

LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

CLASES Y SUB - CLASES DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES Y SU RELACION CON LA ACTIVIDAD ANTIGAMMAGLOBULINA

M. E. PATARROYO, F. CHALEM, H. ALVARADO

Se analizaron 70 sueros de pacientes lúpicos y 20 de individuos con otras enfermedades autoinmunes desde el punto de vista de anticuerpos antinucleares (AAN) por, clases y subclases de IgG, Complemento Sérico, anticuerpos anti—DNA, complejos inmunes circulantes (CIC) y actividad antigammaglobulina (AAG).

Se halló un comportamiento especial de los AAN de la subclase IgG3 que es dependiente de su concentración, los AAN de esta subclase presentaron un comportamiento muy diferente en diluciones mayores o iguales a 1:20 cuando se compararon con títulos iguales o menores a 1:10.

Se encontró una identidad entre los AAN de la subclase IgG3 y los anticuerpos anti—DNA, por esto y otras razones expuestas en la Discusión creemos que los anti-

cuerpos anti—DNA son los AAN de la subclase IgG3.

Los títulos de AAN de la subclase IgG3 mayores o iguales a 1:20 siempre se encontraron asociados con anticuerpos anti—DNA, hipocomplementemia, CIC y severo daño renal y nunca con AAG. A su vez dicha actividad se puso de manifiesto siempre que los AAN de la subclase IgG3 se hallaban en títulos iguales o inferiores a la dilución 1:10 o estaban ausentes.

Los sueros de los pacientes con AAN de la subclase IgG3 en títulos iguales o inferiores a 1:10 y asociados con normo y hipocomplementemia no presentaron ni CIC ni anticuerpos anti—DNA.

Creemos que a ciertas concentraciones la presencia de uno de estos anticuerpos (AAN de la subclase IgG3 o AAG) excluye al otro. Basados en estos y otros datos incluidos en la Discusión pensamos que la AAG es un mecanismo homeostático que regula la presencia y concentración de los AAN de la subclase IgG3.

Al no hallar los AAN de las otras subclases de IgG involucrados en la exacerbación del cuadro lúpico, no obstante que es-

Estudio realizado en las Secciones de Inmunología y Reumatología, Departamento de Patología y Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Centro Hospitalario San Juan de Dios, Bogotá.

Trabajo ganador del premio "SANDOZ" Mejor trabajo Institucional, III Congreso Colombiano de Medicina Interna, Agosto 14 a 17 de 1974, Medellín.

Solicitud de separatas al Dr. Patarroyo.

tán en concentraciones mayores, pensamos que puedan estar actuando como anticuerpos bloqueadores que inhibirían la acción nociva de los AAN de la subclase IgG3.

Basados en las observaciones anteriores como hipótesis de trabajo postulamos un mecanismo de fisiopatogénesis del LES, en el cual el paciente lúpico presentaría en algún momento de su vida una hiperreactividad humoral contra su propio DNA mediada por anticuerpos de la subclase IgG3 asociada simultáneamente con una hiporeactividad o deficiencia de su sistema anti-gammaglobulinas.

INTRODUCCION

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología desconocida que compromete diferentes tejidos del organismo.

El descubrimiento de las células LE (1) de los anticuerpos antinucleares (2-5) y de los depósitos electrón densos por microscopía electrónica (6) en la membrana basal glomerular de los pacientes lúpicos, pusieron de manifiesto que en la patogénesis de esta enfermedad se encontraban involucrados varios mecanismos inmunológicos. Hasta el presente existe considerable evidencia de que por lo menos hay dos mecanismos inmunológicos diferentes comprometidos en la patogénesis del LES.

Por una parte se considera al LES como una enfermedad autoinmune, debido a la presencia en el suero de estos pacientes de anticuerpos en títulos altos, contra una serie de componentes normales del organismo, tales como: Anticuerpos contra constituyentes nucleares, los cuales involucran anticuerpos dirigidos contra DNA nativo, DNA desnaturalizado de una sola cadena, núcleo-proteínas, proteínas-carbohidrato y antígeno SM (7). Son este tipo de anticuerpos, en especial los dirigidos contra el DNA nativo, los más importantes ya que su presencia se ha encontrado íntimamente ligada

con los procesos de exacerbación clínica de la enfermedad (8). Anticuerpos contra componentes citoplasmáticos, cuyo papel no ha sido bien establecido pero que probablemente estén involucrados en falsas reacciones para Sífilis (9). Anticuerpos contra plaquetas, eritrocitos y factores de la coagulación, los cuales se encuentran asociados con los fenómenos de púrpura, anemia, trombocitopenia (10). Anticuerpos anti-linfocíticos que se encuentran en los sueros de pacientes lúpicos en cierto momento de la enfermedad y especialmente en su comienzo, que podrían estar íntimamente involucrados en la leucopenia (11-14). Finalmente anticuerpos contra otras gammaglobulinas los cuales pueden estar participando en los procesos de crioglobulinas (15), fenómeno de Raynaud, vasculitis (16) y cuya función ha sido uno de los puntos de estudio en el presente trabajo.

El segundo componente inmunológico observado en el LES es un fenómeno muy similar al que sucede en las enfermedades por complejos inmunes, en las cuales se depositan a nivel de la membrana basal (glomerular, pulmonar, etc.) (17) complejos inmunes constituidos por antígenos más anticuerpos dirigidos contra estos antígenos y factores del complemento, los cuales por la acción quemotáctica de este último atraen células fagocíticas hacia el sitio en donde se han depositado; una vez allí, estas células liberan enzimas lisosómicas que destruyen la membrana basal y la pared vascular, produciendo los fenómenos inflamatorios, crónicos que se observan en estas enfermedades.

Habiendo observado que los antígenos contra los cuales se dirigen los anticuerpos de los pacientes lúpicos no difieren de los antígenos normales, enfocamos nuestro análisis hacia el o los defectos del sistema inmune que pueden llevar al paciente lúpico a la autoagresión y para este propósito analizamos exhaustivamente el sistema de los anticuerpos antinucleares en especial los anticuerpos contra el DNA nativo y el sistema

de los anticuerpos antigammaglobulinas.

Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas (Igs), se han dividido de acuerdo con sus características antigénicas, físicoquímicas y biológicas en 5 grandes clases denominadas IgG, A, M, D y E con una serie de funciones específicas de cada una de ellas (18), pero las que nos interesan por razones que detallaremos más adelante, son la IgG y la IgM. que son las que participan en el proceso de activación del sistema complemento.

Debido a diferencia antigénicas, físicoquímicas y biológicas la IgG se ha subdividido en 4 grandes subclases denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que corresponden en el suero respectivamente al 77%, 12%, 8% y 3% del total de las IgG. La IgG3 es la que tiene mayor capacidad de activar sistema complemento, le sigue la IgG1, es débil en IgG2 y nula en IgG4.

El sistema complemento está constituido básicamente por 11 proteínas séricas denominadas C'1 a C'9, de las cuales la fracción C'1 está conformada por tres subfragmentos conocidas como C'1q, C'1r, y C'1s, los cuales al ponerse en contacto con un complejo inmune (antígeno-anticuerpo) comienzan a activar los otros factores en una secuencia en cascada, determinada y precisa que conduce a la lisis de la célula a la cual se haya adherido dicho complejo, y a la vasodilatación y atracción de células fagocíticas (19).

Se ha observado que en los individuos lúpicos la aparición de anticuerpos anti-DNA, la presencia de complejos inmunes circulantes y la disminución de los niveles del complemento sérico se correlacionan perfectamente con la exacerbación de la enfermedad, indicando así unos mecanismos patogénicos similares a los de la nefritis de la enfermedad del suero (8).

Dentro del sistema complemento es importante la determinación cuantitativa de

las proteínas C'3 y C'4 en los individuos lúpicos, ya que tal determinación es uno de los parámetros de mayor utilidad en los estudios de enfermedades por complejos inmunes para indicar actividad de las mismas (20) y el aislamiento y purificación de C'1q que como ha sido demostrado por Agnello y col. (21) precipita los complejos inmunes solubles, de gran importancia en la patogénesis de la nefritis lúpica.

Los estudios de Köffler y col. (22) han demostrado que en los depósitos de inmunoglobulinas y complemento que se observan en las nefritis lúpicas se encuentran anticuerpos contra constituyentes del núcleo, implicando así que en la enfermedad por complejos inmunes que se observa en el LES están involucrados estos autoanticuerpos que, se producen contra el núcleo, en especial los anti-DNA (23,24).

Debido a la deficiente y contradictoria información al respecto, resolvimos analizar cuantitativamente los niveles de anticuerpos antinucleares (AAN) por clases y subclases para tratar de aclarar el papel desempeñando por cada uno de ellos y su relación con los anticuerpos anti-DNA. los complejos inmunes circulantes (CIC), la hipocomplementemia y la actividad antigammaglobulina (AAG), observada en algunos casos.

MATERIAL Y METODOS

Casuística. Se estudiaron 70 sueros obtenidos de 22 pacientes que reunían cuatro o más de los criterios establecidos por la American Rheumatism Association (ARA) para el diagnóstico de LES (25). Se incluyeron además 20 sueros de 7 pacientes en control con enfermedades auto-inmunes como Artritis Reumatoidea, Dermatomiositis, Escleroderma y Síndrome de Sjögren que presentaban AAN. En el presente estudio incluimos únicamente los pacientes con tres o más estudio inmunológicos y con títulos de AAN del 1 en 20 o más, según lo recomendado por Ritchie(26). Los sueros se

conservaron congelados a -20°C . hasta su uso.

Antisueros. La producción de estos antisueros se hizo según técnica ya descrita (27). La especificidad de los mismos fue comprobada mediante inmunodifusión e inmunoelectroforesis y reconfirmada por los laboratorios de H. Kunkel en la Universidad Rockefeller de Nueva York. Para la técnica de los anticuerpos fluorescentes, el proceso de conjugación utilizado fue el mismo descrito anteriormente (27).

Técnica de los anticuerpos antinucleares. Se hicieron cortes de hígado de ratón de cuatro micras de espesor, se fijaron con alcohol-acetona y se incubaron con el suero del paciente por 30 minutos. El exceso de suero, al igual que los anticuerpos no fijados, se removieron con tres lavadas con PBS de 15 minutos cada una. La reacción antígeno-anticuerpo se puso en evidencia en un segundo proceso de incubación usando los antisueros específicos marcados con fluoresceína. Las preparaciones se lavaron 3 veces con Buffer PBS ph 7.2 por 15 minutos y se examinaron con microscopía de fluorescencia (Figura 1). En todas las determinaciones se usaron controles positivos y negativos.

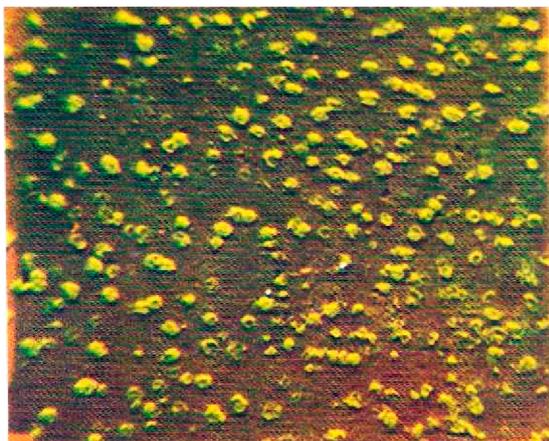


Figura 1.— Anticuerpos Antinucleares detectados mediante la técnica de la fluorescencia indirecta.

Biopsias renales. Fueron tomadas mediante punción e incluidas inmediatamente en Tissues Tek y rápidamente congeladas a menos 25°C . Los cortes se hicieron en criostato a la misma temperatura, con un espesor de 4 micras. Se dejaron secar y se cubrieron con antisuero por 30 minutos. Se lavaron tres veces con PBS por 15 minutos, examinándose en cada paso con microscopio de luz ultravioleta. Se estudiaron 6 biopsias, tres de ellas post-mortem (Figura 2).

Microscopía. Las preparaciones se observaron en microscopio Leitz Orthoplan, equipado con lámpara de vapor de mercurio Osram HBO-200 y con sistema epiiluminador de fluorescencia Ploen Opak 2 con filtros específicos para la longitud de onda de la fluoresceína. Para las fotografías se utilizaron películas Ektacrome High Speed luz de día de 23 Din, con tiempos de exposición de 2 a 4 minutos.

Inmunodifusión e Inmunoelectroforesis. Se utilizó para la inmunodifusión la técnica de Ouchterlony (28) en agarosa al 0.4% en los diferentes Buffers, de acuerdo con las especificaciones que mencionaremos más adelante; para la inmunoelectroforesis se utilizó la microtécnica de Scheidegger (29).

Aislamiento de C'Iq. Se utilizó la técnica de Yonemasu (30), en la cual se apro-

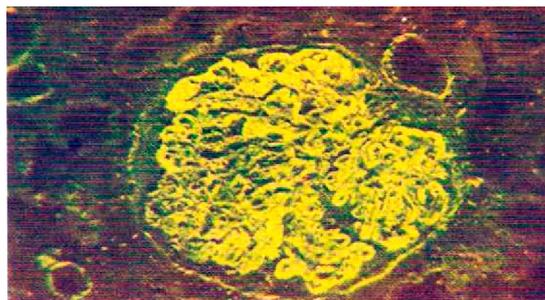


Figura 2.—"Depositos de IgG3 en membrana basal glomerular, detectados mediante fluorescencia directa. Nótese el patron granular, característico de los depositos de Complejos Inmunes.

vecha la ventaja de que C'1q es una euglobulina que se precipita en Buffers de baja ionicidad que contengan agentes quelantes como el EDTA. El C'1q así aislado presentaba una pureza de un 95%.

Preparación de agregados de gammaglobulinas. Para hacer la detección de la AAG utilizamos la técnica de precipitación de agregados, aislando las gammaglobulinas G con ácido caprílico y colocándolas en solución salina isotónica a una concentración de 10 mgrs./ml. Se calentaron a 63°C por 12 minutos y fueron rápidamente enfriadas. El 40% de las gammaglobulinas así tratadas se agrega y forma complejos inmunes de variable peso molecular que son detectados por los factores reumatoideos o AAG (31).

Determinación de complejos inmunes circulantes. Se utilizó la técnica de Agnello de inmunodifusión en agarosa al 0.4% en PBS 0.1 molar EDTA 0.01 molar ph-7.2. En el centro se colocó el C'1q purificado y en la periferia se colocaron las muestras de los diferentes sueros diluidos 1:1 en PBS; se incubó luego por 24 horas a 22°C y por 72 horas a 4°C. Como C'1q posee la capacidad de precipitar complejos inmunes, como control se utilizaron los agregados de las gammaglobulinas a una concentración de 5mgrs./ml. (32).

Determinación de actividad de anti-gammaglobulina o factor reumatoideo. Se utilizaron tres técnicas diferentes: a) la prueba de aglutinación del látex la cual se consideró positiva solamente a una dilución superior a 1/80 (33); b) la prueba de los agregados de gammaglobulina y c) la inmunodifusión en agarosa al 0.4% con PBS, colocando en el centro los agregados de gammaglobulinas en una concentración de 5 mgrs./ml. Los sueros con actividad positiva forman precipitados en el capilar, o líneas de precipitación con los agregados (34,35).

Detección de los anti-DNA. Se utilizó la técnica de contrainmuno-electroforesis se-

gún el método de Klajman (36). Para ello se usó agarosa al 0.4% en Buffer Veronal ph 8,6. Se dejó correr el suero por 20 minutos con un voltaje de 200 voltios y luego se aplicó DNA.nativo tipo 1 altamente polimerizado, previamente tratado con nucleasa 1 (para remover los pequeños fragmentos de DNA en los cuales hubieran quedado sitios de DNA de una sola cadena) a una concentración de 1 mgr./ml. y nuevamente se corrió la electroforesis al mismo voltaje por 20 minutos. Los sueros positivos dieron línea de precipitación en medio de los dos agujeros.

Determinación cuantitativa de complemento. Se hizo mediante inmunodifusión radial, según la técnica de Mancini-Carbonera, utilizando C'3 y C'4 purificados mediante las técnicas de Müller-Eberhard y col. (37 - 39).

Técnica de las células L.E. Las muestras, tomadas con heparina, se centrifugaron y posteriormente se incubaron a 37°C por un tiempo mínimo de 3 horas para permitir que se realizara el fenómeno L.E. Con los globulos blancos concentrados en un tubo capilar se hicieron extendidos que se colorearon y se examinaron al microscopio con objetivo de inmersión.

RESULTADOS

Uno de los objetivos más importantes planteados al comienzo de la investigación fue el de obtener los antisueros completamente puros y específicos (40,41), lo cual fue logrado y su especificidad confirmada en los laboratorios de la Universidad Rockefeller de Nueva York. Como el propósito, del presente trabajo fue el de identificar el papel de cada una de las clases y subclases de AAN, dedicaremos nuestro análisis principalmente hacia ellos. Como ya mencionamos, todos los 90 sueros presentaban AAN.

Clases de inmunoglobulinas que constituyen los anticuerpos antinucleares en el LES. El 100% de las muestras presentaron

AAN de la clase IgG con títulos superiores o iguales a la dilución 1:5; dichos anticuerpos fueron de una u otra de las subclases de IgG y el 90% presentó dos o más de ellas. Los sueros que presentaron una sola subclase de AAN o una sola reactividad, son actualmente motivos de estudios especiales.

Los AAN de la clase IgM se obtuvieron en un 45% con títulos superiores a la dilución 1:5 y solamente dos casos presentaron títulos superiores a la dilución 1:80.

Los AAN de la clase IgA se encontraron en un 15% de las muestras examinadas y sus títulos nunca excedieron la dilución 1:80. La importancia de estos datos será analizada más adelante.

Niveles de complemento sérico. En la muestras analizadas de pacientes con LES un 72% presentó hipocomplementemia. Consideramos hipocomplementemia a una reducción mayor o igual al 30% de las cifras normales de C'3 sérico (concentración normal de 80 a 110 mgrs.%) o de C'4 (45 más o menos 10 mgrs.).

Anticuerpos anti—DNA. La técnica de los anticuerpos anti—DNA detectados por contrainmuno-electroforesis que hemos empleado es más sensible que la inmunodifusión en gel (42), pero relativamente menos sensible aún cuando más específica que la de inhibición de hemaglutinación y que la de isótopos radioactivos (43). Estos conocimientos, además de razones económicas, fueron los motivos que nos llevaron a utilizar la contrainmuno-electroforesis como técnica de detección de los anticuerpos anti—DNA. De las 70 muestras de sueros lúpicos, el 33% presentaron anti—DNA, mientras que en ninguna de las muestras de sueros controles encontramos dichos anticuerpos.

Complejos inmunes circulantes. Fueron hallados en un 32% de las muestras de pacientes lúpicos, siendo dichos complejos en su gran mayoría, de alto peso molecular (de acuerdo a su poder de difusión en gel de

agarosa). En dos casos pudimos observar la coexistencia de ambos tipos de complejos; fueron a su vez los únicos en los cuales pudimos observar complejos de bajo peso molecular. Como la técnica de Agnello requiere 96 horas de incubación (21,32), es importante, observar las inmunodifusiones a las 24 horas, por ser en este momento cuando aparecen las líneas de precipitación de los complejos (debido a su bajo peso molecular). puesto que después pueden ser empujados hacia el agujero central donde se encuentra C'1q y desaparecer.

Actividad antigammaglobulina. Encontramos AAG en un 35% de los sueros lúpicos y en un 95% de los sueros controles (preferimos llamarla así y no factor reumatoideo para indicar que la encontramos por la prueba de precipitación con agregados y no con partículas de látex, la cual es menos sensible).

Anticuerpos antinucleares por subclases de IgG. Utilizando la dilución 1:5 como dilución inicial, encontramos que el 100% de las muestras de pacientes lúpicos presentaron AAN de la subclase IgG 1; un 80% presentaron AAN de la subclase IgG3 y solamente un 50% de las muestras lúpicas presentaron AAN de la subclase IgG4.

Anticuerpos antinucleares de la subclase IgG3 y complemento sérico. Los sueros de los pacientes lúpicos en los cuales se encontraron AAN de la subclase IgG3 con un título mayor o igual a la dilución 1:20 estaban siempre asociados con hipocomplementemia. De los otros sueros con AAN de la subclase IgG3 en títulos inferiores a la dilución 1:10, sólo unos pocos presentaban hipocomplementemia y los demás cursaban con normocomplementemia.

De las 70 muestras lúpicas, un 28% de ellas presentaron normocomplementemia, de las cuales el 18% tenían AAN de la subclase IgG3 a ninguna dilución, inclusive con suero sin diluir y el 10% restante presentó

un título igual o inferior a la dilución 1:10.

Correlación entre los anticuerpos antinucleares de la subclase IgG3 y los anticuerpos anti-DNA nativo. El 97% de la muestras que presentaron AAN de la subclase IgG3 a la dilución 1:20 o mayor, tuvieron anticuerpos anti-DNA.

Posteriormente se observó que cuando se agregaba DNA nativo a los sueros que presentaban anticuerpos anti-DNA, los AAN que desaparecían eran de la subclase IgG3, indicando así el que DNA estaba reaccionando con ellos y por lo tanto se puede concluir que estos son los anticuerpos anti-DNA.

Correlación entre anticuerpos antinucleares de la subclase IgG3 y complejos inmunes circulantes. De igual manera, un 97% de las muestras con AAN de la subclase IgG3 en un título igual o superior a la dilución 1:20 presentaron CIC detectables por el método de C'1q. Una sola muestra con AAN de la subclase IgG3 con un título 1:10 presentó CIC. El resto de las muestras con AAN de la subclase IgG3 con títulos iguales o inferiores a la dilución de 1:10 no presentó CIC, esto demuestra una vez más el comportamiento especial de los AAN de la subclase IgG3, pero ahora con relación a los CIC; es importante anotar que las muestras que presentaron los CIC eran sueros hipocomplementémicos y que en ningún suero normocomplementémico se detectaron CIC.

Actividad antigammaglobulina y anticuerpos antinucleares por subclase de IgG. Como mencionamos anteriormente un 35% de los sueros lúpicos presentó AAG. En estos casos también hallamos una relación con los AAN de la subclase IgG3 pero esta vez en una proporción inversa. Cuando se encontró dicha AAG en ningún caso se observó simultáneamente la presencia de AAN de la subclase IgG3 en títulos iguales o superiores a la dilución 1:20.

En la mitad de los casos en los cuales

encontramos AAG, no se hallaron AAN de la subclase IgG3 a ninguna dilución; simultáneamente el complemento sérico era normal. En un bajo porcentaje se hallaron los AAN de la subclase IgG3 en concentraciones inferiores a la dilución 1:10, en sueros con AAG y complemento disminuido. En otros términos, sólo encontramos AAG asociada con AAN de la subclase IgG3 en sueros con títulos de 1:5, máximo 1:10 cursando con normocomplementemia y en algunas circunstancias con hipocomplementemia (Tabla 1).

Al analizar las muestras en las cuales no se encontró AAG, se observó que la gran mayoría presentaban AAN de la subclase IgG3 en títulos iguales o superiores a 1:20 cursando simultáneamente con hipocomplementemia; un bajo porcentaje no presentaba AAN de la subclase IgG3 y se asoció también con hipocomplementemia y un pequeño número de casos cursaron sin AAN de la subclase IgG3 y con normocomplementemia (Tabla 2). De otra parte, al colocar sueros de pacientes lúpicos que tenían AAG frente a los sueros restantes, se observó que éstos reaccionaban con la gran mayoría de los sueros que presentaban AAN de la subclase IgG3 en títulos iguales o mayores a la dilución de 1:20 indicando así que en estos últimos se expresan determinantes antigénicos contra los cuales va diri-

Tabla 1 - Presencia de Actividad Antigammaglobulina cursando con ausencia de Complejos Inmunes circulantes y anti-DNA: bajos títulos de AAN de la subclase IgG3 y normocomplementemia.

Número de muestra	Fecha	A.A.*	C ₃	C ₄	AAN x subclase y subclase					Anti-DNA	CIC	Anti-Suc. Indica	C ₁ E
					2M	10A	10B	10C	10D				
866445 M.C.	10/75	640	10	-	40	40	5	780	-	-	-	5*	
	10/75	320	100	-	80	40	-	-	-	-	-	ND	
	10/75	160	20	-	20	80	80	10	20	-	-	-	
	10/75	80	20	-	20	80	80	20	20	+	-	ND	
	20/81	320	40	-	20	80	80	20	20	+	-	ND	
578664 F.A.C.	10/75	320	80	-	60	-	5	320	-	-	-	+	
	10/75	160	30	-	10	-	40	20	10	10	-	-	
	15/83	160	30	-	10	-	40	20	10	10	-	-	
	10/75	320	80	-	10	-	100	160	10	40	+	+	
	10/75	160	80	-	80	160	5	10	10	-	-	10*	

Tabla 2- Presencia simultánea de AAN de la subclase IgG3 y anti—DNA, cursando con hipocomplementemia (normal 80-110 mgr% de C'3) Complejos Inmunes Circulantes y ausencia de Actividad Antigammaglobulina.

Historia No.	Fecha	AAN	C'3	C'4	AAN y clases y subclases					Anti-DNA	Anti-CIC	Anti-Act. Antigamma	Tit. CIC
					IgM	IgA	IgG1	IgG2	IgG3				
E. L.M.	10/10/74	20	<10		10	10	20	-	+	+		1%	
	11/13	160	<10		20	40	40	20	+	+		2%	
	11/27	80	10		10		20	-	+	+		1%	
	12/05	40	<10		20				-	-		ND	
M.V.	11/3/73	40	<10	10	20	40	40	+	+	+		1%	
	10/16		<10	10	20	40	20	+	+			1%	
	11/6/73	80	<10	10	20	40	20	+	+			1%	

gida esta AAG. Estudios posteriores trabajando con factores reumatoideos aislados y purificados permitieron confirmar este dato indicando que la antigammaglobulina está detectando en estos sueros una sustancia contra la cual va dirigida su actividad, que bien puede estar en los anticuerpos anti—DNA, en los CIC o en alguna otra sustancia aún no identificada.

Comportamiento de las otras subclases de gammaglobulinas. La relación de los AAN de la subclase IgG1 (la otra subclase que es capaz de activar el sistema complemento) con los niveles de complemento sérico fue extremadamente variable, pues no se encontró ninguna correlación entre su título y la disminución del complemento. Los títulos altos de AAN de la subclase IgG1 cursaban simultáneamente con normocomplementemia, al igual que con ausencia de anticuerpos anti—DNA y CIC. Esto descarta la posibilidad de que los AAN, de la subclase IgG1 estén participando en la constitución de los anticuerpos anti—DNA o en la formación de los CIC; igual cosa sucedió con los AAN de las subclases IgG2 e IgG4, en donde no fue posible encontrar ninguna correlación entre sus títulos y los niveles de complemento sérico, la presencia de anticuerpos anti—DNA y los CIC.

Otro tanto sucedió con los AAN de la clase IgA en donde tampoco se encontró re-

lación con los parámetros antes anotados. Los AAN de la subclase IgM, que como ya se mencionó, salvo dos excepciones no presentaron títulos superiores de la dilución 1:80, se encontraron asociados en la gran mayoría de los casos con hipocomplementemia pero no los pudimos relacionar con la presencia de anticuerpos anti—DNA, o con los CIC, tal como lo hicimos para IgG3. Creemos que desempeñan algún papel en el fenómeno de la hipocomplementemia y que probablemente sean de valor para el pronóstico, pero dicho dato aún no se ha confirmado.

Biopsias renales por inmunofluorescencia. Los primeros datos sobre el comportamiento especial de los AAN de la subclase IgG3 fueron obtenidos por estudios de inmunofluorescencia realizados en biopsias renales así como por el análisis de los AAN por subclases en el suero tomado el mismo día de la biopsia.

En una de ellas había grandes depósitos glomerulares de C'3, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM mientras que en el suero se observaban hipocomplementemia y AAN de las subclases IgG1, IgG2 e IgG4 en diluciones mayores o iguales a 1:40 y no se encontraron AAN de la subclase IgG3 a tal dilución, pero sí en diluciones más bajas (1:10 y 1:20).

En consecuencia se debería replantear la aseveración de Ritchie, quien dice que los AAN tienen significado solamente cuando se hallan en diluciones mayores o iguales a

Otros tres casos de biopsia renal presentaron depósitos considerables de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM mientras que en el suero no se encontraron AAN de la subclase IgG3 ni de la clase IgM a ningún título, indicando que probablemente se han depositado allí, no sabemos si actuando uno con el otro o independientemente.

Correlación clínico-inmunológica. Al hacer el análisis clínico y correlacionarlo

con los datos de laboratorio, se observó que cuando se encontraban AAN de la subclase IgG3 a un título mayor o igual a la dilución de 1:20 siempre había severa lesión renal.

En los casos en los cuales se observaron estos anticuerpos en dichos títulos se encontró una marcada proteinuria (más de 3 gramos diarios), el nitrógeno uréico y la creatinina elevados y hematuria variable; indudablemente estos anticuerpos se encuentran íntimamente relacionados con el daño en la nefritis lúpica. Al contrario, salvo en dos casos no se observó daño renal severo en los pacientes en los cuales los AAN de la subclase IgG3 no aparecían o se encontraban en títulos menores o iguales a la dilución 1:10. Con alguna frecuencia se observó cierta relación entre la presencia de AAG en los pacientes lúpicos con AAN de la subclase IgG3 en títulos bajos (menos de 1:5) y compromiso pericárdico y pleural, relativamente benignos.

DISCUSION

Cuando comenzamos los estudios de anticuerpos antinucleares por clases y subclases de IgG a principios de 1.972, había un sin número de publicaciones acerca de las clases de Igs involucradas en este fenómeno y en la patogénesis del LES (44-46); pero no existían sino tres publicaciones acerca de las subclases de IgG involucradas en el fenómeno de AAN (47-49), con conceptos muy distintos.

Los primeros datos sobre la posible influencia de una subclase de IgG en los procesos activos del LES fueron los estudios de Tojo y col. (47), quienes observaron una alta capacidad fijadora del complemento en los sueros de los individuos lúpicos con nefritis, mientras que no observaron dicha capacidad en pacientes con LES en remisión.

Esto les hizo pensar en la posibilidad de que los anticuerpos involucrados en la exacerbación del proceso lúpico fueran de

la clase IgM o de las subclases IgG3 e IgG1 que son los mejores activadores del complemento.

En otro estudio, Kacaki y col. (48) hallaron AAN en pacientes con LES, Artritis Reumatoidea y Lupus inducido por procainamida, en todas las subclases de IgG con una distribución similar a la encontrada para estas subclases en sueros normales; dicho hallazgo es completamente opuesto al del grupo anteriormente mencionado.

El tercer estudio llevado a cabo por Schur y col. (49) estaba más de acuerdo con los estudios de Tojo, sugiriendo que los AAN dirigidos contra el DNA celular eran de las subclases IgG 1 e IgG3 en este orden, basándose en la suposición de que los AAN que dan patrón periférico son anticuerpos anti-DNA (45,46). Con estos datos' contradictorios, basados en pruebas indirectas y conociendo los problemas inherentes a la producción de antisueros contra subclases y después de haber probado la especificidad de nuestros antisueros, decidimos replantear al problema.

En dicho estudio se obtuvieron los siguientes datos:

Al analizar los AAN por subclases, se encontró una clara correlación de los niveles de anticuerpos anti-DNA y los de AAN de la subclase IgG3, confirmada por los experimentos de absorción con DNA nativo en donde se removían completamente estos AAN sin mayor detrimento de los niveles de AAN de las otras subclases, lo cual evidencia la identidad de los anticuerpos anti-DNA con los AAN de la subclase IgG3 e indican una relativa oligoclonalidad (o monoclonalidad) de este tipo de anticuerpos.

Este hallazgo se compagina con los datos obtenidos por Tojo, en los cuales encontró una alta capacidad fijadora del complemento en los sueros de pacientes lúpicos con exacerbación de la enfermedad; con los obtenidos por Luciano y otros (50,51), quienes informan de una estrecha córrrela-

ción entre la presencia de AAN de la clase IgG, anticuerpos anti—DNA nativo, CIC y enfermedad clínicamente activa; y con los obtenidos por Hugues y col. (52) quienes informan que los anticuerpos anti—DNA se encuentran en un alto porcentaje en los pacientes lúpicos con severo daño renal y que dichos anticuerpos desaparecen rápidamente con la terapia y durante la mejoría clínica. Esto se confirma ya que los anticuerpos de la subclase IgG3 son los mejores activadores del sistema complemento, con un tiempo de vida medio muy corto (6 días en comparación con 28 días de las otras subclases) (53-58) y por consiguiente puede desaparecer rápidamente de la circulación cuando se administra terapia inmunosupresiva o anti-inflamatoria.

Además, de acuerdo con nuestros resultados también se observó que en las muestras en las cuales se encontraron AAN de la subclase IgG3 en títulos mayores o iguales a la dilución 1:20, había siempre hipocomplementemia (20.22,23.50) y viceversa, en los casos en los cuales había normocomplementemia nunca hallamos AAN de la subclase IgG3 en tales concentraciones.

Por lo anterior, y teniendo en cuenta que la exacerbación clínica de las enfermedades por complejos inmunes cursa siempre con hipocomplementemia (59), se puede concluir que los AAN de la subclase IgG3 están íntimamente ligados a los procesos de consumo del complemento y a la exacerbación clínica de la enfermedad.

Tratando de explicar la patogénesis del LES, es importante anotar que en el 97% de las muestras en las cuales se encontraron AAN de la subclase IgG3 en títulos iguales o superiores a la dilución 1:20, se detectaron también CIC. Como es sabido, dichos complejos se presentan solamente cuando hay exceso de antígeno o de anticuerpo y por lo tanto han perdido sus proporciones óptimas de precipitación (60-63). Se sabe también que en las enfermedades crónicas

experimentales por complejos inmunes, para la formación de dichos complejos es de gran importancia la proporción antígeno-anticuerpo y el tamaño del complejo; si la proporción es óptima, se forman complejos de un tamaño molecular superior a 19 S, los cuales desaparecen rápidamente de la circulación al ser removidos por el sistema reticuloendotelial de los pulmones y el bazo, pero si hay un exceso de cualquiera de los dos factores, ya sea antígeno o anticuerpo, el tamaño de tales complejos es inferior a 19 S, permaneciendo solubles por largo tiempo en la circulación y depositándose finalmente a nivel de las membranas basales (60). Estos complejos solubles, por su acción sobre las plaquetas y otros factores, inducen la liberación de aminas vasoactivas que incrementan la permeabilidad de las membranas basales, atrayendo las células fagocíticas (23) que van a causar la patología descrita, a través de mecanismos ya estudiados (61-67).

En conclusión, podemos afirmar que en los casos en los cuales se han encontrado AAN de la subclase IgG3 en títulos mayores o iguales a la dilución 1:20, simultáneamente se han encontrado todos los componentes que se hallan involucrados en la enfermedad por complejos inmunes los cuales son: A) Un exceso de anticuerpos. B) hipocomplementemia y C) CIC.

Otro aspecto de considerable importancia en la patogénesis del LES, descrito en el presente estudio, es la relación de los AAN de la subclase IgG3 con la AAG; nunca se encontró AAG en las muestras que presentaron AAN de subclase IgG3 en títulos mayores o iguales a la dilución 1:20, mientras que dicha actividad existía en aquellas en las cuales IgG3 no se encontraba o estaba en diluciones muy bajas.

La AAG ya había sido encontrada por otros investigadores en forma de depósito en biopsias renales o presente en algunos sueros de pacientes lúpicos, pero su papel no había sido esclarecido (68-71).

En base a nuestros resultados, creemos que en el paciente lúpico una parte de dicha antigammaglobulina va dirigida contra los anticuerpos anti—DNA o AAN de la subclase IgG3 (ya sea contra la región constante (72) o contra la región variable de los mismos), dado que los sueros que presentaban AAG reaccionaban con sueros que tenían AAN de la subclase IgG3 en concentraciones elevadas. Además, se encontró que la AAG aislada pura y puesta frente a los distintos sueros lúpicos reaccionaba exclusivamente con aquellos sueros que tuvieran AAN de la subclase IgG3 en concentraciones superiores a la dilución 1:20; pero no con aquellos que presentaban AAN de las otras subclases en concentraciones elevadas ni con aquellos escasos sueros que presentaron AAN de la subclase IgG3, en títulos iguales a 1:20 con ausencia de CIC. Por tal razón se concluyó que la AAG iba dirigida contra los AAN de la subclase IgG3 o anti—DNA.

En base a estos datos pensamos que una fracción significativa de la AAG podría actuar como mecanismo regulador en el paciente lúpico, bien sea dirigiendo su actividad contra las regiones constantes de los anticuerpos anti—DNA (logrando de esta forma dar un mayor peso molecular a los CIC con lo cual se volverían precipitables, facilitando su remoción por parte del sistema reticuloendotelial); o por el contrario, bloqueando la región variable de los anticuerpos anti—DNA (impidiendo de esta forma la unión de los mismos con el DNA nativo y por tanto la formación de más CIC), o bloqueando la región variable en las células B (lo cual impediría producir más anticuerpos anti—DNA).

En otros términos, lo que puede estar sucediendo en el paciente lúpico en un momento dado de su enfermedad y más específicamente durante el proceso de exacerbación clínica, sería una hiperreactividad (desencadenada por factores desconocidos) del sistema productor de anticuerpos anti-DNA y simultáneamente una deficiencia del sistema antigammaglobulinas para regular los an-

ticuerpos anti—DNA; todo esto genéticamente regulado a través de los genes de respuesta inmune, lo cual estaría íntimamente relacionado con las características genéticas de histocompatibilidad o HLA.

En experimentos realizados en cepas de ratones NZB que presentaban un cuadro inmunopatológico y clínico casi idéntico al del LES del humano, se comprobó una hiperreactividad contra su DNA mediada por anticuerpos de la clase IgG2 (73), a la vez una hiporeactividad de su respuesta inmunológica celular la cual se encuentra íntimamente relacionada con la desaparición, paulatina de células supresoras en el organismo de estas especies (74). Recientemente se ha descrito un sistema genético en estas células supresoras, ligado al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (75,76).

Algo similar podría estar sucediendo en el humano y se ha intentado identificar el defecto buscando la interacción de distintos HLA (77), genes asociados de la respuesta inmune (78) con el lupus, o la susceptibilidad genética al mismo, con resultados no muy concluyentes (79) hasta ahora.

Si bien ya hemos establecido que cuando se observa la presencia de anticuerpos anti—DNA, hipocomplementemia, CIC y ausencia de AAG, se manifiesta la exacerbación clínica de la enfermedad; y que por el contrario cuando no hay anticuerpos anti-DNA ni CIC con normocomplementemia y AAG en el suero, se observa un cuadro de características clínicas poco severas, deduciendo por esto la posibilidad de que haya un efecto benéfico del sistema antigammaglobulina en el paciente lúpico; no se puede descartar aún, que cuando no se observa la AAG en los procesos de exacerbación clínica del lupus, lo que podría estar sucediendo es que al reaccionar con los anticuerpos, anti-DNA, formaría un nuevo tipo de CIC, que al depositarse en las membranas basales por acción del sistema complemento, desencadenaría todo el proceso antes descrito de destrucción tisular. Alguna evidencia existe

a este respecto (80) y basados en estas consideraciones pensamos que tal fenómeno podría encontrarse en algunos casos cuando hay una hiperreactividad en la producción de anticuerpos anti-DNA, cursando simultáneamente con una hiperreactividad de la capacidad de producir anticuerpos antigammaglobulina.

Similar fenómeno se presentaría cuando los anticuerpos antigammaglobulina fueran de una clase diferente a la que se encuentra en la mayoría de los casos (en vez de ser de la clase IgM, podrían ser de la clase IgG o IgA). Cualquiera que sea la posibilidad, es interesante observar que la presencia de AAG en el suero la hemos encontrado en los cuadros clínicos menos severos del lupus como en los casos de compromiso pleural (81), pericárdico y articular, pero no en los de compromiso renal (82-87). Como parte práctica de la discusión queremos anotar que IgG3 es un anticuerpo muy especial dentro del conjunto de los anticuerpos de la clase IgG (88-90); tiene un peso molecular diferente a las otras subclases de IgG (91); un mayor número de puentes disulfuro entre sus cadenas pesadas (89); es la principal Ig involucrada en el fenómeno de crioglobulina (92); tiene un comportamiento muy particular que es dependiente de su concentración en el síndrome de hiperviscosidad (93); es la Ig a la cual se adhiere en mayor cantidad C'1q (94) y por consiguiente el sistema complemento; y finalmente presenta una característica, que puede aprovecharse para instituir una terapia más racional en los pacientes lúpicos y es su tiempo de vida media tan corto (6 días, aproximadamente 1/4 parte del tiempo de vida media de los otros anticuerpos de la clase IgG) (95-99) y por lo cual la terapia inmunosupresora que se instaure en los casos en los cuales IgG3 juegue un papel importante debe ser de más corta duración.

Por último quisiéramos señalar que como los AAN de las otras subclases no se encontraron involucrados en la formación

de los anticuerpos contra DNA nativo ni en la hipocomplementemia ni están relacionados con la presencia de los CIC y habiéndolos encontrado en títulos más altos que los AAN de la subclase IgG3, existe la posibilidad que vayan dirigidos contra otros determinantes antigénicos del núcleo celular, tratando de bloquear la actividad de los AAN de la subclase IgG3 (100-102), pero que sin embargo su significado permanece aún desconocido.

SUMMARY

Seventy sera of lupic patients and 20 of patients with other autoimmune diseases were analysed for antinuclear antibodies (ANA) by IgG classes and subclasses, complement, anti-DNA antibodies, circulating immune complexes (CIC) and anti-gammaglobulin activity (AGA).

A special behaviour of the ANA IgG3 subclass, depending on its concentration, has been found; the ANA of this subclass presented a very different behaviour in dilutions superior or equal to 1:20 when compared with titers equal or inferior to 1:10.

An almost complete identity was found between ANA IgG3 subclass and anti-DNA antibodies; for this and other reasons presented in the Discussion we postulate that the anti-DNA antibodies are the ANA IgG3 subclass.

The titers of ANA IgG3 subclass superior or equal to 1:20 were always to be found associated with anti-DNA antibodies, hypocomplementemia, CIC and severe renal damage but never with AGA. This activity in its turn was underscored each time that the ANA IgG3 subclass was found in titers inferior or equal to 1:10 or was absent.

Sera with ANA IgG3 subclass in titers inferior or equal to 1:10 and associated with normo or hypocomplementemia, did not present simultaneously either CIC or

anti-DNA antibodies

We think that in certain concentrations the presence of one of these antibodies (ANA IgG3 subclass or AGA) excludes the other. Based upon these and other data included in the Discussion, we consider that the AGA is a homeostatic mechanism which regulates the presence and concentration of the ANA IgG3 subclass.

Founded on the previous observations as hypothesis for working we consider a SLE physiopathogenic mechanism in which the lupic patient will present in any time during his life a humoral hyperreactivity against his DNA mediated by antibodies of the IgG3 subclass associated simultaneously with a hyporeactivity or deficiency of his anti-gammaglobulin system.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Drs. Mario Peña, Humberto Lizarazo y Pedro Farías de la Sección de Reumatología, Andrés Revollo y Alberto Carreño de la Sección de Nefrología, por el envío de pacientes.

Damos también las gracias al personal del laboratorio de Inmunología del Hospital San Juan de Dios de Bogotá y en especial a las Señoritas María Elvira Granados y Astrid Camacho por su eficiente asistencia técnica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hargraves, M.M., Richmond, H. and Morton, R.: Presentation of two bone marrow elements: The "tart" cell and the "LE" cell. Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 23:23 - 28, 1948.
- Holman, H.R. and Kunkel, H.G.: Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. Science 126:162, 1957.
- 3.- Asherson, G. L.: Antibodies against nuclear and cytoplasmic cell constituents in systemic lupus erythematosus and other diseases. Brit. J. Exp. Path. 40: 209, 1959.
- 4.- Seligmann, M. et Milgrom, F.: Mise en évidence par la fixation du complément de la réaction entre acide désoxyribonucleique et le sérum de malades atteints de lupus érythémateux disséminé. C.R. Acad. Sci. 245:1472, 1957.
- 5.- Deicher, H.R., Holman, H.R. and Kunkel, H.G.: The precipitin reaction between DNA and a serum factor in systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med. 109:97, 1959.
- 6.- Cochrane, C. and Köffler, G.: Immune complex disease in experimental animals and man. Adv. Immunol. 16:185, 1973.
- 7.- Kunkel, H. G. and Tan, E.M.: Autoantibodies and disease. In Dixon, F.J. and Humphrey, J.H. (Eds). Advances in Immunology, New York Academic Press, 1964, p. 351.
- 8.- Schur, P.H. and Sandson, J.: Immunological factors and clinical activity in lupus erythematosus. New Engl. J. Med. 278:533 - 538, 1968.
- 9.- Deicher, H.R., Holman, H.R. and Kunkel H.G.: Anticytoplasmic factors in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and certain other diseases. Arthritis Rheum. 3:1, 1960.
- 10.- Castro, O., Farber, L.R. and Clyne, L.P.: Circulating anticoagulants against factors IX and XI in systemic lupus erythematosus. Ann. Intern. Med. 543 - 548, 1972.
- 11.- Terasaki, P.I., Mottirone, V.D. and Barnett, E.V. Cytotoxins indisease:autocytotoxins in lupus. New Engl. J. Med. 283: 724 - 728, 1970.
- 12.- Stastny, P. and Ziff, M.M.: Antibodies against cell membrane constituents in systemic lupus erythematosus and related diseases. I. Cytotoxic effect of serum from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) for allogeneic and for autologous lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 8:543 - 550, 1971.
- 13.- Mittal, K.K., Rossen, R.D., Sharp, J.T. et al.: Lymphocyte cytotoxic antibodies in systemic lupus erythematosus. Nature (Lond.) 225:1255 - 1256, 1970.
- 14.- Lies, R., Messner, R and Wilhams, R.C.: Relative T. cell especificity of Lymfgocytotoxins from patients with SLE. Arthritis Rheum. 16: 369, 1973.
- 15.- Wernet, P. and Kunkel, H. G.: Antibodies to a specific surface antigen of T. cells in human sera inhibiting MLC. J. Exp. Med. 138: 1021, 1973.
- 16.- Agnello, V., Koffler, D. and Kunkel, H.G.: Immune complex systems in the nephritis of systemic lupus erythematosus. Kidney International 3:90, 1973.

- 17.- Dixon, F.J., Feldman, J. D. and Vasquez, J.J.: Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 113:889, 1961.
- 18.- Franklin, E.C. and Frangione, B.: Immunoglobulins. *Ann. Rev. Med.* 20: 115 - 174, 1969.
- 19.- Müller - Eberhard, H.J.: The complement sequence, its components and reaction products. *Proc. Fifth Internat. Symp. on Biol. Activs. of Complement.* Basel, S. Karger, 1971.
- 20.- Ruddy, S., Gigli, I. and Austen, K.F.: The complement system of man. *New Engl. J. Med.* 287:489-495, 545 - 549, 592 - 596, 642 - 646, 1972.
- 21.- Agnello, V., Köffler, D., Eisenberg, J.W., Winchester, R.J. and Kunkel, H.G.: C'1q precipitins in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and other hypocomplementemic states: characterization of high and low molecular weight types. *J. Exp. Med.* 134: (Suppl.) 228, 1971.
- 22.- Köffler, D., Schur, P. H. and Kunkel, H. G.: Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 126:607, 1967.
- 23.- Cohen, S.A., Hughes, G.R.V., Noel, G.L. and Christian, C.L.: Character of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 8:551, 1971.
- 24.- Köffler, D., Agnello, V., Thoburn, R. and Kunkel, H. G.: Systemic lupus erythematosus: prototype of immune complex nephritis in man. *J. Exp. Med.* 134: (Suppl.) 169, 1971.
- 25.- Cohen, S.A., Reynolds, W. E., Franklin, E. C. et al.: Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull. Rheum. Dis.* 21: 643, 1971.
- 26.- Ritchie, R.: Antinuclear antibodies. *Lahey Clinic Foundation Bulletin* 20:95, 1970.
- 27.- Patarroyo, M. E., Mendoza, C., Ospina, L. y Restrepo, A.: Clases, subclases y Marcadores Genéticos en las Inmunoglobulinas del Mieloma Múltiple en Colombia. *Acta Med. Col.* 1:3, 1976.
- 28.- Ouchterlony, O.: Antigen - antibody reactions in gel. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 32:231 - 240, 1953.
- 29.- Scheidigger, J.J.: Une micro - méthode d'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. All. App. Immunol.* 7: 103 - 110, 1955.
- 30.- Yonemasu, K. and Stroud, R. M.: C'1q: Rapid purification method for preparation of monospecific antisera and for biochemical studies. *J. Immun.* P. 106:2, 1971.
- 31.- Christian, C. L.: Characterization of the reactant in the F II precipitin reaction. *J. Exp. Med.* 108:139, 1958.
- 32.- Agnello, V., Winchester, R.J. and Kunkel, H. G.: Precipitin reactions of the C'1q component of complement with aggregated γ globulin and immune complexes in gel diffusion. *Immunology* 19:909, 1970.
- 33.- Bartfeld, H. and Epstein, W. V. (eds): Rheumatoid factors and their biological significance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 168: 1-207, 1969.
- 34.- Stage, D.E. and Mannik, M.: Rheumatoid factors in rheumatoid arthritis. *Bull. Rheum. Dis.* 23:720 - 725, 1973
- 35.- Winchester, R. J., Agnello, V. and Kunkel, H. G.: Gammaglobulin complexes in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis: Partial characterization and relationship to lowered complement levels. *Clin. Exp. Immunol.* 6:689 - 706, 1970.
- 36.- Kajman, A., Farkash, R. and Myers, B.: Demonstration of antibodies to DNA by Counter electrophoresis. *J. Immunol.* 111:1136, 1973.-
- 37.- Mancini, G., Carbonara, A. O. and Heremans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* 2:235, 1965.
- 38.- Müller - Eberhard, H. J., Nilsson, U. and Aronsson, T.: Isolation and characterization of two beta 1 glycoproteins of human serum. *J. Exp. Med.* 111:201, 1960.
- 39.- Müller - Eberhard, H. J. and Biro, C. E.: Isolation and description of the fourth component of human complement. *J. Exp. Med.* 118:447, 1963.
- 40.- Natvig, J. B. and Kunkel, H. G.: Human immunoglobulins classes, subclasses, genetic variants and idiotypes. *Adv. Immunol.* 16:1, 1973.
- 41.- Michaelsen, T. E., Natvig, J. B. and Stetten, K.: Isolation of a fragment, Fh, corresponding to the hinge region of IgG3. *Scandin. J. Imm.* 3:491, 1974.
- 42.- Tan, E.M., Schur, P. H., Carr, R. I. and Kunkel, H. G.: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 45:1732, 1966.
- 43.- Pincus, T., Schur, P. H. and Rose, J. A.: Measurement of serum DNA - binding activity in systemic lupus erythematosus. *New Engl. J. Med.* 281: 701, 1969,

- 44.- Barnett, E. V., Condemi, J. J., Leddy, J. P. et al: Gamma 2, gamma 1 A, and gamma 1 M antinuclear factors in human sera. *J. Clin. Invest.* 43:1104, 1964.
- 45.- Gonzalez, E. N. and Rothfield, M. F.: Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *New, Engl. J. Med.* 274:1333, 1966.
- 46.- Rothfield, N. F. and Stollar, D.: The relation of immunoglobulin class, pattern of antinuclear antinuclear antibody and complement fixing antibodies to DNA in sera from patients with SLE. *J. Clin. Invest.* 46:1875, 1967.
- 47.- Tojo, T., Friou, G. J. and Spiegelberg, H. L.: Immunoglobulin G subclass of human antinuclear antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 6:145, 1970.
- 48.- Kacaki, J. N., Callera, M. L., Blomgren S. F. et al: Immunoglobulin G subclasses of antinuclear antibodies and renal deposits: Comparison of systemic lupus erythematosus drug - induced lupus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 14:276, 1971.
- 49.- Schur, P. H., Monroe, M. and Rothfield, N.: The gamma G subclasses of antinuclear and antinuclear acid antibodies. *Arthritis Rheum.* 15:174, 1972.
- 50.- Luciano, A. and Rothfield, N.: Patterns of nuclear fluorescence and DNA binding activity. *Ann. Rheum. Dis.* 32: 17, 1973.
- 51.- Dixon, F. J. and Kunkel, H. G.: Selected topics on immunological aspects of renal disease. *Kidney International.* 3:55, 1973.
- 52.- Hughes, G. R. V., Cohen, S. A. and Christian, C. L.: Anti-DNA activity in SLE. *Ann. Rheum. Dis.* 30: 259, 1971.
- 53.- Grey, H. M., Kunkel, H. G.: H chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S gammaglobulin. *J. Exp. Med.* 120: 253, 1964.
- 54.- Yount, W., Kunkel, H. G., Litwin, S.: Studies on the Vi subgroup of gammaglobulin. *J. Exp. Med.* 125: 177, 1967.
- 55.- Spiegelberg, H. L., Fishkin, B. G. and Grev, H. M.: Catabolism of human γ G immunoglobulins of different heavy chain subclasses. I. Catabolism of γ G myeloma proteins in man. *J. Clin. Invest.* 47: 2323-2330, 1968.
- 56.- Morell, A., Terry, W. and Waldmann, T.: Relation between metabolic properties and serum concentration of IgG subclasses in man. *J. Clin. Invest.* 49: 673-680, 1970.
- 57.- Müller-Eberhard, J. H. and Calcott, M. A.: Interaction between C1q and gamma G globulin. *Immunochem* 3:500, 1966 (abstract).
- 58.- Ishizaka, T., Ishizaka, K., Salomon, S. et al: Biologic activities of aggregated gamma-globulin, VIII. Aggregated immunoglobulins of different classes. *J. Immunol.* 99:82-91, 1967.
- 59.- Lewis, E. J., Busch, G. J. and Schur, P. H.: Gamma G globulin subgroup composition of the glomerular deposits in human renal diseases. *J. Clin. Inv.* 49: 1103, 1970.
- 60.- Cochrane, C.G. and Hawkins, D.: Studies on circulating immune complexes. III. Factors governing the ability of circulating complexes to localize in blood vessels. *J. Exp. Med.* 127:137-154, 1968.
- Pincus, T., Haberkem, R. and Christian, C. L.: Experimental chronic glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 127: 819-832, 1968.
- 62.- Dixon, F. J., Oldstone, M. B. A. and Toniatti, G.: Pathogenesis of immune complex glomerulonephritis of New Zealand mice. *J. Exp. Med.* 134: (Suppl.) 65, 1971.
- 63.- Cochrane, C. G.: The role of immune complexes and complement in tissue injury. *J. Allergy* 42: 113-129, 1968.
- 64.- Unanue, E. R. and Dixon, F. J.: Experimental glomerulonephritis: Immunological events and pathogenetic mechanisms. *Adv. Immunol.* 6:1-90, 1967.
- 65.- Light Foot, R. W. et al: Properties of soluble immune complexes. *J. Immunol.* 105:1493, 1970.
- 66.- Cochrane, C. G.: Mediators of the Arthus and related reactions. *Prog. Allergy* 11:1-35, 1967.
- 67.- Dixon, F. J.: The immunopathology of glomerulonephritis. In Samter, M. (ed): *Immunological Diseases*, ed 2, Boston, Little Brown & Co, 1971, pp. 1125-1133.
- 68.- Koffler, D., Agnello, V., Carr, R. I. and Kunkel, H. G.: Variable patterns of immunoglobulin and complement deposition in the kidneys of patients with systemic lupus erythematosus. *Am. J. Pathol.* 56: 305, 1969.
- 69.- Christian, C. L., Hatfield, W. B. and Chase, P. H.: Systemic lupus erythematosus. Cryoprecipitation of sera. *J. Clin. Invest.* 42:823, 1963.
- 70.- Hanauer, L. B. and Christian, C. L.: Studies of cryoproteins in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 46:500, 1967.

- 71.- Winchester, R. J., Agnello, V. and Kunkel, H. G.: Occurrence of gammaglobulin complexes in serum and joint fluids of RA patients. *J. Exp. Med.* 134: (Suppl.) 286, 1971.
- 72.- Natvig, J. B.: Human Antigammaglobulin Antibodies specific for IgG heavy chain subclasses. *Immunology* 19:125, 1970.
- 73.- Lambert, P. H. and Dixon, F.: *Clin. Exp. Imm.* 6: 829, 1970.
- 74.- Krakaver R. S., Waldman, T. A. and Strober, W.: Loss of suppressor T cells in adult NZB/NZW mice. *J. Exp. Med.* 144: 662, 1976.
- 75.- Okomura, K., Herzemberg, L. Murphy, D. B., McDevitt, H. O. and Herzemberg, L. A.: Selective expression of H-2 (I region) loci controlling determinants of helper and Suppressor T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 144: 685, 1976.
- 76.- Sheffler, D. C., and David, C.S.: The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: genetic variation, function and organization. *Adv. Immunol.* 20: 125, 1975.
- 77.- Grumet, C. F. et al.: HL-A antigens associated in SLE. *New Eng. J. Med.* 285:193, 1971.
- 78.- Patarroyo, M. E. y Orozco, O.: Complejo Mayor de Histocompatibilidad. *Acta Med. Col.* 2:65, 1977.
- 79.- Hansen, J. A. et al: MLC determinants (HLA-D) in patients with Systemic Lupus Erythematosus. In press, 1977.
- 80.- Koffler, D. and Kunkel, H. G.: Mechanisms of renal injury in systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.* 45:165-169, 1968.
- 81.- Hunder, G. G., McDuffie, F. C. and Hepper, N. G.: Pleural fluid complement in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* 76:357-363, 1972.
- 82.- Natali, P. G. and Tan, E. M.: Experimental renal disease induced by DNA anti-DNA immune complexes. *J. Clin. Invest.* 51:345-355, 1972.
- 83.- Casals, S. P., Friou, G. J. and Myers, L. L.: Significance of antibody to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 7:379-390, 1964.
- 84.- Hughes, G. R. V., Cohen, S. A and Christian, C.L.: Anti-DNA activity in systemic lupus erythematosus. A diagnostic and therapeutic guide. *Ann. Rheum. Dis.* 30:259-264, 1971.
- 85.- Lambert, P. H. and Dixon, E. J.: Pathogenesis of glomerulonephritis of NZB/W mice. *J. Exp. Med.* 127:507-522, 1968.
- 86.- Cochrane, C.G. and Hawkins, D. J.: Studies on Circulating Immune Complexes. *J. Exp. Med.* 137: 127, 1968.
- 87.- Germuth, et al: Immune Complex Diseases. I. Experimental acute and chronic glomerulonephritis. *Johns Hopkins Med. Sci.* 120: 225, 1967.
- 88.- Michaelsen, T. E. and Natvig, J. B.: Unusual molecular properties of IgG3 proteins due to an extended hinge region. *J. Biol. Chem.* 249:2778, 1974.
- 89.- Michaelsen, T. E.: Evidence of 15 S-S bridges in the hinge region of human IgG3. *Scand. J. Imm.* 2: 523, 1973.
- 90.- Virella, G. and Parkhouse, R. M.: Determination of the M. W. of human IgG3 chains by PAGE in the presence of SDS. *Immunology* 23:857, 1972.
- 91.- Michaelsen, T. E. and Natvig, J. B.: The hinge region of IgG3, an extended part of the molecule. *FEBS letters.* 28: 121, 1972.
- 92.- Grey, H. M. et al: Human monoclonal IgG cryoglobulins with antigammaglobulin activity. *J. Clin. Inv.* 47:1875, 1968.
- 93.- Capra, J. D. and Kunkel, H.G.: Aggregation of IgG3 proteins and hyperviscosity syndrome. *J. Clin. Inv.* 49: 610. 1970.
- 93.- Agnello, V., Winchester, R. J. and Kunkel, H. G.: Precipitin reactions of C'1q with various gammaglobulins and anionic macromolecules. *J. Immunol.* 107:309, 1971.
- 95.- Ackeman, G. L.: Alternate day steroid therapy in lupus nephritis. *Ann. Intern. Med.* 72:511-519, 1970.
- 96.- Drinkard, J. P. et al: Azathioprine and prednisone in the treatment of adults with lupus nephritis. *Medicine* 49:411-432, 1970.
- 97.- Szejnabok, M. et al: Azathioprine in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 14:639-645, 1971.
- 98.- Hayslett, J. P. et al: The effect of azathioprine on lupus glomerulonephritis. *Medicine* 51:393-412, 1972.
- 99.- Steinberg, A. D. et al: Cyclophosphamide in lupus nephritis: A controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 75:165-171, 1971.
- 100.- Cohen, S. A. et al: Character of Anti-DNA antibodies in SLE. *Clin. Exp. Imm.* 8:551, 1971.

101.- Koffler, D., Agnello, V. and Kunkel, H. G.: The occurrence of single stranded DNA in the serum of patients with Systemic Lupus Erythematosus and other diseases. *J. Clin. Invest.* 54: 1973.

102.- Koffler, D., Carr, R. I., Agnello, V., Thoburn, R. and Kunkel, H. G.: Antibodies to polynucleotides in human sera: antigenic specificity and relation to disease. *J. Exp. Med.* 134:294, 1971.