

INMUNOGLOBULINAS G DE CADENAS PESADAS EN LA LECHE DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

**Mirta A. Medina¹, Francisco Fernandez¹⁻², Silvia Saad¹,
Gustavo Rebuffi³ y José Yapur⁴**

¹Fac. de Cs. Naturales e IML – U.N.T. Miguel Lillo 205; 4000, Tucumán, Argentina. Tel-Fax: 0381-4330516, <fisiocompa@sinectis.com.ar>. ²Fundación Miguel Lillo, Tucumán. ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Abrampampa, Jujuy. ⁴Reserva Fitozoológica Carlos Pellegrini, San Pedro de Colalao, Tucumán.

RESUMEN. Los camélidos poseen un tipo especial de IgG constituida por dímeros de cadenas pesadas (H), sin cadenas ligeras. Este tipo, denominado IgG_H, ha sido encontrado en la sangre de las dos especies de camélidos del Viejo Mundo y en la sangre de llama, vicuña y alpaca. El objetivo del presente trabajo fue determinar si el mencionado tipo de IgG se encuentra en la leche de las cuatro especies de camélidos sudamericanos. Para ello se estudiaron muestras de leche de llama, alpaca, vicuña y guanaco mediante PAGE-SDS, inmunoblotting e inmunodot. Los resultados mostraron que todos los camélidos tienen dos tipos de IgG en el lactosuero, la IgG propia de todos los mamíferos y la IgG_H carente de cadenas L. Asimismo se ha descubierto que las IgG_H lácteas se encuentran glicosiladas, como lo están las IgG convencionales de estas especies.

ABSTRACT. Heavy-chain IgG in the milk of South American camelids. Camelids have two kinds of IgG. One is the conventional IgG, similar to that of the rest of mammals. The other is a special type of IgG lacking light chains (IgG_H), which includes only two heavy chains, its molecular weight reaching 96 KDa approximately. Heavy-chain IgG was found in the blood of two Old World camelids species, and in South-American llamas. The aim of this work was to investigate which types of IgG are present in the milk of the four species of South American camelids. In order to achieve this investigation, milk samples of llama, vicuña, alpaca, and guanaco were studied through PAGE-SDS, immunoblotting and immunodotting assays. Results showed that all South American camelids have both immunoglobulins: the conventional IgG, and the heavy-chain IgG, the latter being present in a glycosylated form.

Palabras clave: leche; IgG de cadenas pesadas; camélidos; tilópodos; lactoproteínas

Key words: milk; heavy-chain IgG; camelids; tylopods; lactoproteins.

INTRODUCCIÓN

En la leche de los mamíferos se encuentran los tres tipos principales de inmunoglobulinas (Igs) humorales: IgG, IgM e IgA. Esta última en la forma dimérica secretora. La concentración en que se encuentran cada uno de los tipos de Igs depende de varios factores, entre ellos el estadio de la lactación y el tipo de transferencia

neonatal de anticuerpos de la madre a la cría (placentaria, calostrálica o mixta).

Como es conocido, la estructura básica de las Igs consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H) y dos ligeras (L), unidas generalmente por puentes disulfuros. También se sabe que todas las Igs presentan un cierto grado de glicosilación. De acuerdo a los hallazgos efectuados hasta ahora existe en la sangre

de algunos camélidos un tipo adicional de IgG, la IgG de cadenas pesadas (IgG_H) (Hamers-Casterman et al., 1993; van der Linden, et al., 2000; Muyldermans, 2001). Esta última está constituida por dos cadenas H solamente, con un peso total aproximado de unos 90 KDa. A este tipo de IgG, carente de cadenas L, solamente se la ha encontrado en la sangre de camello, dromedario y llama (Hamers-Casterman et al., 1993; Nguyen et al., 1999).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia y la concentración aproximada de IgG_H en la leche de los camélidos sudamericanos, llama (*Lama glama*), alpaca (*Lama pacos*), vicuña (*Vicugna vicugna*) y guanaco (*Lama guanicoe*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y Obtención de las Muestras

Las muestras de leche de llama (n=6) se obtuvieron de animales pertenecientes a la Reserva Experimental de Horco Molle de la Facultad de Ciencias Naturales (Universidad Nacional de Tucumán) y a criadores particulares de la zona de El Infiernillo (Tucumán). De la Estación Experimental INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de Abrapampa (Jujuy) proceden las muestras de leche de vicuña (n=7) y alpaca (n=2). Las muestras de leche de guanaco (n=2) provienen de una reserva privada del Departamento Trancas, Tucumán. El escaso número de muestras de alpaca y guanaco se debe al hecho de que la alpaca es una especie prácticamente inexistente en la Argentina, y el guanaco es una especie silvestre de la cual sólo recientemente se ha comenzado a conseguir muestras de leche de hembras lactando. Las muestras de leche fueron extraídas entre el 4° día y el 10° día de lactación. Las muestras de suero sanguíneo de los animales mencionados tienen el mismo origen. Para obtener las muestras de leche se inyectaron los animales con oxitocina (Lab Biol) 5 UI. El calostro de cabra se obtuvo de animales pertenecientes a criadores particulares de Trancas, Tucumán. La obtención de leche se realizó por ordeño manual, recogiendo entre 5 y 20 mL. Las muestras se transportaron en hielo y se procesaron dentro de las 48 horas.

Procesamiento de las Muestras

Las caseínas de la leche se precipitaron con tampón acetato pH 4,3. Las proteínas del lactosuero fueron sometidas a ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio

(PAGE-SDS) (Laemmli, 1970), en dos condiciones: 1) en ausencia de agentes reductores, con lo cual se mantienen las uniones disulfuro de las Igs; y 2) en presencia de dichos agentes, los cuales fueron incluidos en la mezcla solubilizadora (mercaptoetanol 1 M y ditioneitol 0,12 M) a fin de romper estos enlaces, separando las cadenas. En todos los casos se sembró entre 0,5 y 1 mg/mL de proteína en los geles de poliacrilamida. Para estimar la concentración de cada tipo de IgG en la leche se hizo un pool de cada especie con cantidades iguales de todas las muestras disponibles. Los geles PAGE-SDS fueron teñidos con Coomassie Blue (Harris y Angal, 1989).

Immunoblotting

Los ensayos de inmunoblotting (WB) de proteínas se llevaron a cabo según Tijssen (1985) y las transferencias de proteínas hacia las placas de nitrocelulosa se realizaron mediante capilaridad (Gabriel y Gersten, 1993). En los ensayos de inmunoblotting se utilizaron: a) anticuerpos policlonales anti-IgG de cabra aislados por afinidad (Sigma, USA) producidos en conejos y marcados con biotina, los cuales fueron posteriormente detectados en la placa de nitrocelulosa (Immobilon-NS, Sigma, USA) con avidina conjugada con peroxidasa (Sigma, USA); b) anticuerpos policlonales anti-proteínas de suero sanguíneo de camello (Sigma, USA), producidos en conejos, y como segundo anticuerpo se utilizaron anticuerpos policlonales anti-IgG de conejo marcados con peroxidasa. Ensayos previos habían demostrado que los anticuerpos mencionados en primer término reaccionaban con las IgG de llama obtenidas mediante fraccionamiento de calostro de llama a través de Sephacryl S-200. Asimismo se hicieron inmunoblottings de suero sanguíneo y lactosuero de vicuña con los anticuerpos anti-seroproteínas de camello, los cuales dieron una excelente reacción de detección. Ambos ensayos demostraron que los anticuerpos anti-IgG caprina mencionados reconocen determinantes antigénicos en las inmunoglobulinas de los camélidos estudiados.

Estos ensayos se llevaron a cabo sobre muestras de lactosuero y de suero sanguíneo de las cuatro especies de auquénidos después de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS), en las condiciones antes mencionadas según el caso. Estas electroforesis se utilizaron para estimar las concentraciones de IgG e IgG_H sanguínea y en lactosuero.

Se llevaron a cabo controles con los anticuerpos anti-IgG sobre lactoproteínas de llama: caseína (Cn), seroalbúmina (SA), y α -lactalbúmina (α -La), los cuales dieron resultados negativos. En cambio, con

la IgG de llama aislada de Sephacryl S-200, dieron resultados positivos.

Cromatografía de proteínas por Sephacryl S-200

Las proteínas del lactosuero fueron fraccionadas por cromatografía de partición a través de una columna de Sephacryl S-200 equilibrada con tampón Tris-CIH 0.1M, ClNa 0.5M pH 8. El eluido se recogió en un colector de fracciones Cignet (Isco). Las fracciones obtenidas de la columna fueron concentradas con carbowax y posteriormente analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS). Las concentraciones de proteínas en todos los casos se determinaron según Lowry et al. (1955).

Immunodot

Las IgG y las IgG_H de las cuatro especies, aisladas en la columna de Sephacryl S-200, se sembraron en una hoja de nitrocelulosa (1µg/5 µl) y se utilizaron como controles negativos β-caseína bovina (Sigma), α-La de vicuña aislada por Sephacryl S-200, y β-Lg bovina (Sigma). Para detectar las inmunoglobulinas se utilizaron anticuerpos policlonales anti-IgG de cabra conjugados con peroxidasa, los cuales fueron fabricados en conejo (Sigma).

Otros Ensayos

Para detectar la presencia de glicoproteínas se sometieron los geles al método de ácido peryódico de Schiff (PAS) (Segrest y Jackson, 1972). Por otra parte las bandas proteicas evidenciadas en los geles, correspondientes a las cadenas de inmunoglobulinas (Ig) o a las Igs completas, fueron escaneadas mediante un aparato HP Scanjet 5100C, y la imagen digital resultante fue analizada densitométricamente por medio del software QuantiScan (Biosoft, 1997). La calibración previa se realizó mediante electroforesis y densitometría de IgG aislada de llama y utilizada a diferentes concentraciones. Los resultados de la cuantificación densitométrica de las bandas se correlacionaron con las distintas concentraciones de proteína mediante el uso de un software estadístico (Psi-Plot V.6, Poly Software International). La ecuación polinomial resultante se utilizó para determinar la concentración relativa de las inmunoglobulinas de las muestras.

RESULTADOS

En la **Fig. 1** se muestran los resultados obtenidos de someter a electroforesis y posterior

immunoblotting los lactosueros de las cuatro especies de camélidos y del calostro de cabra, sin tratamiento con agentes reductores y utilizando anticuerpos anti-IgG de cabra. Estos ensayos mostraron una sola banda en el calostro de cabra y dos bandas en los camélidos, una de aproximadamente 150 kDa y otra de aproximadamente 86 kDa. De la misma manera, con la tinción con Coomassie Blue en los geles de poliacrilamida (gel no mostrado), también se observaron en el lactosuero de camélidos dos bandas notorias en la misma ubicación (150 kDa y 86 kDa), mostrando menor intensidad la banda menos pesada. Las bandas de 150 kDa de cada una de las cuatro especies se correspondían en su posición con la IgG de cabra. Las bandas de 86 kDa corresponderían a las IgG_H. El ensayo de immunoblotting de suero sanguíneo de vicuña diluido 1/60 detectó la IgG clásica y la IgG_H (datos no mostrados).

Como resultado de la cromatografía en Sephacryl S-200 se obtuvieron varios picos que se sometieron a análisis electroforéticos con SDS en presencia y ausencia de agentes reductores. En todas las especies estudiadas el

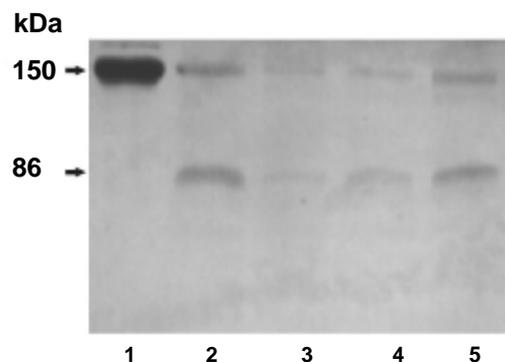


Fig. 1. Immunoblotting del Lactosuero de camélidos sudamericanos utilizando anticuerpos anti-cadenas- γ de IgG de cabras, a partir de PAGE-SDS sin agentes reductores. 1: calostro de cabra; 2: llama; 3: guanaco; 4: alpaca; 5: vicuña. 150 KDa: IgG; 86 KDa: IgG_H.

Immunoblotting to detect IgG and IgG_H in South American camelids' lactoserum. PAGE-SDS was carried out without reducing reagents. IgGs were detected by using polyclonal rabbit anti-goat IgG γ -chain. 1: goat colostrum; 2: llama; 3: guanaco; 4: alpaca; 5: vicuña. 150 kDa: IgG, 86 kDa: IgG_H.

segundo y tercer pico corresponden a la IgG clásica y a la IgG_H respectivamente. A su vez la IgG_H obtenida eluye muy cerca de la seroalbúmina y de una proteína de peso molecular próximo a 78 kDa.

En la **Fig. 2 (A)** se muestran los ensayos de PAGE-SDS con las fracciones eluidas correspondientes a las IgG_H mencionadas anteriormente que habían sido sometidas al tratamiento con agentes reductores. Se observan en las cuatro especies las siguientes bandas: una de peso molecular aproximado de 78 kDa, otra de peso molecular 66 kDa que corresponde a la SA y dos bandas más tenues de pesos moleculares muy cercanos, 43 y 40 kDa, que corresponderían a las cadenas H de la IgG_H. En ensayos paralelos de inmunodot los mismos picos fueron probados con anticuerpos anti-IgG de cabra y dieron resultados positivos. En cambio, los ensayos con otras proteínas de la leche (SA, Cn y a-La) no dieron reacción con el anticuerpo. En las fracciones

pertencientes a la IgG convencional, se observan dos bandas que tienen idéntica movilidad electroforética que la IgG de cabra y corresponden a las cadenas pesadas (53 kDa) y a las cadenas ligeras (30 kDa). En la misma figura se puede observar el plasma sanguíneo de guanaco donde se identifican las bandas correspondientes a las cadenas pesadas normales de la IgG, a las cadenas defectivas y a las cadenas ligeras.

La **Fig. 2 (B)**, muestra una PAGE-SDS sin agentes reductores correspondiente al pico de elución donde se encuentra la IgG_H. En la misma se evidencian las bandas de IgG_H de peso molecular aproximado a 86 kDa y 80 kDa. Estas corresponderían a las IgG_H de 43 kDa y 40 kDa con el tratamiento reductor.

La **Fig. 3** corresponde a un Inmunodot efectuado con anticuerpos anti-IgG de cabras conjugado con peroxidasa. El anticuerpo reconoció tanto a las IgG convencionales como a las IgG_H, dando una reacción más intensa para las

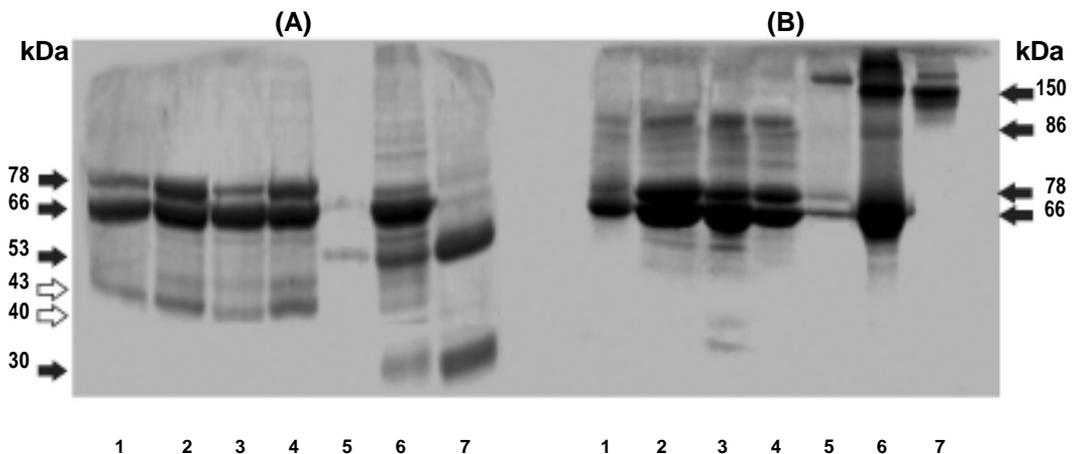


Fig. 2. (A) PAGE-SDS con agentes reductores de proteínas del lactosuero de camélidos sudamericanos. 1 al 4 eluyentes del fraccionamiento por Sephacryl G-200 correspondientes a los tubos donde se encuentra la IgG_H. 1: vicuña; 2: alpaca; 3: guanaco; 4: llama; 5: IgG de guanaco; 6: plasma sanguíneo de guanaco; 7: IgG de calostro de cabra. 78 KDa: proteína que coeluye con la SA; 66KDa: SA; 53 KDa: cadena H de IgG; 43 KDa: cadena H_H; E; 40 KDa: cadena H_H; 30 KDa: cadena L de IgG. (B) PAGE-SDS sin agentes reductores de proteínas del lactosuero de camélidos sudamericanos. 1 a 7 ídem a (A). 150 KDa: IgG; 86 KDa: IgG_H; 78 KDa: proteína que coeluye con la SA; 66 KDa: SA.

(A) PAGE-SDS of South American camelids' lactoserum proteins, carried out with reducing reagents. 1 to 4: elutes fractionated by Sephacryl S-200 corresponding to IgG_H containing peaks. 1: vicuña; 2: alpaca; 3: guanaco; 4: llama; 5: vicuña IgG; 6: guanaco blood serum; 7: goat's colostrum IgG. 78 kDa: protein that co-eluted with SA; 66 kDa: SA; 53 kDa: H-chain IgG; 43 kDa: H_H chain; 40 kDa: H_H chain; 30 kDa: IgG L-chain. (B) PAGE-SDS of South American camelids' lactoserum proteins carried out without reducing reagents. 1 to 7 ídem to (A). 150 kDa: IgG; 86 kDa: IgG_H; 78 kDa: protein that co-elutes with SA. 66 kDa: SA.

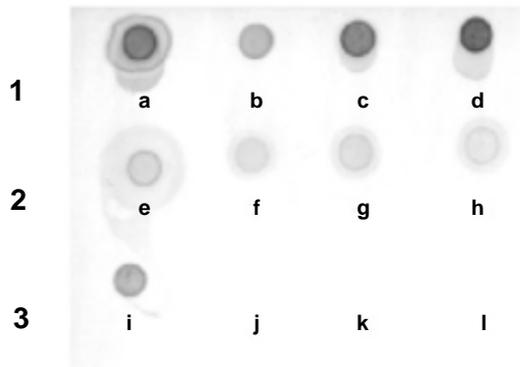


Fig. 3. Immunodotting de muestras de proteínas lactoséricas de camélidos sudamericanos utilizando anticuerpos anti IgG de cabra. 1) IgG eluida de Sephacryl S-200. a: llama, b: alpaca, c: guanaco, d: vicuña. 2) IgG_H eluida de Sephacryl S-200; e: llama, f: alpaca, g: guanaco, h: vicuña. 3) i: suero sanguíneo de vicuña; j: β -caseína bovina; k: α -lactalbúmina de vicuña; l: β -lactoglobulina bovina.

Immunodotting of South American camelids' lactoserum proteins. Anti-IgG goat antibody was used. 1) IgG eluted from Sephacryl S-200; a: llama, b: alpaca, c: guanaco, d: vicuña. 2) IgG_H eluted from Sephacryl S-200; e: llama, f: alpaca, g: guanaco, h: vicuña. 3) i: viciuña blood serum, j: bovine β -casein, k: viciuña α -Lactalbumin; l: bovine β -lactoglobulin.

primeras debido a la mayor concentración de las mismas.

Por otra parte los immunoblottings con anticuerpos anti-proteínas del suero sanguíneo de camello llevados a cabo sobre lactosuero de los camélidos sudamericanos reaccionaron fuertemente con tres proteínas que correspondían a pesos moleculares de 68 kDa, 86 kDa y 150 kDa Asimismo reaccionaron con una gran cantidad de proteínas del suero sanguíneo de auquénidos, entre las cuales se distinguían por su intensidad las que correspondían a los tres pesos moleculares indicados. Cabe mencionar que la seroalbúmina y las inmunoglobulinas son proteínas que se encuentran tanto en la sangre como en la leche, y que en el caso de los camélidos corresponden a los pesos moleculares encontrados.

En cuanto a la concentración relativa de las IgG en la leche de los auquénidos, lograda a partir del scanning de los geles en PAGE-SDS

sin agentes reductores, los resultados mostraron que los valores de IgG_H varían según la especie entre 0.49 y 0.66 mg/mL, siendo menores que los de la IgG convencional que están entre 0.57 y 1.12 mg/mL, como se puede observar en la **Tabla 1**.

Los ensayos con PAS para detección de glicoproteínas en los geles con agentes reductores demostraron la naturaleza glicosilada de las bandas de 53; 43 y 40 kDa de las cuatro especies de camélidos sudamericanos.

DISCUSIÓN

Se ha comprobado que la transmisión de inmunoglobulinas de la madre a la cría en llama y alpaca se lleva a cabo fundamentalmente a través de la absorción de calostro neonatal (Garmendia y McGuire, 1987; Reguilón et al., 1996). Asimismo se sabe que entre los mamíferos que transmiten a sus crías este tipo de inmunidad neonatal a través del calostro, la principal inmunoglobulina presente en éste y en la leche es la IgG. En cambio, las especies que transfieren los anticuerpos, sobre todo IgG, a través de la placenta, poseen IgA secretora en el calostro y en la leche (Martinet y Houdebine, 1993). Esta IgA tiene efectos protectores a nivel del tracto gastrointestinal de la cría, sin penetrar en su circulación. En los animales que transfieren IgG por medio del calostro, esta Ig tiene el doble efecto de penetrar en la circulación, generalmente en las primeras 24 horas de vida, y de proteger el tracto gastrointestinal.

Tabla 1

Concentración (mg/mL) y porcentaje de los contenidos de IgG e IgG_H en la leche de camélidos sudamericanos.

Concentration (mg/mL), and percent (w/v) of IgG and IgG_H content in South American camelids milk.

	IgG*	IgG _H *	Total*	IgG %	IgG _H %
Llama	1.12	0.66	1.78	62.9	37.1
Vicuña	0.57	0.49	1.06	53.8	46.2
Alpaca	0.71	0.55	1.26	56.3	43.7
Guanaco	0.98	0.61	1.59	61.6	38.4

*mg/mL

Como ya se ha mencionado, en los camélidos existe una inmunoglobulina G constituida solamente por cadenas H, o sea desprovista de cadenas ligeras, lo cual aparentemente es un hecho único entre los mamíferos (Lauwereys et al., 1998; Hassanin et al., 2000; Nguyen et al., 2000). Estas cadenas H difieren de las cadenas H del resto de los anticuerpos conocidos puesto que carecen del dominio CH1, siendo por lo tanto de menor peso molecular que las cadenas H de las IgG convencionales o clásicas de los mamíferos. Asimismo se conoce que la llama tiene en la sangre menos IgG_H que el camello: 45% del total de inmunoglobulinas G para la primera y 75% para el segundo (Van der Linden et al., 2000).

A partir de este trabajo se comprueba que las cuatro especies de camélidos sudamericanos poseen los dos tipos de IgG en la secreción láctea. Ello se deduce a partir del hecho de que en los ensayos no reductores hemos encontrado dos bandas, una de aproximadamente 150 kDa y otra de 86 kDa, que se corresponden con la IgG clásica y con la IgG_H. Asimismo, en los ensayos reductores, hemos encontrado una banda de 53 kDa que correspondería a la cadena H de la IgG clásica, y otras dos de 40 y 43 kDa que corresponderían a dos formas de cadenas H de la IgG_H. En este sentido los pesos moleculares obtenidos en este trabajo son muy semejantes a los encontrados en camélidos del viejo mundo, en los cuales los pesos son de 50, 43 y 46 kDa (Hamers-Casterman et al., 1993). Adicionalmente debemos mencionar el hecho de que en los ensayos de PAGE-SDS, en medio reductor de los picos de la IgG, aparece la banda de aproximadamente 30 kDa correspondiente a las cadenas livianas.

Por otra parte cabe hacer referencia a la naturaleza de la importancia biológica de este nuevo tipo de IgG, cuyo descubrimiento en los camélidos abre interrogantes, parte de los cuales están siendo contestados en los últimos años.

El conocimiento existente hasta el momento sobre la estructura y función de la IgG_H se basa en la genética molecular y estructura proteica. Debido a que se sabe relativamente poco sobre los aspectos funcionales de la IgG_H, la información disponible es suficiente para

evaluar las ventajas adaptativas de las IgG_H surgidas a partir de los cambios genéticos (mutaciones en sentido amplio) que les dieron origen. Este hecho tuvo lugar, al parecer, exclusivamente en este grupo de mamíferos.

Por otra parte, se conocen los cambios estructurales que acompañan a la pérdida de las cadenas L; por ejemplo la pérdida de un sector de la cadena H, el dominio CH1, el cual normalmente es el sitio a través del cual se unen las cadenas H y L. Esta pérdida resulta de una alteración del splicing que impide su transcripción al RNAm (Decanniere et al., 2001; Nguyen et al., 1999), y no de una supresión en el gen correspondiente. Asimismo se conoce la estructura molecular de la región variable (V_H) de la IgG_H y las características de unión al antígeno (Desmyter et al. 1996; Muyldermans y Lauwereys, 1999; Riechmann y Muyldermans, 1999; Nuttall et al., 2000; Nguyen et al., 2000; Muyldermans, 2001). En los aspectos funcionales se destaca el hecho de que el sitio de unión al antígeno tiene una configuración tal que permite su penetración en los sitios activos de las enzimas (Martin et al., 1997; Lauwereys et al., 1998; Transue et al., 1998; Conrath et al., 2001), hecho éste que ha suscitado interés por su posible aplicación tecnológica. Hay que mencionar que, en estados patológicos, también se han encontrado en el hombre y en el ratón algunos tipos de Igs desprovistas de cadenas L (Nguyen et al., 1999). No obstante, en estos casos no se acompañan de cambios a nivel del genoma (y de su expresión), tal como se observa en la IgG_H.

A la luz de los actuales conocimientos, la ventaja biológica de las IgG_H parece consistir en el hecho de que han ampliado el espectro de antígenos sobre los cuales pueden actuar (van der Linden et al., 2001).

Respecto a la glicosilación de las IgG_H observada en nuestros ensayos, debemos mencionar que no hemos encontrado referencias en la bibliografía sobre la glicosilación de la IgG_H. No puede descartarse que la glicosilación tenga una función de reconocimiento (entre otras funciones) de acuerdo a lo establecido por Radaev y Sun (2001) sobre glicosilación y reconocimiento por el receptor Fcγ. Los mencionados autores han demostrado que la

glicosilación de las IgG clásicas en el resto Asn²⁹⁷, perteneciente al dominio CH2, es imprescindible para que la molécula del anticuerpo pueda ser reconocida por los receptores de membrana y para que las células inmunocompetentes puedan llevar a cabo sus funciones.

Por otra parte la glicosilación de la IgG_H es una característica que la hace resistente a la hidrólisis proteolítica, lo que es explicable por la función que debe llevar a cabo como protección de la cría.

Los resultados encontrados en los ensayos aquí descritos y los datos mencionados en la bibliografía (Garmendia y McGuire, 1987; Reguilón et al., 1996), sirven para identificar a la IgG como inmunoglobulina dominante en la leche madura de todos los camélidos sudamericanos, estando la IgG_H en segundo lugar en concentración después de la IgG. Debemos mencionar que las concentraciones en que se encuentran la IgA y la IgM en la leche de auquénidos son mucho más bajas que las correspondientes a la IgG total (Medina et al, 2003). Las concentraciones de estas últimas Igs encontradas en la leche guardan una cierta relación con lo que se sabe sobre la abundancia relativa de inmunoglobulinas en la leche de distintas especies. En el caso particular de los animales que no transmiten la inmunidad pasiva a la cría por medio de la placenta, las inmunoglobulinas dominantes en el lactosuero son del tipo IgG. En el caso de la llama ocurre lo mismo, hay una clara dominancia de la IgG frente a las otras inmunoglobulinas. Debe mencionarse el hecho de que existe similitud en los porcentajes de la IgG y la IgG_H en la leche de las cuatro especies y que a su vez estas concentraciones son semejantes a las que se encuentran en la sangre. Ello parece sugerir que no hay un transporte desde la sangre a la leche que privilegie el paso de algunas de las IgG mencionadas en particular.

Los presentes resultados son compatibles con la hipótesis de que la aparición de la IgG_H es un hecho que tuvo lugar en la raíz del tronco de la Familia Camelidae y que su presencia fue necesaria para su desarrollo como grupo. Por otra parte tal hecho se llevó a cabo, desde el punto de vista fisiológico, de una manera

que las inmunoglobulinas ampliaron el espectro de detección antigénica sin afectar en lo principal las funciones de reconocimiento por receptores, la transferencia por la glándula mamaria y la protección a la cría.

APOYOS RECIBIDOS Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán y de la Fundación M. Lillo. Agradecemos las valiosas sugerencias de los árbitros. Asimismo agradecemos la colaboración técnica del Sr. F. Gerónimo Fernández, de la Lic. C. van Nieuwenhove, de la Dra. Patricia Black y del personal técnico del INTA, Abrapampa.

LITERATURA CITADA

- CONRATH, K.E., M. LAUWEREYS, M. GALLEN, A. MATAGNE, J.M. FRERE, J. KINNE, L. WYNS y S. MUYLDERMANS. 2001. Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45:2807-2812.
- DECANNIERE, K., T.R. TRANSUE, A. DESMYTER, D. MAES, S. MUYLDERMANS y L. WYNS. 2001. Degenerate interfaces in antigen-antibody complexes. *Journal of Molecular Biology*, 313:473-478.
- DESMYTER, A., T.R. TRANSUE, M.A. GHARROUDI, M.H. THI, F. POORTMANS, R. HAMERS, S. MUYLDERMANS y L. WYNS. 1996. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nature Structural Biology*, 3:803-811.
- GABRIEL, O. y D.M. GERSTEN. 1993. *Enzyme Assays. A practical approach*. R. Eisinger & M. Danson, eds. IRL Press at Oxford University Press. Oxford. New York. 351 pp.
- GARMENDIA, A y T. MCGUIRE. 1987. Mechanism and isotypes involved in passive immunoglobulin transfer to the newborn alpaca (*Lama pacos*). *American Journal of Veterinary Research*, 48:11465-1471.
- HAMERS-CASTERMAN, C., T. ATARHOUCHE, S. MUYLDERMANS, G. ROBINSON, C. HAMERS, E.B. SONGA, N. BENDAHDAN y R. HAMERS. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363:446-448.
- HARRIS, E.L.V. y S. ANGAL. 1989. *Protein purification methods. A practical approach*. IRL at Oxford University Press, New York. 317 pp.
- HASSANIN, A., R. GOLUB, S.M. LEWIS y G. WU. 2000. Evolution of the recombination signal sequences in the Ig heavy-chain variable region locus of mammals. *Proceeding of National Academic of Science*, 9721:11415-11420.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227:680-685.

- LAUWEREYS, M., M.A. GHARROUDI, A. DESMYTER, J. KINNE, W. HOLZER, E. DEGENST, L. WYNS y S. MUYLDERMANS. 1998. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO Journal*, 17:3512-3520.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL. 1955. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- MARTIN, F., C. VOLPARI, C. STEINKUHLER, N. DIMASI, M. BRUNETTI, G. BIASIOL, S. ALTAMURA, R. CORTESE, R. DE FRANCESCO y M. SOLLAZZO. 1997. Affinity selection of a camelized VH domain antibody inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease. *Protein Engineering*, 10:607-614.
- MARTINET, J. y L-M. HOUEBINE. 1993. *Biologie de la lactation*. INRA Editions. Paris. 582 pp.
- MEDINA, M, F.M. FERNANDEZ, S. SAAD DE SCHOOS, G. REBUFFI y JULIETA VON THÜNGEN. 2003. Aspectos comparativos del las proteínas del lactosuero de camélidos sudamericanos. *Acta Zoológica Lilloana*, 47(1-2):71-76.
- MUYLDERMANS, S. y M. LAUWEREYS. 1999. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *Journal Molecular Recognition* 12:131-140.
- MUYLDERMANS, S. 2001. Single domain camel antibodies: current status. *Journal of Biotechnology*, 74:277-302.
- NGUYEN, V.K., R. HAMERS, L. WYNS y S. MUYLDERMANS. 1999. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IgG2A heavy-chain antibodies. *Molecular Immunology*, 36:515-524.
- NGUYEN, V.K., R. HAMERS, L. WYNS y S. MUYLDERMANS. 2000. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V_HH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO Journal*, 19:921-930.
- NUTTALL, S.D., R.A. IRVING y P.J. HUDSON. 2000. Immunoglobulin VH domains and beyond: design and selection of single-domain binding and targeting reagents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 1:253-263.
- RADAEV, S., y P.D. SUN. 2001. Recognition of IgG by Fc γ Receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 276:16478-16483.
- REGUILÓN, C., S. SAAD DE SCHOOS y F.M. FERNANDEZ. 1996. Proteínas del calostro de llama (*Lama glama* L.). *Acta Zoológica Lilloana*, 43:365-371.
- RIECHMANN, L. y S. MUYLDERMANS. 1999. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *Journal of Immunological Methods*, 231:25-38.
- SEGREST, J.P. y R.L. JACKSON. 1972. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulphate. *Methods in Enzymology*, 28:54-63
- TIJJSSEN, P. 1985. *Practice and theory of enzyme-immunoassays*. Elsevier. Amsterdam, Netherlands. 549 pp.
- TRANSUE, T.R., E. DE GENST, M.A. GHARROUDI, L. WYNS y S. MUYLDERMANS. 1998. Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate. *Proteins*, 32:515-522.
- VAN DER LINDEN, R.H., B. DE GEUS, G.F. FRENKEN, H. PETERS y C. VERRIPS. 2000. Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution. *Journal of Biotechnology*, 80:261-270.