

CLASES, SUBCLASES Y MARCADORES GENETICOS EN LAS INMUNOGLOBULINAS DEL MIELOMA MULTIPLE EN COLOMBIA

M.E. PATARROYO, C.MENDOZA, L. OSPINA, A. RESTREPO

INTRODUCCION

La importancia de los Mielomas y de la Macroglobulinemia de Waldenstrom (MW) radica en que las proteínas producidas por estas neoplasias como producto de su metabolismo han sido de gran utilidad para la comprensión de las características de las inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos (Acs).

En 1965 Kunkel escribía (1, 2); "Existe la posibilidad de que las proteínas del mieloma presenten ellas mismas anticuerpos individuales, producto de una sola célula plasmática que dió origen al clono de las células del mieloma"

Cierto apoyo a este concepto ha surgido desde cuando se halló actividad de anticuerpo en ciertas proteínas del mieloma y macroglobulinas

Dr. Manuel Patarroyo: Jefe Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario San Juan de Dios de Bogotá; **Dr. César Mendoza:** Jefe Sección de Hematología, Instituto Nacional de Cancerología; **Dr. Leonel Ospina:** Jefe Sección de Hematología, Hospital Militar Central de Bogotá; **Dr. Alberto Restrepo:** Jefe Sección de Hematología, Hospital Universitario San Vicente de Paul, Medellín.

Solicitud de separatas al Dr. Patarroyo.

Trabajo ganador del premio "LEDERLE": III Congreso Colombiano de Medicina Interna, Agosto 14 - 17 de 1974, Medellín.

de Waldenstrom y se comprobó que cada dato obtenido del estudio de las proteínas del Mieloma Múltiple (MM) era absolutamente aplicable al problema de las inmunoglobulinas normales o anticuerpos. Hoy por hoy, se considera que ellas representan la expresión monoclonal de un tipo de anticuerpos, para los cuales, en la mayoría de los casos se desconoce el antígeno (3).

La apreciación de la heterogeneidad de los anticuerpos, al menos desde el punto de vista químico, comenzó en 1937 con el análisis del patrón electroforético del suero normal, cuando Tiselius observó que la mayoría de los anticuerpos en un antisuero hiperinmune de conejo se encontraban en la fracción de más lenta movilidad electroforética, que él denominó gamma; y también cuando notó que su distribución era amplia y más difusa que las otras, sugiriendo así una considerable heterogeneidad electroforética, probablemente debido a la gran cantidad de anticuerpos individuales para cada antígeno (4).

Los estudios posteriores realizados por Kunkel, trabajando con anticuerpos aislados contra antígenos como Haptenos y Dextranes de conocida estructura, confirmaron el hecho de que anticuerpos individuales muestran una definida movilidad electroforética, indicando así una considerable homogeneidad (5, 6).

Se postuló entonces que cada tipo de anticuerpos es producido por un solo clono de células plasmáticas (7) y también que una de estas células plasmáticas sufre un cambio neoplásico y prolifera instaurando las entidades neoplásicas conocidas como MM y MW, produciendo su proteína en grandes cantidades (8,9), la cual se va a detectar entre las proteínas plasmáticas. Basándose en estos postulados, se ha considerado que las proteínas patológicas del mieloma y de la macroglobulinemia de Waldenstrom tienen como característica esencial la de representar una población homogénea de moléculas producidas por un solo clono de células plasmáticas, con una carga eléctrica precisa e idéntica en todas sus moléculas y puesto que se encuentran en grandes cantidades en el plasma determinan el clásico pico de la electroforesis o la curva anormal de la inmunoelectroforesis (4, 7).

En 1940 por ultracentrifugación se encontró que dentro de la región de las globulinas había como mínimo 2 diferentes poblaciones de anticuerpos: unos con un alto peso molecular y rápida velocidad de sedimentación (19S) (hoy IgM) y otros de un peso molecular más liviano y velocidad de sedimentación más ligera (7S) (4).

Dentro de las 7S, por inmunoelectroforesis, en 1.953 se observó una especial heterogeneidad ya que existían como mínimo dos diferentes poblaciones desde un punto de vista físico-químico e inmunológico. A la principal de estas se le denominó Gamma G (hoy IgG) y a la segunda B2A o Gamma A (hoy IgA) (10,11). En 1964 trabajando con un mieloma cuya proteína anormal no se identificaba ni fisicoquímica ni inmunológicamente con las otras gammaglobulinas hasta entonces conocidas (Gamma G, Gamma A) se descubrió un cuarto tipo de gammaglobulinas denominado Gamma D (12,13). Igual sucedió en 1968, cuando se descubrió el 5o. tipo de gammaglobulina que se llamó Gamma E (14-16).

Las gammaglobulinas son un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas, consistentes en 2 pares de polipéptidos unidos por puentes disulfuro. Dos de estos polipéptidos tienen un peso molecular elevado, razón por la cual se les ha denominado cadenas pesadas. Se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro y en ellas se hallan las características que diferencian las

Tabla 1 - Propiedades de las 5 clases de Igs..

	γ G	γ A	γ M	γ D	γ E
Concentración mgr%	1.170±400	220±50	120±30	3	0.003
Peso Molecular	160.000	170.000	900.000	160.000	200.000
Formula Molecular	$\kappa^2 \gamma^2$ $\lambda^2 \gamma^2$	$\kappa^2 \alpha^2$ $\lambda^2 \alpha^2$	$(\kappa^2 \mu^2)_2$ $(\lambda^2 \mu^2)_2$	$\kappa^2 \delta^2$ $\lambda^2 \delta^2$	$\kappa^2 \epsilon^2$ $\lambda^2 \epsilon^2$
Tiempo vida Medio (Días)	28	7	6	4	3
% IV	44	40	82	82	?
Fijación C'	+	-	+	-	-

las distintas clases de inmunoglobulinas. El otro par de polipéptidos tiene un peso molecular más ligero y por esto han sido denominadas cadenas livianas, unidas cada una de ellas a cada una de las cadenas pesadas por puentes disulfuro (17-20).

Existen 2 tipos de cadenas livianas que se han denominado Kappa y Lambda. Cada inmunoglobulina o anticuerpo cuenta con un par de estas cadenas livianas ya sea Kappa o Lambda, pero no las dos simultáneamente, siendo entonces la estructura del anticuerpo, por ej: IgGK o igGL (21).

Si tomamos este tetrapéptido como unidad fundamental, encontramos que la IgM es un pentámero con unidades tetrapeptídicas similares a las anteriores, unidas entre sí por puentes disulfuro y por un glicopéptido denominado "pieza J", que explica su alto peso molecular (22).

Las características fisicoquímicas y biológicas de las 5 diferentes clases de inmunoglobulinas se observan en la Tabla 1.

Cuando las IgG, IgM e IgE son sometidas a digestión enzimática con papaína pueden romperse (24-27) en 3 fragmentos dos de ellos denominados Fab (Fragment Antigen Binding) que se adhieren al antígeno contra el cual están dirigidos y el tercero denominado Fc (Fragment Cristalizable), ya que en los trabajos originales se cristalizaba a pH fisiológico. En este fragmento se encuentran las propiedades efectoras de la molécula de Igs tales como fijación del complemento (28), interacción con factor reumatoideo,

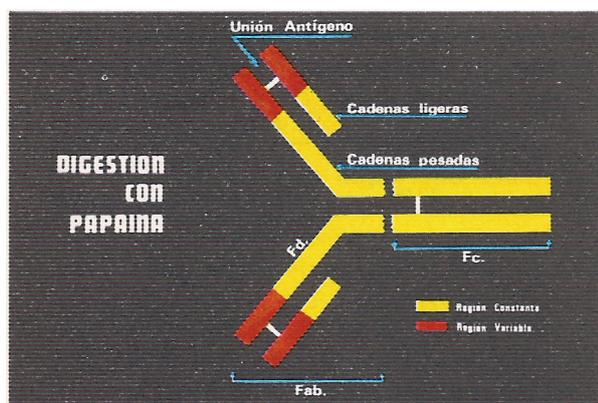


Figura 1

(29), paso a través de la placenta (30), anafilaxis cutánea pasiva (31), interacción con receptores en las membranas celulares, etc. (32,33). La IgA no es susceptible de digestión con papaina pero si lo es por otras enzimas como pepsina y tripsina (34) (Figura 1).

El análisis de las gammaglobulinas tendió a complicarse en 1964 cuando Grey y Kunkel (35) y Terry et al (36) encontraron que en las proteínas del mieloma múltiple, de la clase IgG, había 4 variantes antigénicas con características fisicoquímicas y biológicas diferentes que denominaron We, Ne, Vi, Ge y que luego llamaron IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, de acuerdo con su concentración en el suero. Algunas de sus características fisicoquímicas y biológicas (37,38) se observan en la Tabla 2.

Luego en 1966 Kunkel y Prandergast encontraron, trabajando con proteínas del MM, que en la IgA había también 2 subclases distintas con diferentes características fisicoquímicas y biológicas que denominaron IgA1 e IgA2.

De IgM, IgD e IgE no han sido informadas subclases hasta el presente.

Todos estos datos adquieren su importancia cuando se integran con los aspectos clínicos: las proteínas del mieloma son de tipo IgG, IgA, IgD o IgE mientras que la proteína de la macroglobulinemia de Waldenstrom es la IgM; la proteína de Bence-Jones no es otra cosa que la excreción urinaria de dímeros de cadenas livianas (39) debido a una superproducción de estos péptidos sobre la producción de las cadenas pesadas (7); las enfermedades de cadenas pesadas (40) son

Tabla 2 - Características de las Subclases de IgG

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Concentración en suero	70	18	8	4
t 1/2 (días)	28	28	9	28
Fijación C'	++	+	+++	-
PESO MOLECULAR	160.000	160.000	200.000	160.000
Puentes -S-S-	2	4	15	2
Ac. Citofílicos	+	-	+	-
Ac. Dextrones	+	+++	+	-
Ac. Grupo "A"	+++	+	-	-
Ac. Factor VII	-	-	+	+++
Ac. Tox. Tetánico	+++	+	-	-

el fenómeno en el cual en el proceso neoplásico, las células plasmáticas son incapaces de sintetizar y ensamblar las cadenas livianas con las pesadas y se producen solo estas últimas (7); de acuerdo con el tipo de cadena pesada se ha identificado un nuevo tipo de patología, así por ej: para la IgG la enfermedad se ha denominado "enfermedad de cadenas pesadas Gamma" y en la mayoría de los casos se ha encontrado no un mieloma sino una neoplasia linforreticular (40), en la de IgA o "Enf. de cadenas pesadas alfa" se ha identificado con el linfoma intestinal (41) y en la "Enf. de cadenas pesadas Mu" de la IgM, se ha encontrado asociada con la Leucemia Linfoide crónica (42). Dentro de las subclases además de las características de anticuerpos como tales, anotados en la Tabla 2, existen algunas características de importancia que vale la pena resaltar; su imbalance ha sido encontrado involucrado en ciertas infecciones a repetición (43); del papel de la IgG3 en la hypogammaglobulinemia primaria como anticuerpo compensador (44); el rol de IgG3 en el síndrome de hiperviscosidad (45); la IgG3 como anticuerpo anti-DNA en la nefritis lúpica (37); la IgG3, como anticuerpo antimembrana eritrocitaria en la anemia hemolítica autoinmune (46); la IgG4 como anticuerpo contra factores de la coagulación: XIII y VII (47); las IgG1 e IgG3 como anticuerpos citofílicos que se adhieren a la membrana de los macrófagos (32); la IgG2 como anticuerpo citotóxico que se adhiere a la membrana de los linfocitos que tienen a su cargo la vigilancia inmunológica y destrucción de las células cancerosas (48) y el rol de la IgA2 como inmunoglobulina predominante en las se-

creciones externas como jugo gástrico, saliva, sudor, orinas, etc. (49) y otra gran cantidad de características.

Otros datos de importancia suministrados por el estudio de las proteínas de MM fué el descubrimiento de las características bioquímicas de las Igs (50), su filogenia (51) y sus relaciones genéticas (52). Dentro de las relaciones genéticas, en 1956 Grubb descubrió el primer factor genético de las gammaglobulinas humanas que denominó Gm (a) (por Gamma Marker) (53), que dió origen al sistema Gm.

Durante todo este tiempo se ha encontrado que los marcadores genéticos están controlados por genes autosómicos dominantes, lo cual significa que están expresados en el heterocigoto y que no están ligados al sexo (54). Desde esa época, más de 20 diferentes Gm se han encontrado en la IgG hallándose principalmente en la región constante de las cadenas pesadas de la misma (55). Dos factores genéticos se han hallado en la IgA y se han denominado Am por analogía con los Gm (56). En un comienzo dichos Gm se detectaron por inmunodifusión pero luego se usó la técnica de inhibición de hemaglutinación, más sensible (57). De acuerdo con los estudios de los Gm parece que los genes respectivos que especifican estas clases y subclases de Igs y marcadores genéticos de las mismas se encuentran presentes en el genoma normal de cada individuo (54).

Para una mejor comprensión de los aspectos genéticos usaremos una terminología adoptada mundialmente con respecto a las distintas subclases de Igs:

ISOTIPOS: Características de las Igs presentes en todos los sueros de individuos normales.

ALOTIPOS: Características antigénicas de las Igs presentes en algunos pero no en todos los sueros de individuos normales que son segregados como si se controlaran por genes alelos.

IDÍOTIPOS: Características antigénicas de una población particular de Igs de un individuo dado, propias y características de el mismo individuo (55).

La presencia de isotipos fue lo que hizo, hasta época muy reciente, imposible el estudio de las subclases de Igs ya que se encuentran normalmente en las otras subclases dificultando así la producción de antisueros específicos contra ellas (55).

Tabla 3 - Cadenas Pesadas - Subclases

		Marcadores Gm en Caucásicos
G1	70 %	Gm a z or Gm y f
G2	18 %	Gm n or Gm n-
G3	8 %	Gm b ^o b1 b3 b4 b5 or Gm g
G4	3 %	Gm 4a, 4b

Los principales marcadores genéticos, su posición en las subclases de IgG, su alelismo y antialelismo se muestran en la Tabla 3 (58).

También las proteínas del MM y los marcadores genéticos permitieron encontrar cual era el orden de los 4 cistrones dentro del gene que codifica para la síntesis de las distintas subclases de IgG e IgA en las inmunoglobulinas normales (59-62).

Hay muchos datos que indican que Gm (z,a) y Gm (f, no a) son alelos en el cistrón IgG1; que Gm (n+) tiene un alelo desconocido Gm (n+) en IgG2; que Gm (g) tiene como alelos los Gm (b), Gm (s), Gm (t), Gm (b3), (b4, b5), Gm (c3) y Gm (c5) en el cistrón de IgG3 y que Gm (4a) tiene como alelo Gm (4b) en IgG4 y que estos Gm están íntimamente ligados con los Am especialmente con Am2+ que es el marcador de las IgA2 y con la IgD (Kunkel, comunicación personal).

Los marcadores Gm de las diferentes subclases se heredan en combinaciones estables y en estudios de familia raramente se segregan y cuando lo hacen sucede en forma mendeliana (63); sin embargo, varían grandemente en diferentes poblaciones, indicando así que existen ventajas evolutivas en las combinaciones existentes, siendo algunas de ellas características de ciertas razas.

Ha sido de especial interés el saber que los niveles de las subclases de IgG en los sueros normales están claramente relacionados con los alotipos de los Gm del mismo individuo, así por ej: los Gm (n+) tienen mayores cantidades de

IgG2 que los Gm (n-) (64,65); los Gm (b) tienen el doble de los niveles de IgG3 que los Gm (g) (66) y los Gm (4b) tienen mayores cantidades de IgG4 que los Gm (4a), etc. (67).

Fué también importante encontrar que la incidencia de un tipo dado de mieloma correspondía muy estrechamente al porcentaje de los niveles de esta proteína en el Pool de inmunoglobulinas y fue así como Kunkel postuló las siguientes teorías: a) "La incidencia de mielomas de una cierta clase y subclase es directamente proporcional a los niveles de esta Ig en los sueros normales de esta población" y b) "La incidencia de un tipo específico de mieloma se aproxima mucho a lo que se espera en los estudios de frecuencias genéticas de una población normal" (7).

Estas dos hipótesis sugieren que la frecuencia de un tipo de mieloma, es un proceso neoplásico al azar, y está relacionado directamente con la frecuencia normal de esa Ig en una población dada.

Quisimos estudiar los mielomas en sí, sus proporciones, sus variantes genéticas y utilizar la regla de tres: $F_m = F_G \times C_{Ig}$ (frecuencia de Mieloma es igual a frecuencia genética por concentración de Ig en una población dada) (7); lo cual también es cierto para la población colombiana.

Estas consideraciones, más otra serie de estudios que podrían derivarse del presente trabajo, son las razones que nos movieron a realizar la investigación que informamos aquí (68-71).

MATERIAL Y METODOS

Casuística. Se estudiaron 87 casos de MM, comprobados por mielogramas y Rz, 2 de macroglobulinemia y uno de leucemia de células plasmáticas. Las muestras se obtuvieron de sangre periférica mediante venopunción, posteriormente se les separó el suero mediante retracción del coágulo y centrifugación. En muchos casos cuando fue posible se hizo plasmaféresis (para obtener grandes cantidades de plasma). Los sueros o plasmas así obtenidos, se conservaron en nevera a 30°C hasta su estudio,

Determinación cuantitativa de las Proteínas. Se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteu, usando como patrones, diferentes concentraciones previamente conocidas de un pool de IgG, IgA e IgM (72).

Electroforesis. Cada suero se estudió por electroforesis en tiras de acetato de celulosa en un aparato "Microzone" Beckman.

Inmunodifusión. Se utilizó el método de doble difusión según Ouchterlony, en agarosa al 0.6% en buffer Veronal pH 8.6+0.1% de NaN₃. Las proteínas a tipificar siempre se utilizaron a una concentración de 1 mgr/ml o el suero diluido a 1:100 en PBS, pH 7.2+NaN₃ (73).

Inmunolectroforesis. Se utilizó la microtécnica de Scheindergger (74) empleándose equipo LKB. Se corrieron en Ion - agar al 1% en buffer veronal pH 8.6, de fuerza iónica 0.100. En los reservorios se empleó buffer veronal pH 8.6 fuerza iónica 0.125.

Cromatografía en Columnas de DEAE-celulosa (resina de intercambio iónico). La DEAE-celulosa se preparó de acuerdo con el método de Sorber-Peterson (75) en buffer fosfato 0.005M, pH 8.0; para la elución de la proteína se utilizó el mismo buffer. Cuando se necesitó aislar gamma A o las fracciones de digestión con la enzima papaina se utilizó un gradiente de buffer fosfato 0.005M, pH 8.0 a buffer fosfato 0.30M, pH 8.0.

Cromatografía en Columnas de Sephadex. (Gelfiltrador que separa las proteínas de acuerdo con pesos moleculares). Se prepararon de acuerdo con el método de Killander (76). El Sephadex G-200 se preparó en buffer Tris 0.1M+1.0M NaCl pH 8.0 y el Sephadex G-25 y G-50 en PBS, pH 7.2.

Lectura de fracciones obtenidas por cromatografía. Se hicieron en espectrofotómetro Beckman Du, a una longitud de onda de 280 nm o mediante la técnica del Folin-Ciocalteu.

Reducción y Alkilación de las Gammaglobulinas. La Gammaglobulina aislada se trató mediante el método de Fleishman (77). A una concentración de 20 mgr. por cc. de buffer-Tris, 0.55 M, pH 8.2. Se agregó 2-Mercaptoetanol hasta una concentración de 0.2M. Se dejó a temperatura ambiente por una hora y después se agregó Iodoacetamida hasta una concentración de 0.3M. Posteriormente se dializó contra ácido propiónico 0.5M y se pasó a través de Columna de Sephadex G-100.

Ruptura Enzimática. Se realizó la digestión de la gamma G según el método de Porter (24), usando una relación proteína: enzima de 100:1, Resumiendo, el proceso es el siguiente: la proteína se colocó a una concentración de 20 mgr. por cc en buffer fosfato 0.1M, pH 7.0+0.1M cisteína+0.002M EDTA. Se incubó a 37° por diferentes tiempos según la subclase y se detuvo la digestión mediante diálisis en tubos Visking 8/32 contra buffer fosfato 0.1M pH 7.5, a 4°C por 18 horas. Para el aislamiento de cada una de las fracciones de la digestión se pasó a través de cromatografía en columna de DEAE-celulosa con gradiente de fosfato tal como se explicó anteriormente.

Aislamiento de IgG total. Se utilizó la técnica del ácido caprílico de Steinbuch (78), que es como sigue: Se precipitan las gammaglobulinas con sulfato de amonio en frío a una concentración final de 40% de saturación, dicho precipitado se lava 2 veces con sulfato de Amonio al 50%, se resuspende dicho precipitado en solución salina en un volumen equivalente al original y se deja dializando contra PBS 24 horas; luego se agregan 2 volúmenes de ácido-acético 0.06 M, pH 4.8 y se agrega 1/10 del volumen de ácido caprílico; la IgG e IgA quedan puras en el sobrenadante; este conjunto se concentra, se dializa contra fosfato 0.005 M, pH 8.0 y se aplica en columna de DEAE-celulosa con gradientes de molaridad según técnica ya descrita.

Aislamiento de IgA. Se utilizó la técnica igual a la anterior, partiendo principalmente de sueros de mieloma de tipo IgA, en donde se encuentra esta proteína en grandes cantidades. Se toma el 2o. pico, que es donde se encuentra la IgA completamente pura (78).

Aislamiento de IgM. Se siguió la técnica de Schohenloher y Kunkel (79), que es como sigue: Sueros de Macroglobulinémicos con altas cantidades de IgM se agregaron en una proporción de 1 volumen de suero x 20 volúmenes de agua desmineralizada fría, lentamente. El precipitado así formado, se lavó varias veces con agua desmineralizada a 4°C y se reconstituyó con Tris 0.1 M+ 1.0M NaCl, pH 8.0 a 1/10 de su volumen original.

Esta solución se colocó en columna de Sephadex G-200 y en el primer pico así obtenido se encontró IgM completamente pura.

Aislamiento de IgD. El primer antisero fue una gentil donación del Dr. H.G. Kunkel, pero habiendo obtenido posteriormente 2 casos de mieloma IgD, que aquí reportamos, hicimos el aislamiento de la proteína mediante precipitación de sulfato de amonio y cromatografía en DEAE celulosa con gradientes de molaridad y la utilizamos para inmunización.

Aislamiento de las Subclases de IgG. Los primeros datos conseguidos de nuestros mielomas con respecto a subclases fueron obtenidos en el laboratorio del Dr. H.G. Kunkel; allí se nos tipificaron los primeros 10 mielomas por subclases y una vez conocidos hicimos los aislamientos por métodos que a continuación describiremos: Una vez aislados las IgG, separadas de las IgA por cromatografía en DEAE-celulosa se hizo una recromatografía de las fracciones que contenían la IgG, en DEAE-celulosa, con gradiente de molaridad, las distintas fracciones así obtenidas se analizaron con los distintos antiseros contra las diferentes subclases y solamente aquellas fracciones donde se encontraba la fracción completamente pura se usaron para estudios posteriores.

Antiseros contra clases y subclases de Igs. La producción de los antiseros contra las diferentes clases de Igs, no es mayor problema, ya que son fácilmente obtenibles en cualquier especie que se inmunice pero existiendo obviamente ciertas especificidades, por ej: los anti-IgG son obtenidos mejor en conejos, los Anti-IgA en caballos, los Anti-IgM en cabras y hasta ahora hemos intentado los anti-IgD en ovejas, obteniendo excelentes resultados. Pero la producción de antiseros contra subclases tiene sus problemas debido a los isotipos; por ej: los anti-IgG1 son obtenidos mejor si se utiliza la molécula completa para inmunización al igual que los anti-IgG3, pero con los anti-IgG2 es necesario hacerles reducción—alkilación para hacerlos reactivos y los IgG4 son altamente antigénicos solamente si se utiliza el fragmento Fc de su digestión con papaina (80). Es esta la razón por la cual hicimos la descripción de las técnicas de digestión enzimática, y reducción-alkilación ya que eran necesarias para la obtención de los fragmentos antigénicos requeridos para la inmunización.

Determinación de los marcadores genéticos. Durante la producción de los antiseros

(que requirieron cerca de 50 animales de diferentes especies hasta encontrarse los óptimos) se observó que algunos producían antisueros que reaccionaban con ciertas proteínas de una subclase independientemente de su cadena liviana.

Analizándolos con las proteínas tipificadoras de Kunkel (gentilmente donadas por él) pudimos observar que estaban detectando factores genéticos de tipo Gm. Así por ej: uno de nuestros anti-IgG2 detectaba el factor Gm (n+); uno de nuestros anti-IgG3, el Gm (g) y nuestro anti-IgG4, el Gm (4a).

Inmunoadsorción. Para remover los isotipos que daban reacción cruzada se prepararon inmunoabsorbentes sólidos mediante proteínas acopladas a Sepharosa 4B, con CNBr, según la técnica de Klein (81), modificada por nosotros (82), así pues, utilizando los inmunoabsorbentes sólidos removimos los isotipos que presentaban reacción cruzada, dejando los antisueros limpios sin formación de complejos inmunes o agregados solubles, permitiendo así el uso de los antisueros en otras investigaciones.

RESULTADOS

El primer aspecto y el más importante en los comienzos de la investigación fue la adquisición de un gran número de mielomas para el aislamiento de sus proteínas en cantidades apreciables, ya fuera para inmunización o para tipificación. Fue así como de los 90 mielomas conseguidos se logró hacer plasmaféresis en 42 de ellos, en algunos de ellos repitiéndose dicho proceso varias veces con fines terapéuticos.

Una vez hechas las plasmaféresis y la tipificación, se hizo en 30 de ellos el aislamiento hasta la purificación de las proteínas de mieloma, con el fin de tener nuestros propios patrones para posteriores clasificaciones e inmunizaciones.

La siguiente tarea fué la producción de los antisueros específicos contra las diferentes clases y subclases, tarea a la cual estuvimos dedicados 1 1/2 años. Utilizamos para la inmunización las siguientes proteínas: IgG1 K completa, IgG1 K Fab, IgG1K Fc, IgG2 completa, IgG2 Fab, IgG2K Fc, IgG2L completa, IgG2L Fab, IgG3 completa, IgG3K Fab, IgG3K Fc, IgG4K completa, IgG4 Fab, IgG4K Fc, IgG4L completa, IgG4L Fab e IgG4L Fc. Como mínimo se inmunizaron 2 animales

distintos con cada proteína o fragmentos proteícos con el fin de evitar problemas de tolerancia o no respuesta que se presentan esporádicamente en ciertos animales de laboratorio. Después de inmunizados los animales, se les hizo también plasmaféresis con el fin de conseguir cantidades suficientes de cada uno de los antisueros y no anemizarlos por las sangrías.

Con los Anti-IgG1, se pudo comprobar en Nueva York y en Oslo que con nuestro sistema fue la primera vez en el mundo en que se pudo producir antisuero contra esta subclase (55). Dichos antisueros contra las proteínas totales IgG1 (Marcos) presentaron siempre reacciones cruzadas con IgG3, IgG4 e IgG2 ya fueran de tipo Kappa o Lambda, debido a los isotipos que comparten los IgG1 con las demás subclases, reacciones cruzadas que fueron retiradas mediante inmunoabsorción sólida. Los resultados obtenidos con los fragmentos IgG1 K Fc presentaron siempre reacción cruzada con los isotipos de las otras subclases, los cuales al ser removidos hacían desaparecer totalmente cualquier actividad de antisuero como anti-IgG1 (80). Otro problema de importancia resuelto por nosotros fue la producción de antisueros específicos contra IgG2. Los demás autores siempre encontraron dificultades en remover las reacciones cruzadas entre IgG2 e IgG3 (55), pero nosotros utilizando la proteína completa reducida y alquilada resolvimos dicho problema (80). Los anti-IgG2K Fab, una vez removida su reacción cruzada, fueron de gran importancia para nosotros ya que permitieron estudiar la subclase IgG2 en la superficie de los linfocitos y encontrar que es ésta la única subclase de IgG que se encuentra en la membrana de esta célula linfoide (70). Uno de los antisueros anti-IgG2 presentó como característica la posibilidad de detectar exclusivamente las IgG2 Gm (n+) independientemente del tipo de cadena liviana y lo utilizamos como tipificador de los Gm (n) (80). Las IgG3 son relativamente menos problemáticas, presentando isotipos principalmente con IgG1 e IgG2, para ello utilizamos IgG3K e IgG3L completas, la última de las cuales sirvió para reconocer el marcador genético Gm (g) mientras que la otra servía como tipificadora de subclase.

Nunca nos funcionaron los Anti-IgG3 Fab y Anti-IgG3 Fc y creemos que tal vez fuera debido a que la molécula rota, después de la digestión con papaina, se rompe más fácil y más rápida-

Tabla 4 - Clases de Mieloma y Macroglobulinemia

	No.	%
IgG	64	71
IgA	21	24
IgD	2	2
IgM	2	2
sín gamopatía	1	1
	90	

Tabla explicativa de los porcentajes de proteínas de Mieloma Múltiple y Macroglobulinemia de Waldenstrom en la población Colombiana. Observar las altas proporciones de IgA e IgD y la baja cantidad de IgM.

mente en fragmentos peptídicos más pequeños, que son incapaces de retener su capacidad antigénica (66).

Las moléculas de IgG4 completas, siempre nos dieron fuerte reacción cruzada con IgG2, e IgG1 se hacía más débil.

Nunca logramos una reacción ni siquiera cruzada al inmunizar los animales con los fragmentos IgG4 Fab; actualmente estamos tratando de averiguar la razón. La tipificación de los dos MM IgG4 dieron como resultado Gm (4a) y se hicieron en el laboratorio del Dr. H. G. Kunkel durante el período en el cual se descubrieron los marcadores genéticos de esta subclase (83). La producción de antisueros contra IgM, IgD e IgA fué, comparado con lo anterior, tarea sencilla ya que la única contaminante necesaria de remover, la mayoría de las veces, eran anticuerpos contra algunas proteínas séricas como Albúmina, Transferrina o C3, cosa que se hizo fácilmente con el suero de una niña agammaglobulinémica, acoplado a Sepharosa 4B con CNBr como inmunoadsorbente sólido (82).

La potencia de estos antisueros se comprobó por inmunodifusión doble en agarosa según método ya descrito.

Nos quedaban varias dudas y era saber si

Tabla 5 - Subclases de IgG

	COLOMBIANOS		CAUCASICOS
	No.	%	%
IgG ₁	50	77	70
IgG ₂	8	12	18
IgG ₃	4	6	8
IgG ₄	2	3	4

Tabla de los mielomas de la población colombiana, por subclases de IgG. Comparar con la proporción de las poblaciones caucásicas la menor proporción de las subclases IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

era cierto que habíamos sido capaces de resolver los problemas de producción, de Anti-IgG1 y Anti-IgG2, y así nuestros datos fueran reproducibles; para resolver dichos problemas enviamos nuestros antisueros a comprobación a la Rockefeller University al Dr. H. G. Kunkel quien comprobó su completa especificidad. Una vez sabido esto tomamos otras proteínas distintas e inoculamos IgG1 K (Duarte) completa, IgG2K (D.OB) reducida y alkilada, IgG2L completa e IgG4 Fc y observamos que los resultados eran completamente reproducibles, por ello tomamos 3 animales para inoculación por proteína o fragmento protéico. Una vez confirmados estos resultados el resto de la tarea era sencillísima de realizar.

El proceso a seguir es el que a continuación describimos: Una vez sospechado el diagnóstico de MM o MW, por los estudios hematológicos y radiológicos ya mencionados, se hacía electroforesis de proteínas al suero para tratar de localizar la movilidad de la banda monoclonal. Se conoce que IgA, IgM, IgD, IgG2 e IgG4 tienen una rápida movilidad electroforética, mientras que IgG1 e IgG3 son de más lenta movilidad, IgG1 puede ser también muy polidispersa en cuanto a su patrón electroforético. Luego se corría sistemáticamente, por inmunoelectroforesis el suero del paciente contra Anti-IgG y Anti-IgA para la identificación final de la clase de proteínas y simultáneamente contra Anti-K y Anti-L para la determinación del tipo de cadenas livianas.

Tabla 6 - Complejos Genéticos y Frecuencia en varias poblaciones

γ G2	γ G3	γ G1	Caucásicos	Negros	MONGOLICOS	
					Japoneses	Chinos
n -	g	za	0.20	—	0.50	0.03
n -	g	zax	0.10	—	0.15	0.02
n +	b ³ b ⁵ b ⁴ b ¹ b ⁰	fy	0.52	—	—	—
n -	b ⁴ b ⁵ b ⁴ b ¹ b ⁰	fy	0.17	—	—	—
n +	g	za	0.005	—	—	—
n -	g	fy	0.005	—	—	—
n +	g	fy	0.005	—	—	—
n -	b ³ b ⁵ b ⁴ b ¹ b ⁰	za	0.005	0.55	—	—
n -	c ³ c ⁵ - b ¹ b ⁰	za	0.001	0.28	—	—
n -	c ³ b ⁵ b ⁴ b ¹ b ⁰	za	0.001	0.08	—	—
n -	b ³ b ⁵ - sb ⁰	za	0.001	0.12	—	—
n +	b ³ b ⁵ b ⁴ b ¹ b ⁰	fy _a	—	—	0.10	0.75
n -	b ³ b ⁵ - stb ⁰	za	—	—	0.25	0.20

En 2 oportunidades cuando no reaccionaban las proteínas con los antisueros contra IgG e IgA, pero sí con los antisueros contra Kappa o Lambda, decidimos correrlas contra Anti-IgD y fué cuando descubrimos los 2 mielomas IgD que aquí informamos.

Nunca tuvimos problemas con el estudio de las 2 macroglobulinemias de Waldenstrom, ya que lo único que hicimos fué confirmar el diagnóstico remitido por 2 colegas de Cali y Medellín.

Una vez establecida la clase de Ig que tenía dicho mieloma se establecía la subclase, comprobando la proteína por inmunodifusión, puesta a 1 mgr/ml si ya se había aislado o el suero diluido 1:100 en PBS, pH 7.2. Siempre se colocaron controles conocidos para evitar errores diagnósticos consecutivos al daño o inactivación de los antisueros por almacenamiento o envejecimiento.

Los IgM fueron uno tipo Kappa y otro Lambda al igual que los 2 IgD. No pudimos analizar los Gm de la subclase IgG1 pero enviamos 6 casos tomados al azar de proteínas de mieloma que fueron tipificados en Nueva York como Gm (a). (Tablas 4, 5, 6, 7 y 8).

No se hizo tipificación de los Am de IgA, que como se sabe se encuentra como marcador solamente en la IgA2. Estos datos ya nos permitían postular entonces que nuestro más probable marcador genético de las IgG fuera en su

mayor parte Gm (a) para la IgG1, Gm (n—) para la IgG2, Gm (g) para la IgG3 y Gm (4a) para la IgG4. Estos datos los explicaremos y los analizaremos en la discusión.

DISCUSION

Hubo varios datos considerados de importancia en este trabajo que antes de ser dados a conocimiento decidimos corroborar.

El primero es que habíamos resuelto el problema de la producción de los antisueros contra las distintas subclases de IgG abriendo así el camino para investigar completamente el papel de estas proteínas en las distintas entidades patológicas. Tiene esta solución una aplicación importantísima en la patología renal, pulmonar, reumatológica y hematológica especialmente en las enfermedades autoinmunes y de complejos inmunes.

El segundo es que habíamos logrado establecer la proporción de las distintas clases y subclases de Igs en la población colombiana a través del estudio de la proporción de las distintas clases y subclases de MM.

El tercero, que habíamos logrado establecer el marcador genético de la respuesta inmune humoral predominante en nuestro medio y el cuarto, que nos sorprendió ya que llevábamos una mente completamente abierta a cualquier posibi-

Tabla 7 - Marcadores Genéticos

	No.	
IgG ₂	6	Gm (n-)
	2	Gm (n+)
IgG ₃	3	Gm (g)
	1	Gm (b)
IgG ₄	2	Gm (4a)

Tipos de marcadores genéticos observados en los mielomas de las subclases IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Vale la pena recalcar que 3/4 de la población de IgG₂ son Gm (n-); 3/4 del total de IgG₃ son Gm (g) y los IgG₄ son Gm (4a) indicando una altísima frecuencia del Gm (n-) (g) (4a).

lidad, es que había una perfecta correlación entre el Gm postulado por nosotros y la proporción de clases de MM.

Analicemos los datos, dejando a un lado el problema de la producción de los antisueros. Al hacer el análisis por clases (IgA, IgM, IgD), tres datos llamaron nuestra atención:

La alta incidencia de mielomas IgA (24% la nuestra, la informada por otros: 10-18%) ; la bajísima incidencia de macroglobulinemia de Waldenstrom o IgM (2% nuestro porcentaje, lo descrito: 8-12%) y la alta incidencia de IgD (2.2% la nuestra y la de otros, 0.4%) (55). Estudiemos dato por dato:

Estamos completamente convencidos que tenemos unos altos niveles de IgA circulantes (81) y que solo reflejan una alta estimulación antigénica de los sitios donde se hace la síntesis de IgA en el organismo (tejido linfóide periférico: amígdalas, placas de Peyer, etc.) dejando estas células, debido a su mayor proporción, más susceptibles de transformación neoplásica. Caemos así dentro de la primer hipótesis formulada por Kunkel acerca de la incidencia de mielomas (7,70). Nuestros niveles circulantes de IgA son más altos debido a que en nuestro medio ambiente los agentes infectocontagiosos nos hacen una estimulación antigénica más acentuada a nivel de mucosas, tracto respiratorio e intestinal. Esto explicaría el tipo de patología infantil que observamos: los lactantes que tienen su sistema

Tabla 8 - Complejos Genéticos

γ G4	γ G3	γ G2	γ G1
4 a	n+	b	f y
4 a	n-	g	z a
4 b	n-	b	f y
4 a	n+	g	z a
4 a	n-	g	f y
4 a	n+	g	f y
4 b	n+	b	f y a
4 b	n-	b	f y a
4 a	n-	b	f a

Tabla que muestra las distintas combinaciones genéticas más frecuentes en distintas poblaciones del mundo. La postulada para nosotros es lo que se encuentra en gris oscuro, mientras que la 2a. alternativa, en gris claro, sería la menos probable.

inmune aún inmaduro mueren en nuestro país principalmente de diarrea y neumonías. En ellos, la síntesis de IgA está aún inmadura y por consiguiente perecen; pero en el adulto, con un sistema inmune más maduro, dicha estimulación antigénica se traduce en una marcada proliferación del sistema linfóide secretor y en niveles de IgA proporcionalmente más altos. Hay por consiguiente una mayor posibilidad de producción de mielomas de la clase IgA.

Con respecto a la IgM, los estudios realizados por Ospina et al (84) han mostrado que nuestra proporción de IgM circulante es normal, pero hay una disociación entre estos datos y la proporción de MW y nosotros creemos que lo que sucede es que la MW no es diagnosticada en nuestro medio, es confundida o es completamente ignorada. Creemos a este respecto que hay que insistir ante los oftalmólogos para que la reconozcan, ya que debido a las características de hiperviscosidad sérica que produce el incremento de estas proteínas, uno de los primeros motivos de consulta es la retinopatía.

Con respecto a la IgD, cuando tuvimos el primer mieloma de esta clase, pensamos que había sido un hecho debido al azar (incidencia normal 0.2-0.6%); pero cuando tuvimos el 2o. caso (incidencia de 2.2%) pensamos en la existencia de otra explicación distinta del azar. Walzer y Kunkel (85) encontraron muy recientemente que había una relación entre los niveles de IgD, IgG3

y el marcador Gm (g). Observaron que los individuos con el marcador Gm (g), que casi siempre tienen bajos niveles de IgG3, tenían niveles séricos de IgD tres o cuatro veces superiores a los individuos con marcador genético Gm (b). Nosotros somos casi homocigotos para Gm (g). Por consiguiente no resulta ilógico nuestra baja frecuencia de MM IgG3 y nuestro alto porcentaje de MM de la clase IgD. Se nos presentó un caso de MM sin proteína anormal lo cual está contemplado dentro de las estadísticas en esa proporción (7). No sabemos nada concreto a este respecto hasta el presente, debido al cuadro clínico tan bizarro de la paciente. El análisis de las subclases de Igs es muy dicente: tenemos nosotros una alta proporción de MM de la subclase IgG1 y bajas cantidades de las otras subclases. Los distintos trabajos realizados en otras razas, informan proporciones relativamente más bajas de IgG1 (64-67), perfectamente correlacionares con los niveles séricos de dicha subclase IgG en el suero de las poblaciones de donde fueron obtenidos los MM y con los marcadores Gm de dicha población (las dos hipótesis de Kunkel) (7). Las cifras para IgG1, oscilan entre 61% y 72% en individuos caucásicos (55). Simultáneamente los niveles de IgG2 oscilan entre el 17% y el 29%, los de IgG3 entre 5 y 10% y los de IgG4 entre 4 y 6%, igualmente en caucásicos de tipos genéticos principalmente Gm (f,b,n—, 4b) (55-63). Ha sido plenamente demostrado en estudios de población realizados en caucásicos, japoneses, chinos, papuas y negros que si bien combinaciones teóricamente posibles de marcadores Gm podrían ocurrir, ellas no se presentan nunca, indicando entonces que hay una ventaja selectiva en las combinaciones existentes y se ha reducido su número de una cifra bien elevada de combinaciones posibles a escasamente menos de 15 (57).

Ya que hemos demostrado plenamente que nuestros principales Gm para los IgG4, IgG2, IgG3 eran Gm (4a), Gm (n—) y Gm (g); que las proteínas de la subclase IgG1 eran Gm (a) y que por los estudios de Kunkel se ha demostrado que el marcador Gm (z) se encuentra siempre asociado con el marcador Gm (a) en las moléculas de IgG1 en región diferente de la misma (86), y que la combinación Gm (4a) (n—) (g) se ha encontrado únicamente asociado con Gm (z,a) o

Gm (z,a,x)(57), nosotros postulamos que nuestro principal marcador genético Gm es Gm (4a) (n—) (g) (z,a) ya que Gm (4a) (n—) (g) (z,a,x) se encuentra solo en caucásicos puros mientras que Gm (4a) (n—) (g) (z,a) se encuentra en caucásicos y mongólicos (57) y nosotros sabemos que nuestra raza no es caucásica pura. Otra razón más que nos induce a postular que nuestro marcador Gm es Gm (4a, n—, g, z, a), es que mencionábamos en la introducción que Gm (4b) es alelo de Gm (4a), que Gm (n+) es alelo de Gm (n—), que Gm (b) es alelo de Gm (g) y que Gm (f, no a) es alelo de Gm (z,a) y también que los individuos que tenían el Gm (4b) tenían cantidades altas de IgG4 (67), los que tenían el alelo Gm (n+) tenían niveles considerablemente superiores de IgG2 a los que tenían el alelo Gm (n—) (65), y los que tenían el Gm (b) tenían hasta el doble de los niveles de IgG3 (66). Ahora bien, si nuestro Gm es el antialelo de estos que presentan niveles elevados de IgG4, nuestros niveles deben ser como mínimos normales o subnormales y la cantidad de IgG1 debe ser elevada en proporción a las demás para mantener el equilibrio homeostático.

Postulamos entonces que nuestro marcador genético más frecuente (como mínimo en un 70% por los estudios de los mielomas) es el Gm (4a) Gm (n—) Gm (g) Gm (z,a) en estrecha relación con nuestra proporción IgG4 (3%), IgG2 (6%) IgG3 (12%) e IgG1 (77%).

RESUMEN

Se hace el estudio inmunológico de 90 proteínas de MM y MW clasificándolas por clases, subclases, tipos y marcadores genéticos. Se observa una proporción de un 2.2% de MM IgD; 2.2% de MW; 24% de MM de la clase IgA y 71% de la clase IgG. Al analizar las subclases de esta última se observa la siguiente proporción: IgG1 77%, IgG2 12%, IgG3 6% e IgG4 3%, los bajos niveles de estas últimas subclases son relacionadas con el marcador genético "Gm" más frecuente postulado para la población colombiana que es Gm (4a), Gm (n—), Gm (g) y Gm (z,a),

SUMMARY

The immunological study of 90 proteins of MM and MW is done classifying them into classes, subclasses, types and genetic markers. A propor-

tion of 2.2% of MM IgD, 2.2% of MW, 24% of MM of the IgA class and 71% of the IgG class is observed. Analysing the subclasses of the latter, we note the following proportion: IgG1 77%, IgG2 12%, IgG3 6% and IgG4 3%. The low levels of these subclasses are related with the more frequent "Gm" genetic marker postulated for Colombian population which is Gm (4a) Gm (n-) Gm (g) Gm (z, a).

BIBLIOGRAFIA

1. - Kunkel, H. G.: Myeloma proteins and antibodies. *Am. J. Med.* 39: 1, 1965.
2. - Metzger, H. G.: Myeloma proteins and antibodies. *Am. J. Med.* 47: 837, 1969.
3. - Potter, M. and Leon, M.A.: Three IgA Myeloma proteins precipitation with pneumococcal C polysaccharide. *Science* 162: 369, 1968.
4. - Hdborow, E.J.: The ABC of modern Immunology. *The Lancet* 833, 1967.
5. - Kunkel, H. G., Mannik, M. and Williams, R.C.: individual antigenic specificity of isolated antibodies. *Science* 140: 1218, 1963.
6. - Yount, W.J. et al: Studies on human antibodies. *J. Exp. Med.* 127: 633, 1968.
7. - Kunkel, H. G.: The "Abnormality" of Myeloma proteins. *Cancer Research* 28: 1351, 1968.
8. - Haurowitz, F.: The evolution of selective and instructive theories of antibody formation. *Cold Spring Harbor Symp.* 32: 559, 1967.
9. - Burnet, F.M.: The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge, 1959, University Press.
10. - Burtin, P.: Antigenic structure of human gammaglobulins. *Prot. of Biol. Fluids.* 9: 284, 1961.
11. - Heremans et al: *Clin. Chim. Acta* 4: 96, 1959.
12. - Rowe, D.S. and Fahey, J.L.: A new class of human immunoglobulins. *J. Exp. Med.* 121: 171, 1965.
13. - Rowe, D.S., Dolder, F. and Welzher, H.D.: Studies on human IgD I, and II. *Immunochemistry* 6: 437, 1969.
14. - Johansson, S.G.O. and Bennich, H.: Immunological studies of an atypical Myeloma immunoglobulin. *Immunology* 13: 381, 1968.
15. - Johansson, S.G.O., Bennich, H. and Wide, L.: A new class of immunoglobulin in human serum. *Immunology*, 14: 265, 1968.
16. - Ishizaka, K. and Ishizaka, T.: Reversed type allergic skin reactions by anti-gamma E antibodies in humans and monkeys. *J. Immunol.* 100: 554, 1968.
17. - Kunkel, H. G., Slater, R.J. and Good, R.A.: Relation between certain Myeloma proteins and normal gamma globulins. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 76: 190, 1951.
18. - Tomasi, T.B., Calvanico, N.S. and Chen, J.P.: Structure of human immunoglobulins. In: *Allergy*. Rose B., ed., New York Excerpta Med. 1968.
19. - Edelman, G.M. and Gall, W.E.: The antibody problem. *Ann. Rev. Biochem.* 38: 415, 1969.
20. - Edelman, G.M. and Poulik M. D.: Studies on structural units of the gammaglobulins. *J. Exp. Med.* 113: 861, 1961.
21. - Korngoid, L. and Lipari, R.: Multiple Myeloma proteins. III. The antigenic relationship of Bence - Jones proteins to normal gamma globulin and multiple myeloma serum proteins, *Cancer* 9: 262; 1956.
22. - Kobayashi, K. et al.: J - chain determinants in polymeric immunoglobulins. *Evr. J. Imm.* 3: 185, 1973.
23. - W. H. O. Nomenclature for human Immunoglobulins. *Bull. Wld. Heth. Org.* 30: 447, 1964.
24. - Porter, R. R.: The hydrolisis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. S.* 73: 119, 1959.
25. - Onove Kaoru et al. Structure of human immunoglobulin M. *J. Imm.* 100:238, 1968.
26. - Henney C. S. et al.: Studies on human IgD-II, *Immunochemistry* 6: 445, 1969
27. - Ishizaka, K. et al.: Antigenic structure of gamma E and reaginic antibody. *J. Immunol.* 99: 849, 1967.
28. - Taranta, A., and Franklin, E.C. Complement fixation by antibody fragments. *Science* 134: 1981, 1961.
29. - Kunkel, H.G. and Willmans, R.C.: Rheumatoid arthritis. *Ann. Rev. Med.* 15: 37, 1964.
30. - Ovary, Z., and Karush, F.: Studies on the immunologic mechanisms of anaphylaxis. *J. Immunol.* 86: 146, 1961.
31. - Brambel, F.W., et al.: The relative transmission of the fractions of the papain hydrolized gamma globulin from the uterin cavity to the foetal circulation in the rabbit. *Proc. Roy. Soc. Biol.* 151: 478, 1960.
32. - Inchley, Ch. et al.: The Cytophilic activity of human immunoglobulins. *J. Immunol.* 105: 362, 1970.
33. - Huber, H. Fudemberg, H.: Receptor sites of human monocytes for IgG. *Int. Arch. Allerg.*, 34: 18, 1968.
34. - Vyas, G.N. et al.: Serologic specificity of human anti IgA and its significance in transfusion. *Blood* 34: 573, 1969.
35. - Grey, H.M and Kunkel, H.G.: Heavy chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S gamma globulins. *J. Exp. Med.* 120: 253, 1964,
36. - Terry, W. D. and Fahey, J.: *Science* 146: 400, 1964.
37. - Schurr, P.H., Monroe M. and Rothfield N. The IgG subclass of antinuclear antibodies. *Arth. and Rheum.* 15: 174, 1972.
38. - Kunkel, H.G. and Prendergast, R.A.: Subgroups of gamma A immunoglobulins. *Proc. Exp. Biol. Med.* 123: 105, 1966.
39. - Edelman, G.M. and Gaily, J.A.: The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma globulins. *J. Exp. Med.* 116: 207, 1962.
40. - Franklin E.C. et al.: Heavy chain disease. *Am. J. Med.* 37: 332, 1964.
41. - Seligman, M. et al: Immunochemical studies in four cases of alpha chain Disease *J. Clin. Inv.* 48: 2374, 1969.
42. - Forte, F. et al.: Heavy chain disease of the Mu Type. *Blood* 36: 17, 1970. 3
43. - Schurr, P. et al.: Selective gamma globulins deficiencies in patients with pyogenic infections. *N. Eng. J. Med.* 283: 631, 1970.
44. - Yount, W. et al.: Imbalances of Gamma Globulin Subgroups and Gene Defects in Patients with Primary Hypogammaglobulinemia. *J. Clin. Inv.* 49: 1957, 1970.
45. - Capra, J. D. and Kunkel H. G.: Aggregation of IgG3 proteins and hyperviscosity syndrome. *J. Clin. Inv.* 49: 610, 1970.
46. - Patarroyo, M. E.: Observaciones no publicadas.
47. - Graham, J. E. et al.: Immunochemical characterization of a human antibody to factor XIII. *Blood* 41: 661, 1973.
48. - Patarroyo, M. E., Winchester, R. and Kunkel, H. G.: IgG2 immunoglobulins on lymphoid cells. Identification of a new lymphocyte population (manuscrito en preparación).
49. - Grey, H.M. et al.: A subclass of IgA which lacks the disulfide bonds linking heavy and light chains. *J. Exp. Med.* 128: 1223, 1968.
50. - Edelman, G. M. et al.: The covalent structure of an entire gamma G globulin molecule. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 63: 78, 1969.
51. - Hood, L and Prahl, J.: The immune system. *Adv. in Imm.* 14: 291, 1971.
52. - Gaily, J.A. and Edelman: G.M. Somatic translocation of antibody genes. *Nature* 227: 341, 1970.
53. - Grubb, R., and Laurell, A.B.: Hereditary serological human serum groups, *Acta Path. et Mic. Scand.* 39: 390, 1956.
54. - Grubb, R.: The Genetic markers of human immunoglobulins. Springer Verlag. Berlin 1970.
55. - Natvig, J.B. and Kunkel H.G.: Human immunoglobulins, Classes, subclasses, genetic variants and idiotypes. *Adv. in Imm.* 16: 1, 1973.

56. - Kunkel, H.G.: Genetic marker of the IgA2 subgroup. *Nature* 223: 1247, 1969.
57. - Natvig, J.B. and Kunkel, H.G.: Genetic markers of human immunoglobulins. *Series haematologica* 1: 66, 1968.
58. - Natvig, J.B., Kunkel, H.G. and Litwin, S.: Genetic markers of the heavy chain subgroups of human gamma globulins. *Cold, spring Harbor Symp.* 32: 173, 1967.
59. - Natvig, J.B. Kunkel, H.G. and Gedde-Dahl, T.: Genetic Studies in heavy chain subgroups of IgG. *Gamma Globulins*, Interscience Publishers, Stockholm, 1968.
60. - Natvig, J.B. Kunkel H.G. and Michelsen T.E.: Evidence for deletions, duplication and hybridization among gamma G heavy chain genes. *Proc. Int. Congr. Bioch.* 8th, 1970.
61. - Natvig, J.B. et al.: Further studies on the gamma G heavy chain gene complexes. *S. Exp. Med.* 128: 763, 1968.
62. - Natvig, J.B. and Kunkel H.G.: Evidence for deletions and duplications on IgG genes. *Prot. Biol. Fluids* 18: 141, 1971.
63. - Van Loghem E.: Formal genetics of the immunoglobulin systems. *Ann. N.Y. Ac. Sci.* 190: 136, 1971.
64. - Worell, A. et al.: Correlation between the concentrations of the 4 subclasses of IgG and Gm allotypes in normal human serum. *J. Immunol.* 108: 195, 1972.
65. - Van der Giesen M. et al.: *Clin Exp. Imm.* 14: 127, 1973.
66. - Yount, W., Kunkel H.G. and Litwins, S.: Studies on the Vi subgroup of gammaglobulin. *J. Exp. Med.* 125: 177, 1967.
67. - Kunkel, H.G. et al.: Genetic variants of IgG4 globulins. *J. Exp. Med.* 132: 508, 1970.
68. - Patarroyo M.E. et al.: Ontogenesis del sistema inmune en el humano. (III Congreso Col. Med. Int. Medellín, 1974).
69. - Patarroyo M.E. et al.: Aspectos inmunológicos del LES. (III Cong. Col. Med. Int. Medellín, 1974).
70. - Patarroyo M.E. et al.: Clases y subclases de Inmunoglobulinas en la superficie de linfocitos en adultos normales. (III Cong. Col. Med. Int. Medellín, 1974).
71. - Patarroyo M.E. et al.: Heterogeneidad funcional del sistema linfocito. Identificación de un nuevo tipo de linfocitos. (III Cong. Col. Med. Int. Medellín, 1974).
72. - Lowry, O. H. et al.: Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
73. - Mannik M. and Kunkel, H.G.: Two major types of normal 7S gammaglobulin. *J. Exp. Med.* 117: 213, 1963.
74. - Scheidegger, J.J.: Une microméthode d'immunoelectrophorise. *Int. Arch. Allerg.* 7: 103, 1955.
75. - Sorber, H. A. et al.: *Ann. Chem.* 31: 857, 1959.
76. - Flodin, P. and Killander.: J.: Fractionation of human serum by gel filtration. *Bioch. Biophys. Acta* 63: 403, 1962.
77. - Fleisman, J.B., Pain, R.H. and Porter, R.R.: Reduction of gamma globulins. *Arch. Biochem. (Suppl.)* 1: 174, 1962.
78. - Steinbuch, S.A.: Simple method for the isolation of monoclonal immunoglobulins. *Rev. Eur. d'Et. Biol. et clin.* XV.: 1115, 1970.
79. - Schoenloher R.E., Kunkel, H.G., and Tomasi, T.: Activity of dissociated and reassociated 19S antigammaglobulins. *J. Exp. Med.* 120.: 1215, 1964.
80. - Patarroyo M.E. et al.: Preparación de antisueros altamente específicos contra subclases de IgG (Datos no publicados).
81. - Mannik M. et al.: Antibody agarose immunoabsorbents. *J. Imm.* 106: 1670, 1971.
82. - Patarroyo M.E.: (Datos no publicados).
83. - Kunkel, H.G. et al.: Genetic variants of IgG4. *J. EXP. Med.* 132: 508, 1970.
84. - Ospina L. et al.: (Datos no publicados).
85. - Walzer, P.D. and Kunkel, H.G.: The correlation of serum IgD concentration with Gm Allotype. *J. Immunol.* 113: 274, 1974.
86. - Harboe, M., Osterland K. and Kunkel, H.G.: Localization of 2 genetic factors to different areas of gamma globulin molecules, *Science* 136: 979, 1962.