a la matriz de la columna, o en su lugar fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad con hidroxilapatita, la cual parece ser de gran utilidad para la purificación de AcM (Estudios en curso). Como comentario final hay que señalar que cuando los hibridomas son buenos productores de AcM, puede realizarse una adecuada evaluación del AcM mediante la dilución del líquido ascítico maligno, teniendo siempre en cuenta que los AcM pueden producir una línea de precipitación difusa.

REFERENCIAS

- Affinity Chromatography, Principles and Methods* (1983). Pharmacia Fine Chemicals Handbook, pp 48-52.
- BRANDT, W. E.; E. L. BUESCHER y S. M. HETRICK (1967). *Production and characterization of arboviruses antibodies in mouse ascites fluids*. Amer. J. Trop. Med. Hyg 16: 349.
- GARCIA, C. A., J. V. GAVILONDO, J. F. AMADOR, A. M. VAZQUEZ y A. FERNANDEZ (1984). *Obtención de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales que reconocen células humanas de origen T. II. Caracterización de los anticuerpos monoclonales IOR-T1 e IOR-T2*. Interferón y Biotecnología 1: 29-38.
- GOODMAN, J. W. (1983). *Inmunoglobulinas I: Estructura y Función, en Inmunología básica y clínica*. Ed. D.P. Stites et al. Cuarta edición, capítulo 4: 22-31. Editorial El Manual Moderno S. A., de C.V., México, D. F.
- HRONOVSKÉ, V. (1978). *Preparation of hyperimmune mouse ascitis fluid for serodiagnostic and immunofluorescence evidence of arboviri*. Cs. Epidem 27: 129-136.
- KOHLER, G. y C. MILSTEIN (1975). *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature 256: 495-497.
- OUCHTERLONY, O. y L. A. NIELSSON (1978). *Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Handbook of Experimental Immunology*. Ed. D. M. Weir. pp 196. Blackwell Scientific Publication. Oxford, London, Edimburg, Melbourne.

Carlos A. García Santana
Jefe de la Sección de Inmunología,
Dpto. de Biología
Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología,
29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba