

## Algunos aspectos estructurales de proteínas séricas con características de inmunoglobulinas en pejegallo (*Callorhynchus callorhynchus*)\*

Immunoglobulin-like serum proteins from the ratfish. (*Callorhynchus callorhynchus*)

GITTITH A. SANCHEZ, MARTA K. GAJARDO, ALFREDO E. DEIOANNES

Laboratorio de Microbiología e Inmunología. Departamento de Biología Celular, Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad Católica de Chile. Casilla 114-D, Santiago-Chile

(Recibido para publicación el 3 de diciembre de 1978)

SÁNCHEZ, G.A., GAJARDO, M.K., DEIOANNES, A.E. Algunos aspectos estructurales de proteínas séricas con características de inmunoglobulinas en pejegallo (*Callorhynchus callorhynchus*). (Immunoglobulin like serum proteins from the ratfish (*Callorhynchus callorhynchus*). Arch. Biol. Med. Exper. 12:31-38, 1979.

Ratfish serum proteins have been fractionated by ammonium sulfate, followed by gel filtration on Sepharose 6B. This experimental procedure yields very pure product, as assayed by immunoelectrophoresis and rechromatography on Sepharose 6B.

Basic polypeptide structural analysis performed by polyacrylamide sodium dodecylsulfate gel electrophoresis (PAGE-SDS) shows two polypeptides, having  $7.49 \times 10^4$  daltons and  $2.44 \times 10^4$  daltons, respectively. The hexose content is less than in the similar high molecular weight immunoglobulin heavy chain from the human previously described. This fact could explain the apparent low molecular weight of such polypeptide on PAGE-SDS.

The molecular weight determination of the native molecule by protein gel filtration on Sepharose 6B, gives a value of about  $9.6 \times 10^5$  daltons, which is similar in that found for other Chondrichthyes high molecular weight immunoglobulins described before by others.

### RATFISH

### SERUM

### PROTEINS

Los vertebrados inferiores han sido usados como modelo en el estudio del origen de las inmunoglobulinas y los mecanismos que generan la diversidad de la familia multigénica de los anticuerpos (1-3), por ser sistemas simples en comparación con los vertebrados superiores.

La potencialidad inmunológica de los peces de la clase Agnatha, que incluye lampreas y anguilas babosas, es conflictiva, desde el punto

de vista de la estructura de las inmunoglobulinas.

Las investigaciones pioneras del grupo de Robert Good (4, 5), sugirieron que la lamprea (*Petromyzon marinus*), a diferencia de la anguila babosa (*Eptatretus stoutii*), poseía una respuesta inmunológica adaptativa. Sin embargo, trabajos realizados por el grupo de Hildemann en anguila babosa, indicaron que

esta especie era capaz de responder a ciertos inmunógenos con factores humorales y rechazar a los injertos en las condiciones experimentales (6-8).

La estructura de los anticuerpos inducidos en ciclóstomos es poco clara.

Marchalonis y Edelman, usando un bacteriófago (9) como inmunógeno, aislaron una inmunoglobulina con composición peptídica similar a IgM en lamprea, pero que carecía de enlaces disulfuros intercadena. Posteriormente, Litman y col. (10), usando *Brucella abortus* como inmunógeno, encontraron una inmunoglobulina que difería notablemente de la anterior (11) y propusieron para la molécula un modelo de 4 cadenas asociadas en una estructura nativa de 320.000 daltons, que se disociaba espontáneamente en subunidades de 150.000 y 75.000 daltons.

En Mixinoideos la situación es también incierta. DeIoannes y Hildemann (12) aislaron, de las fracciones que habían sido descritas como responsables de la actividad inmunoquímica (6, 8), una molécula que al ser analizada por electroforesis en poliacrilamida SDS mostró, sorpresivamente, sólo bandas de bajo peso molecular. La más intensa correspondía a un péptido de 23.000 daltons aproximadamente; acompañado de otras dos bandas menores de 18.000 y 17.000 daltons.

Análisis y secuencia de aminoácidos del péptido de 23.000 daltons indicaron (datos no publicados) una composición y secuencia aminoterminal diferente de otras inmunoglobulinas descritas, tanto en cadenas pesadas como livianas. Este hecho, más la imposibilidad de los autores (12) de demostrar actividad inmunológica en las fracciones antes mencionadas, hace que el problema aún no esté resuelto.

En rayas y tiburones (13, 14) se han detectado dos tipos de inmunoglobulinas en el suero: una de alto peso molecular de estructura pentamérica y una de bajo peso molecular. En rayas, el anticuerpo de bajo peso molecular presenta una estructura dimérica.

En tiburones, los anticuerpos monoméricos (BPM) y pentaméricos (APM) son indistinguibles desde el punto de vista antigénico, lo que sugiere que éstos son variantes moleculares que muestran un grado diferente de polimerización. Clem y col. (13) demostraron que

ambas especies moleculares no son interconvertibles entre sí.

Otro grupo de peces cartilaginosos, pertenecientes a la subclase Holocephali, no ha sido estudiada hasta el momento, debido a su distribución geográfica y difícil mantención en acuarios.

En nuestro laboratorio, nos hemos interesado en el estudio de la capacidad inmunológica de un representante de esta subclase, el peje-gallo (C.c.), que se encuentra en la costa del litoral central en relativa abundancia entre 0 y 50 metros de profundidad, lo que hace fácil su captura y le permite una adaptación a condiciones de acuario, sin problemas derivados de descompresión.

En este trabajo se presentan evidencias experimentales de la existencia de proteínas que, de acuerdo a la metodología empleada, presentan características estructurales similares a las descritas para los anticuerpos de otras especies, excluyendo clase Agnatha.

## MATERIALES Y METODOS

### *Animales*

Se usaron peje-gallos adultos, vivos, capturados mediante red calada en la playa de Rocas de Santo Domingo (33° 43' latitud oeste, 71° 42' latitud sur), cuyos tamaños fluctuaron entre 70 y 80 cm de largo.

### *Sangrado y obtención del suero*

A los animales, colocados en posición dorsal, se les extrajo sangre usando jeringas plásticas desechables de 25 cc con aguja intramuscular (18 g, 1 1/2 pulgada). La sangre obtenida se colocó inmediatamente en una caja con hielo, permitiendo la retracción del coágulo en forma natural por un período máximo de 6 horas a 4°C. El suero se centrifugó a 1.000 rpm por 30 minutos, en centrífuga refrigerada a 4°C con el fin de eliminar elementos figurados contaminantes. Posteriormente se clarificó por centrifugación a 12.000 g por 30 minutos a 4°C.

### *3. Fraccionamiento del suero*

a) El suero obtenido en la etapa anterior se precipitó por la adición lenta y con agitación suave, de un volumen igual de una solución saturada en sulfato de amonio a 4°C. La suspensión se dejó reposar 60 minutos a 4°C. El precipitado se sedimentó en una centrífuga Sorwall rotor SS-34, a 12.000 g por 10 minutos. El pellet resultante fue sometido a 3 lavados consecutivos de 30 minutos cada uno, usando una solución de sulfato de amonio al 50% de saturación en agua destilada. Después del último lavado el pellet se disolvió en buffer 6B (Na Cl 0,2M Tris 10 mM, EDTA 1 mM, azida de sodio

0,02%, ajustado a pH 8,0 con HCl), hasta un volumen final equivalente a un quinto del inicial de suero. La solución de proteína resultante se clarificó por centrifugación a 12.000 g por 10 minutos y se congeló a  $-15^{\circ}\text{C}$ . En estas condiciones, era estable para los fines experimentales, durante un período de por lo menos, dos meses.

b) Filtración en gel agarosa 6% (Sepharsa 6B). 6 ml del material obtenido en la etapa anterior, se descongelaron y sometieron a una centrifugación de 12.000 g por 10 minutos. El sobrenadante se aplicó a una columna de Sepharsa 6B, de 2,5 cm de diámetro por 120 cm de largo, provista de adaptadores que permitieron un flujo hacia arriba, controlado por bomba peristáltica, de 12 cc/hr. Se colectaron fracciones de 3,4 cc y el perfil de elución se determinó mediante lectura espectrofotométrica a 280 nm. Las determinaciones de peso molecular se realizaron en esta misma columna, usando como patrones las siguientes proteínas monoclonales humanas: IgM (N.N.); IgG (L.P.); IgA (R.M.); de  $9,5 \times 10^5$ ;  $10$ ;  $1,5 \times 10^5$ ;  $1,8 \times 10^5$  daltons, respectivamente. Las muestras contenían 20 mgr de proteínas totales, y se aplicaron en un volumen de 2 cc en Buffer 6B. La estimación de peso molecular se realizó, de acuerdo al tratamiento de los datos descritos por Andrews (15), observándose una relación lineal entre el ln del peso molecular y la fracción de elución correspondientes a los picos, se concentraron mediante diálisis por presión negativa para análisis posteriores. Todos los experimentos se hicieron a temperatura ambiente ( $10$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ) y en triplicado, con un error estimado de media fracción.

#### 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida sodio dodecilsulfato (PAGE-SDS)

Esta técnica se usó para determinar la composición peptídica de las diferentes fracciones obtenidas por filtración en gel, y para estimar los pesos moleculares de péptidos, en las condiciones establecidas por el método de Laemmli (16), usando geles separadores al 11% o al 7,5% de acuerdo a la finalidad del experimento. En las estimaciones de peso molecular aparente, sin correcciones por el contenido de hidratos de carbono, se usaron como patrones, seroalbúmina de bovino (BSA) de  $6,9 \times 10^5$  daltons, cadenas  $\mu$  (N.N.) y L (L.P.) humanos de 80.000; 50.000 y 23.000 daltons, respectivamente. Estos pesos moleculares, son aparentes, considerando la aberración producida por la presencia de hidratos de carbono en los patrones usados, descritos por Atwell para el sistema PAGE-SDS (17). Las muestras fueron tratadas con el mismo método desnaturalante usado originalmente por Laemmli (16), omitiéndose 2-Mercaptoetanol en algunos casos, según la intención del experimento.

#### 5. Inmunolectroforesis e inmunodifusión

La inmunolectroforesis de suero total o fracciones de él, se realizó de acuerdo a la microtécnica descrita (18), usando placas de vidrio de  $25 \times 75$  mm. La inmunodifusión doble (Duchterlony) se realizó en el mismo tipo de placa, con 3,5 ds agarosa al 1% en buffer 6B como soporte.

#### 6. Producción de antisuero contra proteínas séricas totales de pejegallo

En la producción de antisueros se utilizaron conejos neozel-

landeses blancos, que fueron inyectados con suero de pejegallo emulsionado en volúmenes iguales de adjuvante de Freund completo. Una dosis de 1 cc. de la emulsión se administró en partes iguales en los cojinetes de las cuatro patas. La operación se repitió 3 veces a intervalos de 2 semanas. Después de 3 meses de iniciado el tratamiento, se inyectó intramuscularmente 1 cc de suero completo de pejegallo como antígeno desencadenante. Los conejos se sangraron 10 días después de la última dosis por punción cardíaca. La sangre colectada se dejó coagular espontáneamente, el suero producido se centrifugó a 1.000 rpm por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , para eliminar elementos figurados contaminantes. La inactividad de algunos factores del complemento se realizó por calentamiento a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Posteriormente se adicionó azida de sodio como bacteriostático a una concentración final de 0,1%; el suero así tratado es estable a  $4^{\circ}\text{C}$  por más de 1 año.

#### 7. Obtención de péptidos

Se realizó por cromatografía en Sephadex G-200, equilibrado con buffer disociante SDS (sodio dodecilsulfato) (SDS 1%; Tris mM, Mercaptoetanol; 10 mM, EDTA 1 mM, azida de sodio 0,04%, ajustado a pH 6,8 con HCl; Buffer G-200). Se usó una columna de 1,5 cm de diámetro y 120 cm de largo, operado en idénticas condiciones a la columna 6B, pero con un flujo de 6,7 por hora.

Muestras conteniendo 40 mgr de proteína en un volumen final de 3 cc en buffer G-200, fueron aplicadas a la columna después del siguiente tratamiento: reducción y desnaturalación a una concentración de 0,2 M 2 - Mercaptoetanol, 6,6% SDS, Tris HCl 50 mM pH 6,8, luego se incubó a  $100^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos. Posteriormente la muestra fue equilibrada por diálisis, durante la noche, contra buffer G-200. Se colectaron fracciones de 2,7 cc. El perfil se determinó mediante espectrofotometría a 280 nm. Además, esta columna fue calibrada para estimar los pesos moleculares de los péptidos, usando como patrones BSA de  $6,8 \times 10^4$ ,  $\mu$  (N.N.),  $\gamma$  (L.P.), L de  $6,9 \times 10^4$ ,  $5,1 \times 10^4$  y  $2,25 \times 10^4$  daltons, respectivamente (17), después de ser desnaturalados y reducidos. La estimación de los pesos moleculares se realizó de acuerdo al tratamiento de los datos de Andrews (15).

#### 8. Extracción del SDS de los péptidos

Los péptidos obtenidos por filtración en Sephadex G-200-SDS, se precipitaron mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA) sólido, a una concentración final de 20%. Este proceso se aceleró mediante calentamiento en un baño de agua hirviendo por 2 minutos. El exceso de TCA se lavó con una mezcla 1/1 de etanol-éter por 3 veces. Luego los péptidos se resuspendieron en ácido propiónico 1 M, antes de ser liofilizadas a sequedad total.

#### 9. Determinación de hexosas

Se utilizó la técnica del fenolsulfúrico descrita por Dubois (19). Usando como patrón una solución en peso 1:1 de galactosa /manosa, se determinó absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro. La muestra, que contenía 0,4 mgr de proteína, se preparó por pesada directa del liofilizado, y fue solubilizada posteriormente en la mezcla fenol-sulfúrico.

## RESULTADOS

El suero fraccionado con sulfato de amonio y cromatografiado en Sepherosa 6B (véase método), mostró 2 picos en el perfil de elución (Fig. 1, fracción a y b). El primero representó la mayor cantidad de material que absorbió a 280 nm, con un peso molecular estimado de  $9,6 \pm 0,51 \times 10^5$  daltons, de acuerdo a la curva de calibración de la columna.

Para determinar su pureza, este pico se reconcentró y recromatografió en la misma columna, observándose otra vez un solo pico simétrico que eluyó en la misma posición. Por inmunoelectroforesis mostró una sola banda de precipitación, con poca difusión alrededor del punto de aplicación de la muestra (Fig. 3b).

El análisis de la fracción a en PAGE-SDS, en condiciones reductoras, dio 2 bandas: una intensa con peso molecular aparente de  $7,49 \times 10^4$  daltons y otra de menor intensidad con un peso molecular de  $2,44 \times 10^4$  daltons. En condiciones no reductoras, la muestra no penetró, tanto en geles al 11% como al 7,5%, ya que no se observaron bandas a lo largo de ellos.

La figura 2 muestra el perfil de elución de la fracción a (Fig. 1), al ser disociada, reducida y cromatografiada en Sephadex G-200. La proteína se resolvió en 2 picos simétricos no superpuestos, con pesos moleculares, aproximadamente, de  $7,1 \times 10^4$  daltons (h) y de  $2,3$

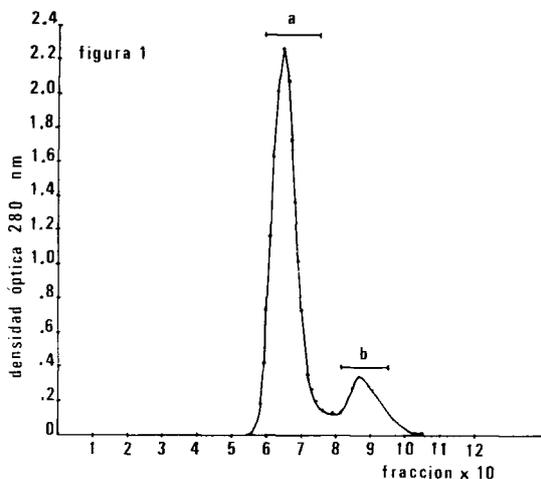


Fig. 1. Perfil de elución de suero de pejegallo fraccionado con sulfato de amonio 50% en Sepharosa 6B.

$\times 10^4$  daltons (l), para los péptidos de alto y bajo peso molecular, respectivamente, estimados por la curva de calibración de la columna.

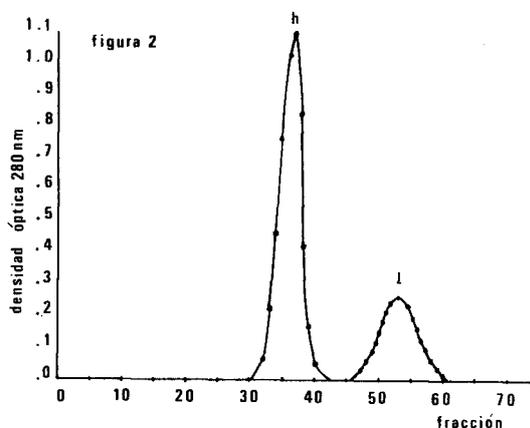


Fig. 2. Perfil de elución de la fracción (a) figura 1 reducida y disociada en sodio dodecilsulfato en una columna de Sephadex G-200.

### figura 3

#### inmunoelectroforesis



Fig. 3. Análisis inmunoelectroforético de suero completo de pejegallo (a) y fracción a de Sepharosa 6B, contra suero de conejo antiproteínas séricas totales de pejegallo.

La cantidad relativa de proteínas en las fracciones, indicó una relación molar aproximada de 1:1 entre ellas, considerando una recuperación del 100% de la proteína aplicada en la columna y asumiendo un peso molecular de 69.000 daltons con un coeficiente de extinción de 11,74 (1% a 280 nm) para h (20) y 22.500 daltons con un coeficiente de extinción de 13,1 (1% a 280 nm) para l (20).

Las fracciones h y L reconcentradas, fueron analizadas por PAGE-SDS; sólo se observaron bandas con migraciones idénticas a

las esperadas, de acuerdo al análisis de la molécula nativa en el mismo sistema, antes de la disociación y fraccionamiento en Sephadex G-200 no se detectó contaminación de un péptido por otro (Fig. 4).

Finalmente, la estimación de hexosas por el método del fenol-sulfúrico, para el péptido de  $6,9 \times 10^4$  daltons, dio un valor de  $3,9 \pm 0,2\%$ .

#### figura 4

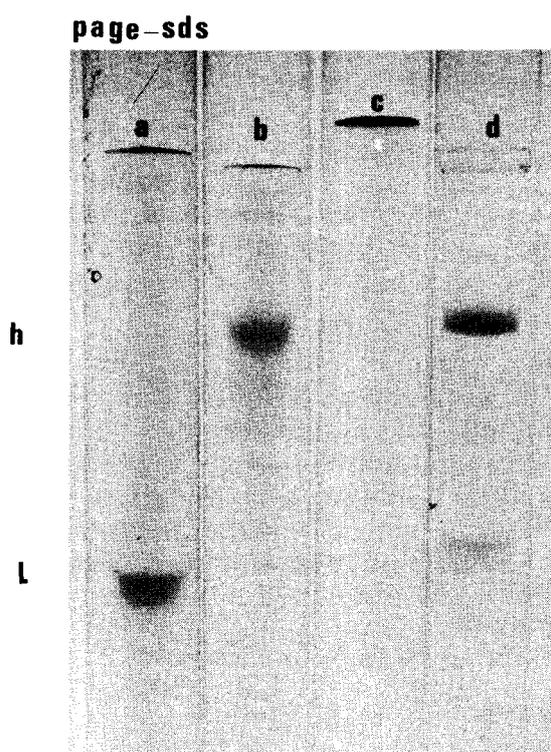


Fig. 4. Análisis electroforético en geles de poliacritamida-SDS al 11% de las fracciones L (a) y h (b) de la columna Sephadex G-200-SDS, reducidas con 2-mercaptoetanol. c y d, fracción a, columna Sepharosa 6B, no reducidas y reducida con 2 mercaptoetanol, respectivamente.

#### DISCUSION

Como se aprecia en los resultados, el esquema de fraccionamiento usado, condujo a la purificación de una proteína homogénea (Fig. 1, fracción a), al ser analizada por recromatografía en Sepharosa 6B e inmunolectroforesis.

Los péptidos que componen dicha proteína son semejantes a los presentes en otras moléculas,

que tienen funciones de inmunoglobulinas, en distintos niveles evolutivos (14, 20-29).

El peso molecular nativo de la molécula, estimado por filtración en gel, fue de  $9,6 \times 10^5$  daltons. Este valor es similar al descrito para inmunoglobulinas de alto peso molecular en otras especies de peces cartilaginosos ( $9,5 \times 10^5$  daltons) (13, 14, 20), sin embargo dicho valor es superior al señalado para los anticuerpos de alto peso molecular en Osteichthyes (21, 24).

Además se observó una diferencia al comparar las migraciones electroforéticas del péptido h con cadena  $\mu$  humana (Fig. 4) en el sistema PAGE-SDS, la cual da como resultado un peso molecular aparente de  $7,49 \times 10^4$  daltons para h, en vez de  $8,0 \times 10^4$  daltons estimados para cadena  $\mu$  humana; este hecho experimental podría interpretarse como una diferencia en el peso molecular, contenido de hidratos de carbono o ambos factores a la vez. Es posible encontrar ambos casos a la vez en una especie determinada, ej.: humanos (29), o comparando diferentes especies (30). Para poder discriminar entre estas dos posibilidades, por una parte se determinó el contenido de hexosas, el cual fue significativamente más bajo que en cadenas  $\mu$  de mamíferos 3,9 y 6% para cadenas pesadas de pejegallo y  $\mu$  humana (30), respectivamente; hecho que explicaría, en parte, la mayor movilidad de este péptido en PAGE-SDS.

Sin embargo, este péptido no difirió significativamente en tamaño a la cadena  $\mu$  humana, al ser estimado su peso molecular por cromatografía, en Sephadex G-200 en medio disociante. Estos resultados sugieren que la diferencia entre  $\mu$  humana y h, reside fundamentalmente en la cantidad de hidratos de carbono y no en el peso molecular del péptido.

El comportamiento de esta proteína en PAGE-SDS al 7,5% en condiciones no reductoras, indica que el enlace covalente disulfuro mantiene unidos los péptidos y subunidades que componen la molécula, de tal manera que no se observan bandas con pesos moleculares inferiores a  $2,2 \times 10^5$  daltons.

Estos resultados concuerdan con el comportamiento de otras inmunoglobulinas poliméricas de alto peso molecular, como por ejemplo IgM humana (datos no presentados), a diferencia de algunos modelos de IgA humana (31) y de anfibios (32) que, en idénticas condiciones,

liberan dímeros de cadenas livianas unidos por enlaces disulfuros.

La estequiometría molar de los péptidos (h y L) en la molécula nativa, es cercana a 1, lo que indica una estequiometría similar al resto de las inmunoglobulinas descritas (33).

Los datos presentados hasta el momento son insuficientes para plantear un modelo estructural definitivo.

En primer lugar, es preciso caracterizar la molécula desde un punto de vista funcional, como por ejemplo, actividad aglutinante específica y fijación de complemento (experimentos en desarrollo). Reducción controlada de la molécula con el fin de liberar, en forma ordenada, subunidades y péptidos. Sería, además, de gran utilidad disponer del análisis de aminoácidos de ambos péptidos y la caracterización de la molécula por microscopía electrónica. (Nota 1).

Otro aspecto importante que debe ser abordado, es el estudio de la presencia de la cadena J y su importancia en la polimerización de esta macroglobulina (Nota 2).

Un estudio cuidadoso de la banda de cadenas L por PAGE-SDS (Fig. 4), muestra generalmente una banda menor con características de migración similares a las descritas para cadenas J en el sistema PAGE-SDS (34). Teóricamente, su contribución a la masa total de cadenas L y su bajo contenido en aminoácidos aromáticos, hace difícil su detección por medio de la metodología empleada.

En la actualidad estamos abocados a la producción de antisueros específicos de cadenas pesadas (h) y livianas (L) de esta molécula, con la intención de estudiar la presencia de otras moléculas antigénicamente relacionadas a ella, tanto a nivel sérico como asociadas a membranas de linfocitos.

Los vertebrados primitivos presentan timocitos con inmunoglobulinas en su superficie con una alta frecuencia (35-37), lo que sugiere que a este nivel evolutivo la diferenciación funcional del timo no es tan marcada como en vertebrados superiores.

Desde este punto de vista, el modelo pejegallo parece ser apropiado, usando una metodología adecuada para el estudio de procesos esenciales en la generación de la diversidad en anti-

cuerpos y procesos fundamentales en la diferenciación de órganos y células linfoides a lo largo del proceso evolutivo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Pesquera Chile, S.A., por las facilidades prestadas para la captura de pejegallos y al doctor Diego Mezzano, jefe del Banco de Sangre, del Hospital Clínico de la Universidad Católica, por la donación de proteínas monoclonales humanas usadas en el presente trabajo.

## SUMMARY

Ratfish serum has been fractionated to gain further insight into the characterization of serum proteins with immunoglobulin function and structure.

The experimental approach used, include ammonium sulfate fractionation at 50% saturation and Sepharose 6B gel filtration.

The ammonium sulfate precipitate, showed two peaks on the Sepharose 6B column, having  $9.6 \times 10^5$  and  $1.7 \times 10^5$  daltons, respectively. Further characterization was performed on the high molecular serum fraction. The results show almost a pure fraction by immunoelectrophoresis against a rabbit anti whole ratfish serum.

Polypeptide analysis by SDS polycrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) resulted in two bands, having  $7.5 \times 10^4$  and  $2.44 \times 10^4$  daltons, respectively under reductive conditions. However when mercaptoethanol was not present in the sample buffer, the protein remained on the top of the gel. This result strongly suggest that the entire molecule is crosslinked by disulphide bonds as a typical IgM-like immunoglobulin.

Sephadex G-200 gel filtration analysis, performed under dissociated conditions (SDS) after complete alkilation, showed two distinct peaks having  $7.1 \times 10^4$  and  $2.25 \times 10^4$  daltons, revealed 1:1 molar ratio. It is interesting to note that the gel filtration failed to clearly reveal other peptide component such as J chain like peptide.

Hexosamine content by phenol sulfuric acid method on the heavy chain showed a lower

value than the reported for others in human  $\mu$  chain.

Therefore this previous results indicate that the experimental approach resulted in the isolation and partial characterization of ratfish serum protein with, physicochemical immunoglobulin-like features; further biological characterization is in progress.

#### REFERENCIAS

1. WARR, G.W., MARCHALONIS, J.J., *Developmental and Comparative Immunology*, 1:15, 1977.
2. MARCHALONIS, J.J., *Immunol.*, 20:161, 1971.
3. SHELTON, E. SMITH, M. J., *Mol. Biol.*, 54:615, 1970.
4. PAPERMASTER, B., CONDIE, R., FINSTAD, J., GOOD, R., *J. Exp. Med.*, 119:105, 1964.
5. GOOD, R., PAPERMASTER, B., *Advances in Immunol.*, 4:115 1964.
6. LINTHICUM, D., HILDEMAN, W., *J. Immunol.*, 105: 4, 1970.
7. HILDEMAN, W., THOENES, G., *Transplantation* 7:506, 1969.
8. THOENES, G., HILDEMAN, W., *Developmental Aspects of Antibody Formation and Structures*. Eds. J. Sterzl and I. Riha, 2:711, 1969. Academic Press.
9. MARCHALONIS, J., EDELMAN, G., *J. Exp. Med.*, 127:891, 1968.
10. LITMAN, G., FROMMEL, D., FINSTAD, J., HOWELL, J., POLLARA, B., GOOD, R., *J. Immunol.*, 105:5, 1970.
11. LITMAN, G., ROSENBERG, A., GOOD, R., *Federation Proc.*, 29:774, 1970.
12. DEIOANNES, A., HILDEMAN, W., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 64:151, 1975.
13. CLEM, L., SMALL, P., *J. Exp. Med.*, 125:893, 1967.
14. MARCHALONIS, J., SCHONFELD, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 221:604, 1970.
15. ANDREWS, P., *Biochem J.*, 96:595, 1965.
16. LAEMMELI, V., FAVRE, M.J. *Mol. Biol.*, 89:575, 1973.
17. ATWELL, J. B., Sc., Tesis de Doctorado en Filosofía, Universidad de Melbourne (Australia), 1974.
18. *Methods in Immunology and Immunochemistry*, 3: 234, 1971, Acad. Press, Eds. Williams, C. and Chase, M.
19. DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P., SMITH, F., *Anal. Chem.*, 28:350, 1956.
20. CLEM, L., SMALL, P. Jr., *J. Exp. Med.*, 125:893, 1967.
21. ACTON, R., WEINHEIMER, P., DUPREE, H., RUSSEL, T., WOLCOTT, M., EVANS, E., SCHROHENLOHER, R., BENNET, J., *J. Biol. Chem.*, 246:6760, 1971.
22. LITMAN, G., FROMMEL, D., FINSTAD, J., GOOD, R., *J. Immunol.*, 106:747, 1971.
23. ACTON, R., WEINHEIMER, P., DUPREE, H., EVANS, E., BENNETT, J. *Biochemistry*, 10:2028, 1971.
24. MARCHALONIS, J., WELTMAN, J. *Comp. Biochem. Physiol.*, 36:609, 1971.
25. LITMAN, G., WANG, A., FUDENBERG, H., GOOD, R., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68:2321, 1971.
26. ACTON, R., EVANS, E., WEINHEIMER, P., NIEDERMEIER, W., BENNETT, J., *Biochemistry*, 11:2751, 1972.
27. LESLIE, G., CLEM, L., *J. Immunol.*, 108: 1656, 1972.
28. ATWELL, J., MARCHALONIS, J., EALEY, E., *Immunology*, 25:835, 1973.
29. EDELMAN, G., GALL, W., *Ann. Rev. Biochem.*, 38: 415, 1969.
30. ACTON, R., NIEDERMEIER, P., WEINHEIMER, L., CLEM, G., LESLIE, G., BENNETT, J., *J. Immunol.*, 109:(2):371, 1972.
31. ABEL, C.A., GREY, H.M., *Biochemistry*, 7:2682, 1968.
32. GREEN, C., STEINER, L., *J. Immunol.*, 117:2:364, 1976.
33. HOOD, L., *Federation Proc.*, 35:2158, 1976.
34. MC. CUMBER, L., CLEM, W., *Immunochemistry*, 13: 479, 1976.
35. ELLIS, A., PARKHOUSE, R., *Eur. J. Immunol.*, 5:726, 1975.
36. EMMRICH, F., RITCHER, R., AMBROSIUS, H., *Eur. J. Immunol.*, 5:76, 1975.
37. WARR, G., DE LUCE, D., MARCHALONIS, J., *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 73:2476, 1976.

#### Nota 1.

Experimentos recientemente realizados en nuestro laboratorio indican que la molécula purificada a homogeneidad posee actividad aglutinante natural contra glóbulos rojos de mamíferos.

#### Nota 2.

Mediante fraccionamiento de la molécula por filtración en gel (Sephadex G-150) en medio disociante sodio dodecilsulfato ha sido posible observar un polipéptido análogo a cadena J humana.