

UNIVERSIDAD DE NAVARRA, FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS DEL C. S. I. C.

Gammaglobulinas lentas

P. Liso Irurzun y M. Pérez Miranda*

RESUMEN

Se han podido demostrar por inmunolectroforesis de sueros humanos normales dos bandas de precipitación más lentas que la IgG, habiéndose analizado las condiciones de concentración de los sueros y antisueros que son necesarias para su demostración. Una de las bandas aparece como un desdoblamiento catódico de la IgG y fue denominado GGP. La otra fue de migración más lenta y cruza el arco de IgG. Fue denominada GGL.

La GGP fue aislada por gel-filtración. Se calculó su constante de sedimentación por ultracentrifugación, en 7,5 S. El análisis antigénico de la misma demostró que correspondía a una de las subclases de IgG. La investigación de actividad antigammaglobulina en estas preparaciones dio resultado positivo, siendo negativo con otras tres subfracciones de IgG, aisladas igualmente por gel-filtración, de constantes de sedimentación 6,8, 6,5 y 6,2 S.

La GGL fue aislada por gel-filtración y en cromatografía en DEAE-celulosa. Su análisis antigénico por inmunodifusión evidenció su individualidad respecto a IgG, IgA, IgM, IgE, IgD y proteína C reactiva, entre otras proteínas consideradas. No demostró actividad antigammaglobulina. Su constante de sedimentación fue calculada en 0,9 S.

La investigación de sueros patológicos evidenció alteraciones cuantitativas y cualitativas de estas fracciones, discutiéndose el valor diagnóstico-diferencial y pronóstico de su determinación en el suero de pacientes.

El estudio de las proteínas del suero humano continúa siendo un tema de interés actual. Su importancia crece cada día

a la luz de nuevas aportaciones que proporcionan un mejor conocimiento de la estructura y funciones de las mismas^{11, 27, 66, 70}. La complejidad y finura de las técnicas de trabajo, incorporadas en los últimos años al estudio de las proteínas plasmáticas, ha permitido obtener conoci-

(*) Trabajo realizado con una Beca de ayuda a la Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia.

mientos importantes a nivel molecular respecto al significado fisiológico y a las modificaciones patológicas de estos componentes del suero ^{7, 16, 49, 66, 80}.

Los métodos de aislamiento de los componentes séricos se han perfeccionado mediante la utilización de la gel-filtración ^{12, 66}, y de las resinas de intercambio iónico, que permiten separar las fracciones proteicas totalmente aisladas según sus propiedades físico-químicas específicas ^{28, 55}. La utilización de la ultracentrifugación analítica permite medir la constante de sedimentación y el peso molecular de las distintas fracciones, proporcionando por tanto criterios adicionales para la individualización de las mismas ^{28, 80}.

El empleo de todos estos métodos no sólo ha permitido un mejor conocimiento de la estructura y función de las proteínas plasmáticas, como queda dicho, sino que ha hecho posible también la demostración e individualización de nuevos componentes proteicos del suero que hasta hace pocos años permanecían ignorados ^{4, 11, 14, 57}. Junto a la completa caracterización de estos nuevos componentes individualizados, de los cuales se conocen ya en la mayor parte de los casos su papel fisiológico y algunas de sus modificaciones patológicas, se han publicado en los últimos años datos que sugieren la existencia de otros componentes, cuya caracterización e individualización no ha podido ser lograda de una manera definitiva hasta el presente ^{30, 61, 77}. Se trata fundamentalmente de fracciones proteicas de migración electroforética en dirección catódica y de bajo peso molecular ^{30, 46, 61}. Puesto que esta zona electroforética está ocupada por las inmunoglobulinas, la existencia de estos otros componentes encierra el interés que se deriva de sus posibles relaciones con las inmunoglobulinas. Efectivamente, se ha podido comprobar en algunas ocasiones que estos componentes de migración electroforética lenta en dirección catódica eran

solamente, o bien subclases de algunas de las inmunoglobulinas de esa zona, o bien fragmentos de las mismas ^{30, 46, 61, 77}. En otros casos, sin embargo, se ha podido demostrar de manera precisa que estos componentes no guardaban ninguna relación con las inmunoglobulinas conocidas ⁴⁴.

En un trabajo previo pudimos demostrar por inmunoelectroforesis la presencia ocasional en sueros humanos de una gammaglobulina de migración más lenta que la IgG y aparentemente sin relaciones con ella ⁵³. El presente trabajo ha sido realizado con el objeto de establecer si esta fracción proteica puede ser identificada como uno de estos componentes de bajo peso molecular más o menos relacionado estructuralmente con fragmentos o subfracciones de las inmunoglobulinas o por el contrario era un componente totalmente individualizado semejante al que hemos aludido anteriormente, que había sido demostrado en el suero de animales ⁴⁴. El interés de este estudio está, a nuestro juicio, acrecentado si consideramos que recientemente se ha comunicado que proteínas de bajo peso molecular no bien caracterizadas electroforéticamente mostraron una actividad precipitante frente a ribonucleicos que es equiparable a la actividad precipitante de los anticuerpos ²³.

Para poder precisar la individualidad antigénica, físico-química, así como estructural de esta fracción gammaglobulina lenta se ha hecho un análisis antigénico-diferencial de la misma con respecto a las cinco clases de inmunoglobulinas conocidas y a otros componentes gamma tales como la proteína C y el factor reumatoide ^{52, 80}.

Por último, nos han interesado también las posibles relaciones de esta fracción gammaglobulina lenta con la actividad antigammaglobulínica que habitualmente puede estar localizada en esta zona ⁸⁰.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Sueros utilizados.

1. *Sueros humanos normales.* Los 57 sueros humanos normales investigados procedían de donantes de sangre que habían sido sometidos a diversos estudios analíticos con objeto de garantizar su normalidad del Banco de Sangre del Instituto de Higiene de Navarra. Se utilizaron en frasco o conservados en congelador a -20° , siguiendo de este modo las normas recomendadas en este tipo de estudios^{16, 13}.

2. *Sueros humanos patológicos.* Fueron estudiados 38 sueros patológicos que se obtuvieron de pacientes ingresados en los Servicios Clínicos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra. 23 de estos enfermos padecían procesos crónicos hepáticos y 15 artritis reumatoide. En todos los casos se realizó un completo análisis de los datos clínicos correspondientes. Su conservación fue hecha en idénticas condiciones que para los sueros normales.

B. Obtención de la fracción gammaglobulina del suero.

La separación de las gammaglobulinas del suero humano normal (SHN) se realizó mediante precipitación salina con solución saturada de sulfato amónico a una concentración del 50 %⁶⁶. La metodología empleada consistió en practicar una primera precipitación del SHN en agitación continua durante 3 horas, seguida de centrifugación a 3.000 r.p.m. durante media hora. Sucesivamente se precipitaron del mismo modo los sedimentos obtenidos, disueltos en agua destilada y en

proporción mitad de volumen del pase anterior, con un total de 3 precipitados sucesivos. El sedimento final se disolvió igualmente en agua destilada en una cantidad correspondiente a la octava parte del volumen total del SHN empleado inicialmente.

La muestra así obtenida fue analizada por electroforesis y concentrada por desecación, de tal forma, que la riqueza proteica final era de 20 mg/ml.

C. Filtración en Sephadex-G-200.

Las columnas cromatográficas se montaron según la metodología clásica^{31, 66}. Se emplearon columnas de vidrio de 40 x 2,5 cm para la cromatografía de los SHN y precipitados salinos, y de 100 x 2,5 cm para la separación de los fragmentos obtenidos por reducción de la fracción gammaglobulina lenta previamente aislada.

Durante el proceso de filtración utilizamos un analizador ultravioleta ISCO modelo UA 2, adaptado a un colector de fracciones ISCO-270.

Se empleó en general un flujo de 25 a 30 ml/hora, usando como eluyente C1Na 0,15 M con pH 7. Se recogieron las muestras en fracciones de 1 a 4 ml.

Las fracciones eluidas fueron estudiadas en tres aspectos: 1. *Contenido proteico:* Mediante el analizador ultravioleta y comprobación posterior con reacción del Biuret y medida en espectrofotómetro Spectronic 20 Bausch Lomb, o por lectura directa en espectrofotómetro Zeiss PM-Q11. 2. *Análisis cualitativo de los eluidos:* Se realizó mediante estudio inmuno-electroforético de todos los tubos con riqueza proteica demostrada y los inmediatamente adyacentes, ya que para el aislamiento de la gammaglobulina lenta ligera (GGL) no teníamos dato alguno inicial respecto a la zona de aparición en los eluidos. 3. *Control del pH:* Se hizo

(*) Agradecemos a los Dres. J. Lucea (†) y A. Medarde, Jefe del Servicio de Hemoterapia del Instituto de Higiene de Navarra, por la amable donación de las muestras de suero.

en todas las muestras que fuimos obteniendo, mediante lectura directa en pHmetro.

D. Cromatografía en resinas de intercambio iónico.

Se realizó utilizando DEAE celulosa, resina de intercambio aniónico, según dos métodos ligeramente distintos entre sí. En unos casos empleamos la metodología comúnmente usada^{31, 55, 66, 80} trabajando en columna de 40 x 2,5 cm con un gradiente de pH decreciente de 8,8 a 4, y concentración iónica ascendente, conseguido mediante la mezcla de proporciones adecuadas de TRIS 0,3 M y fosfato monosódico. La técnica de recogida y control de los eluidos fue semejante a la empleada para la filtración por Sephadex, con una velocidad de filtrado de 35 ml/hora.

En otros casos la *Cromatografía en DEAE celulosa se hizo a pH extremo*. La obtención de la gammaglobulina lenta ligera (GGL) hizo preciso extremar la alcalinidad del eluyente para reducir los aniones libres de la DEAE celulosa, evitando así captarse proporciones mayores o menores de la proteína catódica que buscábamos. Con este objetivo utilizamos un gradiente de pH decreciente de 11 a 4, igualmente por mezcla en proporciones adecuadas de TRIS 0,3 M y fosfato monosódico. La velocidad de elución fue de 45 ml/hora. El control de los eluidos parciales fue análogo al que realizamos en la cromatografía por Sephadex ya descrito.

E. Antisueros humanos.

Hemos utilizado en nuestro trabajo inmunosueros tanto polivalentes como monoespecíficos frente a las distintas fracciones séricas. Unos se obtuvieron personalmente y otros fueron de origen comercial.

1. *Inmunosueros comerciales*: Los sueros *Polivalentes* procedían de los Laboratorios Hyland, Los Angeles, California, USA, y del Instituto Pasteur de París y los *Monovalentes* se consiguieron de los Laboratorios Hyland, Pasteur, Behringwerke AG, de Marbug-Lahn, Alemania y Pharmacia ABDE Uppsala, Suecia. Eran antisueros específicos para albúmina, transferrina proteína C reactiva, Inmoglobulinas A, M, D, E y G, fragmentos Fab y cadenas pesadas y ligeras de la IgG humanas. Todos estos inmunosueros se conservaron en nevera a -4° por períodos inferiores a 30 días.

2. *Inmunosueros propios*: Se obtuvieron mediante inmunizaciones de conejos machos, de raza común, de 3-3,5 kg de peso. Para la obtención de los antisueros polivalentes inyectamos 0,25 ml de SHN mezclado con igual cantidad de Adjuvant de Freund por vía subcutánea en el dorso de los animales. Las dosis se aplicaron una, dos o tres veces por semana, según los lotes.

Se practicó una sangría de prueba a los cuarenta días y comprobación del nivel inmunitario alcanzado, desde el punto de vista cualitativo por inmunolectroforesis y cuantitativo por inmunodifusión. En todos los casos se administraron dosis "de recuerdo" 15 días después de la primera sangría, obteniéndose así volúmenes adicionales de un título adecuado. Mediante el empleo de una técnica análoga se obtuvieron también inmunosueros monovalentes frente a las preparaciones GGL obtenidas tanto por filtración en Sephadex, como por elución en DEAE celulosa, así como frente a la GGP que se había aislado por gelfiltración. Estos inmunosueros fueron conservados en congelador a -20° .

F. Técnica de Inmunodifusión.

Hemos usado sistemáticamente la técnica de inmunodifusión en placa de agar de

Ouchterlony⁴⁸. Pequeñas modificaciones seguidas en nuestro laboratorio, han sido comunicadas en otras ocasiones^{51, 54}.

G. Técnica de Electroforesis.

La metodología seguida ha sido la clásica sobre placa de vidrio o porta cubiertos con gel de agar⁶⁶.

H. Técnica de la inmunolectroforesis.

Hemos utilizado la metodología descrita por Grabar y Williams²⁰, modificada por Scheidegger⁶⁴. Para el desarrollo inmunolectroforeográfico completo con detección de la gammaglobulina lenta fue preciso introducir 3 pequeñas modificaciones técnicas en la pauta clásica: a) Diluciones de los antisueros o concentraciones de los sueros humanos normales empleados, para una adecuación óptima de los reactantes. Empleamos generalmente los sueros del 1/1 al 3x y antisueros al 1/1 o al 1/2. b) Desplazamiento de los pocillos que contenían las muestras hacia el bolo anódico. c) Los canales de los antisueros a 9 mm de dichos pocillos. Para ampliar el área catódica, lugar de precipitación de la gammaglobulina lenta.

En alguna ocasión empleamos también un puente de agar en la región catódica del canal del antisuero con objeto de separar la banda de precipitación de la IgG de la gammaglobulina lenta.

I. Investigación de actividad antigammaglobulina.

La realizamos mediante la técnica del test de Latex⁶⁸, utilizando una preparación comercial (Difco Lab. USA).

J. Ultracentrifugación.

Hemos utilizado la ultracentrífuga analítica Spinco, modelo E, de Beckman y metodología general de Pedersen⁴⁹. Las muestras empleadas lo fueron a concentración de 15 mgrs/ml con un máximo de

30 mgrs/m, siendo el solvente empleado en todas las ocasiones suero salino 0,15 M con pH neutro. Empleamos dos tipos de velocidades de ultracentrifugación: 42040 y 59780 r.p.m. La temperatura osciló entre 6 y 12°C durante la operación, que duró un total de 2 a 3 horas, con un tiempo útil de 40 minutos.

Las fotografías se hicieron en intervalos de 8 minutos, para la fracción gammaglobulina lenta IgG y de 16 minutos para la gammaglobulina lenta ligera GGL. El tiempo de exposición fue de 40 segundos. Se utilizaron placas de vidrio de superficie sensible ortocromática, de la casa Kodak. El revelado se hizo en revelador Kodak D-76 durante 15 minutos.

Para el cálculo del coeficiente de sedimentación, hemos utilizado la metodología de Svedberg³¹. Se han empleado simultáneamente los procedimientos integral y diferencial de obtención de la constante de sedimentación.

Las fórmulas generales correspondientes son las siguientes:

$$S_c = \frac{2303}{60 W^2} \cdot \frac{\log X_2 - \log X_1}{t_2 - t_1}$$

para el método integral y

$$S_c = \frac{X_2 + X_1}{2} \cdot \frac{(\log X_2 - \log X_1)}{(t_2 - t_1) W^2} \cdot 60$$

expresión del método diferencial.

En ambos casos "t", es el tiempo en minutos; "X" la distancia del pico al centro de rotación; 60.W² es expresión de la velocidad angular cuyos valores oscilaban entre 1,162.10⁹, para las ultracentrifugaciones a 42.040 r.p.m. y 2'35.10⁹ para una velocidad de 59.780 r.p.m. Conociendo los tiempos T₁ y T₂ a los que se realizaban las fotografías sucesivas y las distancias reales X₁ y X₂ de los picos correspondientes al centro del rotor se puede calcular la constante de sedimen-

tación en unidades Svedberg. Para ello se tuvo en cuenta que cada una de estas unidades (S_c) equivale a 1.10^{-13} de la cifra obtenida. Y que para la transformación a unidades Svedberg se expresaron los resultados a 20°C , multiplicando la cifra obtenida por el coeficiente 1'37, correspondiente a las temperaturas de trabajo.

El cálculo del peso molecular: Se hizo a partir de la constante de sedimentación a 20°C (S_{20}), según la siguiente fórmula ²:

$$M = 5150 \cdot (S_{20} \cdot f/f_0)^{3/2}$$

donde f/f_0 coeficiente de desviación de esfericidad es de 1'28 para la molécula de albúmina y 1'38 para las globulinas.

K. Reducción de puentes disulfuro.

La técnica empleada ha sido la de Guillamod e Isliker²¹, que utilizan DTT (dithiothreitol) y monoiodoacetamina (MIAA), seguida de filtración de la muestra obtenida por Sephadex G-200.

RESULTADOS

A. Identificación de fracciones gammaglobulina lentas en los sueros humanos normales.

La identificación de fracciones gammaglobulina lentas en los sueros humanos fue valorada en un doble aspecto.

1. Porcentaje de incidencia: Como puede verse en la tabla I, han sido investigados un total de 57 sueros humanos normales; de ellos, 25 lo fueron con inmunosueros standard y 32 mediante el empleo de antisueros propios.

Con los inmunosueros standard conseguimos detectar la presencia de las correspondientes bandas lentas de precipitación en los 25 sueros humanos investigados, tras una adecuación individual a cada caso de las proporciones óptimas entre antígeno y anticuerpo, para conseguir así un desarrollo inmunoelectroforeográfico completo. Con nuestros propios inmunosueros, de menor potencial inmunitario cuantitativo y cualitativo, como refleja la tabla II, obtuvimos 28 positividadades en 32 muestras investigadas. Estos resultados arrojan 53 casos de presencia de bandas de precipitación más lentas que el arco de IgG, sobre un total de 57 observaciones, lo que significa un 92,9 % de porcentaje positivo.

La figura 1 demuestra que la aparición de las bandas lentas depende de un proceso de concentración de los sueros humanos para adecuar la cuantía de las moléculas responsables de las bandas gammaglobulina lentas, a los anticuerpos específicos de los inmunosueros globales antihumanos. Fue preciso una concentración sérica del 3X para la nítida detección de una banda de precipitación lenta en el caso particular de este SHN.

TABLA I

INCIDENCIA DE PRESENTACION DE LA GAMMA GLOBULINA LENTA GGL EN SUEROS NORMALES

Antisuero utilizado	Sueros investigados	Sueros positivos	Porcentaje de incidencia
Comercial *	25	25	100
Propio **	32	28	87,5
TOTAL	57	53	92,9

* Inmunosuero anti-suero humano normal de Hyland Lab, Los Angeles, Calif. U. S. A.

** Obtenido por inmunización de conejos como se indica en la tabla II.

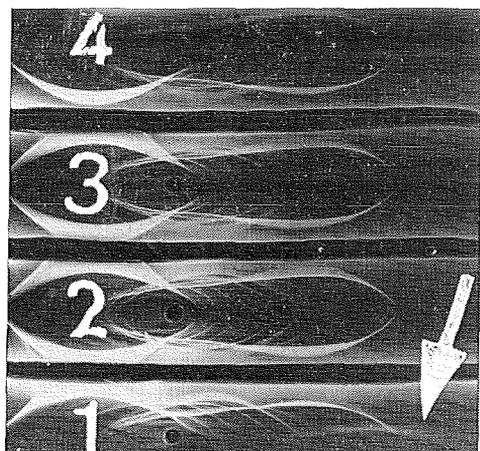


Fig. 1. Demostración del cruce del arco de la gamma globulina lenta con el de la IgG en suero normal desarrollado por anti-SHN sin diluir.

- 1: SHN al 3X.
- 2: SHN al 1,5X.
- 3: SHN de concentración normal.
- 4: SHN al 1/2.

2. Características inmunoeléctroforéticas: Hemos observado 2 tipos de bandas inmunoeléctroforegráficas más lentas que el arco fundamental correspondiente a la

IgG. En unos casos, como el representado en la figura 2, se trataba de bandas de precipitación lentas resultantes del desdoblamiento de la porción catódica del arco de la inmunoglobulina G. A este tipo de bandas las denominamos GGP o gammaglobulina lenta pesada, por haber demostrado posteriormente se trataban de moléculas de elevado peso. En otras ocasiones, los arcos de migración lenta cruzaban nítidamente el correspondiente a la IgG y tenían una situación catódica extrema. Es el caso representado en la figura 3. A este tipo de banda la hemos denominado GGL o gammaglobulina lenta ligera por tener un bajo peso molecular, según se pudo comprobar en el estudio sobre sus características físicas.

B. Resultados del fraccionamiento salino del suero humano normal.

El sedimento resultante de las 3 precipitaciones salinas sucesivas del SHN, mostró tener las siguientes características:

- 1) Un contenido proteico de 400 mgr % al 0,1 de dilución.
- 2) Por análisis electroforegráfico demostramos un notable enriquecimiento de la fracción sérica

TABLA II

CARACTERISTICAS DE LOS INMUNOSUEROS PROPIOS

Denominación	Antígeno utilizado	Pauta inmunización (dosis de 0,5 ml)	Título de precipitación *	Calificación cualitativa **
Anti-SHN-A	SHN+A.F.	1 d/s	1/128	+++
Anti-SHN-B	SHN+A.F.	2 d/s	1/64	++
Anti-SHN-C	SHN+A.F.	3 d/s	1/32	+
Anti-GGP	GGP+A.F.	1 d/s	1/16-1/32	+++
Anti-GGL-S	GGL-D+A.F.	1 d/s	1/16	+++
Anti-GGL-D	GGL-D+A.F.	1 d/s	1/16	++

SHN: Suero humano normal; A.F.: adyuvante completo de Freund;
 GGP: Gamma globulina lenta de elevado peso molecular; GGL-S: gamma globulina lenta de bajo peso molecular aislada en Sephadex-G-200;
 GGL-D: GGL aislada en DEAE-celulosa, pH 11.

* Test de Ouchterlony (99).

** Calificación subjetiva según la semejanza con los sueros comerciales.

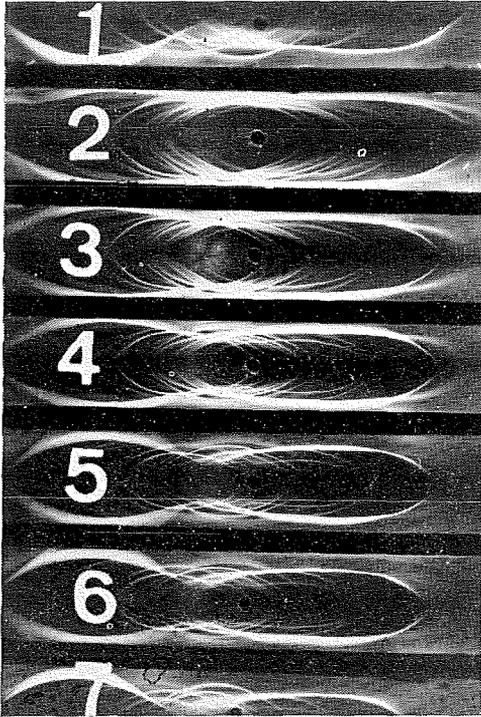


Fig. 2. Aspecto inmunoelectroforético (I. E.) de la gamma globulina lenta en distintas concentraciones del suero humano normal (SHN), desarrollado por anti-SHN de concentración normal.

1 y 7: SHN al 1/1.

Del 2 al 6: SHN al 10, 8, 6, 4, y 2X.

gammaglobulina, conteniendo únicamente impurificaciones de alfa globulina. 3) La inmunoelectroforesis de la muestra conseguida confirmó lo expuesto en el punto anterior, juntamente con un importante enriquecimiento relativo para la inmunoglobulina G. Los sobrenadantes correspondientes a las 3 precipitaciones realizadas contenían el resto de los componentes séricos y pequeñas fracciones de gammaglobulinas. 4) Un estudio por inmunodifusión de los sucesivos sobrenadantes y del sedimento final, mediante inmunosuero monoespecífico para la gammaglobulina lenta ligera o GGL, puso de manifiesto que la mayor parte

de esta fracción se encontraba en el sedimento final, aunque pequeñas proporciones de la misma aparecían en las otras muestras de las etapas previas.

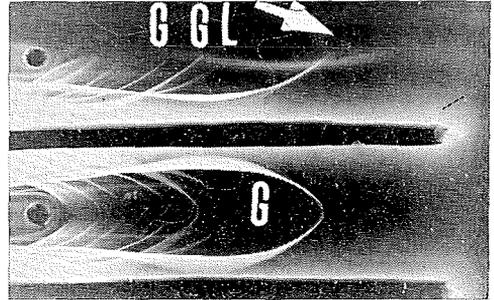


Fig. 3. Inmunoelectroforesis de suero humano normal a concentración 1/1. Aspecto catódico de la preparación. Se aprecia la banda correspondiente a la gammaglobulina lenta de bajo peso molecular.

C. Resultado de la cromatografía por filtración en columna de Sephadex G-200.

Utilizando el sedimento resultante de 3 precipitaciones sucesivas de SHN por solución saturada de sulfato amónico, hemos realizado filtraciones en columna de Sephadex G-200. El análisis cuantitativo del contenido proteico de los eluidos sucesivos se representa en el esquema de la figura 4, en la que las abscisas contie-

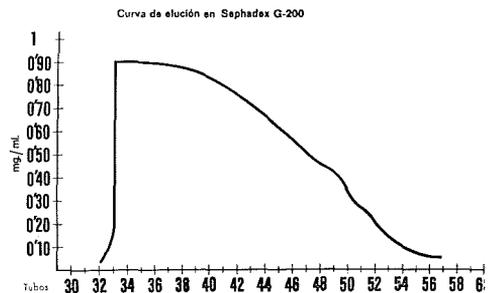


Fig. 4. Curva de elución proteica (mgrs/ml) obtenida tras la filtración en Sephadex G-200 de la fracción gamma globulina conseguida por precipitación salina.

nen la numeración de los tubos y las ordenadas la riqueza proteica correspondiente a cada uno de ellos. Realizado un análisis inmunoelectroforético de todos los tubos con riqueza proteica demostrada y de los inmediatamente anteriores o siguientes, fue posible separar y aislar completamente la proteína que habíamos denominado GGP. Sus características inmunoelectroforéticas y de elución fueron semejantes a las de la IgG, siendo prácticamente indistinguible de ella si no se considera su migración electroforética que es ligeramente inferior.

Esta menor migración electroforética puede observarse en la figura 5. En ella se aprecian las líneas de precipitación co-



Fig. 5a. Estudio comparativo de la motilidad electroforética de las distintas fracciones de la IgG en diferentes momentos de la elución por Sephadex G-200 del precipitado salino de SHN. Comprende los tubos del eluido del 33 al 50.

respondientes a la GGP (fig. 5a-1) y a otras subclases de IgG (fig. 5a-2, 3 y 4). La figura 5b es un esquema de estas cuatro diferentes motilidades eléctricas de

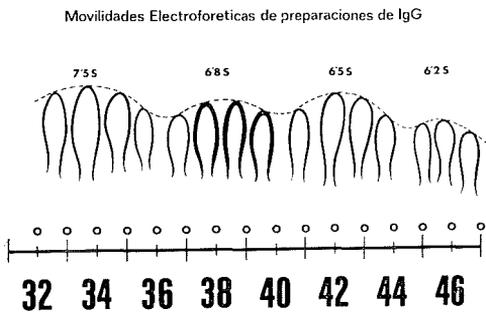


Fig. 5b. Esquema representativo de las diferencias en la migración inmunoelectroforética mostrada por eluidos correlativos de IgG obtenidos sucesivamente por filtración en Sephadex G-200.

la IgG, con las distintas constantes de sedimentación obtenidas por nosotros para las mismas. La comprobación de que todos estos arcos correspondían a un común determinante antigénico IgG, la obtuvimos mediante un estudio por inmunodifusión de las muestras correspondientes aisladas en la cromatografía por Sephadex. Frente a un inmunosuero monoespecífico anti-IgG, se formaba una banda de precipitación común para las cuatro distintas muestras obtenidas (fig. 6).

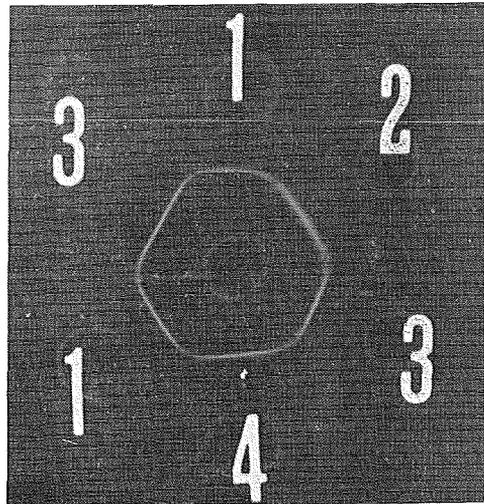


Fig. 6. Reacción de identidad entre los distintos eluidos de IgG obtenidos por gel filtración. Pocillo central: Inmunosuero anti-IgG. Pocillos periféricos preparaciones correspondientes a los grupos 1, 2, 3 y 4.

Un reiterado y cuidadoso estudio por inmunoelectroforesis de los tubos finales de la elución, 48 a 52 de la gráfica número 5, permitió aislar totalmente en este último tubo la otra gammaglobulina lenta ligera o GGL. La figura 7 reproduce los resultados del análisis inmunoelectroforético de los eluidos sucesivos de estos tubos, comparados con un SHN situado en el centro. Puede apreciarse que el tubo

33 de la elución, situado en la parte superior, contiene GGP acompañada de vestigios de GGL y que en el eluido del tubo 52, último de la placa se ha logrado la total separación de la GGL del resto de componentes séricos.

De este modo pudieron aislarse 2 tipos de componentes séricos de migración lenta en el inmunolectroforegrama, la GGP, antigénicamente común a la inmunoglobulina G, y la GGL que no presentó comunidad antigénica con ella. El

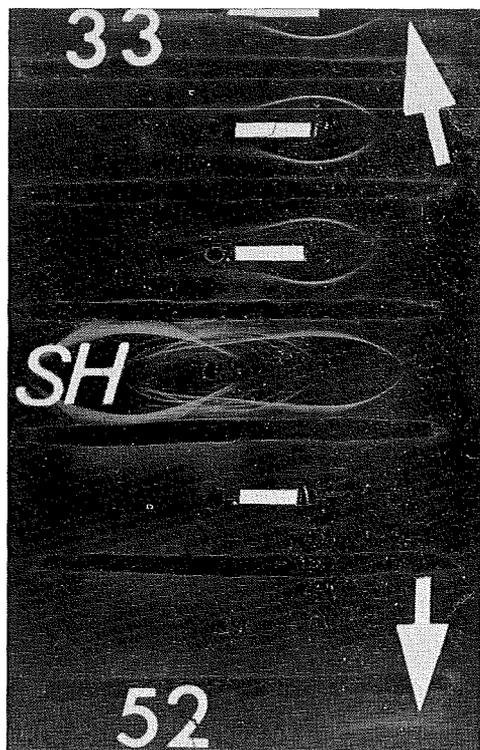


Fig. 7. Filtración por Sephadex G-200. Análisis I. E. de los eluidos obtenidos en los tubos 48 a 52 de la última porción de la curva proteica en comparación con el tubo 33 correspondiente a la porción inicial de la misma. Obsérvese en el tubo 52 la presencia de una única banda de migración extrema catódica. En el correspondiente al tubo 33 el arco de la IgG cruza a otra línea difusamente marcada de características semejantes a la aparecida en el tubo 52.

análisis de su posible comunidad antigénica con otros componentes del suero humano (IgA, IgM, IgD e IgE, así como proteína C reactiva, transferrina y albúmina) dio un resultado negativo como puede apreciarse en las figuras 7, 8 y 9. El estudio de la comunidad antigénica

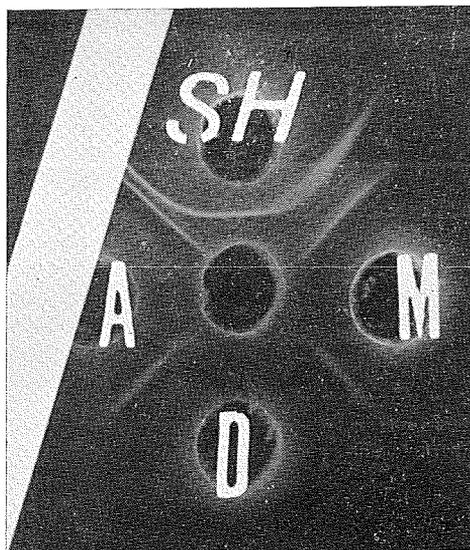


Fig. 8. Análisis antigénico de la gammaglobulina lenta de bajo peso molecular situada en el pocillo central. En los pocillos periféricos colocamos inmunoseros anti suero humano polivalente (SH), anti IgM (M), anti IgD (D), anti IgA (A). Sólo aparece precipitación para el SH.

con cadenas aisladas de inmunoglobulina G o sus fragmentos evidencian una mínima reacción cruzada con las cadenas pesadas. Con el resto, el resultado fue negativo (fig. 10). Un estudio por inmunolectroforesis comparativa⁹⁹, evidenció la distinta motilidad y antigenicidad de la GGL con respecto a la IgG, en cuyo arco fundamental pueden apreciarse distintos componentes, como se observa en la fig. 11.

La filtración en Sephadex G-200 de muestras de SHN, en vez de precipitados

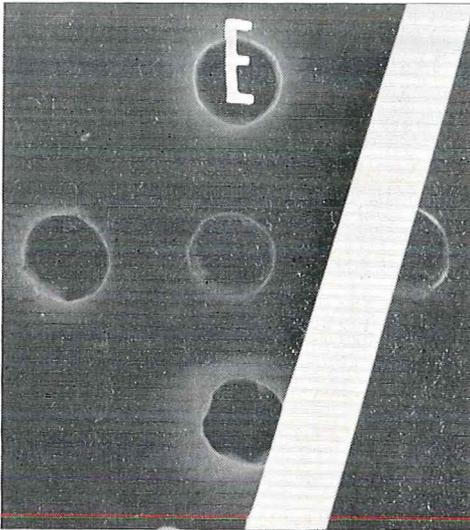


Fig. 9. Análisis antigénico de la gammaglobulina lenta de bajo peso molecular situada en el pocillo centra. En los pocillos periféricos y sucesivamente inmunosueros anti IgE (E), anti IgG, anti cadenas pesadas gamma y anti proteína C reactiva. El halo formado alrededor del pocillo que contiene el inmunosero para las cadenas gamma muestra un aplanamiento horizontal en su porción superior que puede sugerir una tendencia a la formación de halo positivo de precipitación.

de fracción gamma, permitieron la individualización de la GGL, pero no hicieron posible su aislamiento, debido a la baja concentración de ésta en el suero normal.

D. Resultados de la cromatografía del SHN en resina de intercambio iónico.

El análisis cromatográfico del SHN a través de una columna de DEAE celulosa, con eluyente de pH decreciente entre 8,8 y 4, permitió identificar la GGL y la GGP en el primer pico de la elución, mediante los inmunosueros específicos frente a estas fracciones. No fue posible separarlas de la inmunoglobulina G, principal componente de este pico de elución. La curva de elución fue la clásica-

mente descrita para SHN. Puesto que las características electroforéticas de la GGL sugerían que tenía una baja carga eléctrica, se incrementó el pH, para obtener una mayor disociación y permitir acentuar sus diferencias con la IgG. De este modo se facilitó su aislamiento y esta última fracción pudo ser aislada en los primeros tubos de elución, correspondientes a la zona rayada del esquema de la figura 12. Como puede apreciarse en ella la elución en DEAE celulosa a pH extremo modifica la forma de la curva, aplanando y ensanchando los primeros picos de la misma, lo que facilita la separación de los distintos componentes proteicos de cada uno de los picos.

Un estudio por inmunoelectroforesis de la GGL obtenida por esta metodología demostró un aspecto semejante al encon-



Fig. 10. Análisis antigénico de la GGL. GGL: Gammaglobulina lenta de bajo peso molecular. aCG: anti cadenas gamma, PCR: anti proteína C reactiva. aGP: inmunosero monoespecífico para la gammaglobulina lenta pesada.

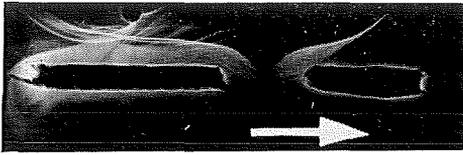


Fig. 11. Estudio por I.E. comparativa de un SHN con el eluido del tubo 52 de la cromatografía al final del eluido por Sephadex del precipitado salino de suero humano normal. Aspecto de la gammaglobulina lenta de bajo peso molecular.

trado previamente para esta banda de precipitación, si bien se prolongaba en dirección anódica con un segundo arco con el que parecía tener continuidad (fig. 13).

Realizado el análisis antigénico, de esta preparación, fue posible demostrar por inmunodifusión, la presencia de reaccio-

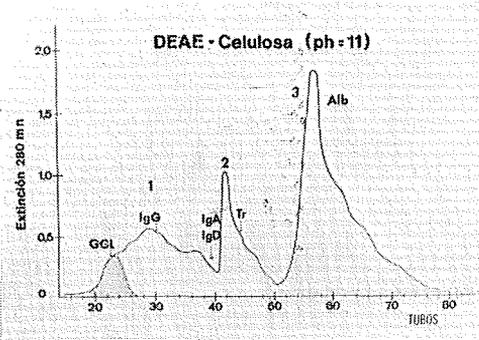


Fig. 12. Gráfica de cromatografía en DEAE celulosa con gradiente de pH decreciente de 11 a 4. La porción ascendente del primer pico fue identificada como gammaglobulina lenta de bajo peso molecular. El resto de este primer pico estaba constituido fundamentalmente por IgG con contaminantes de IgA e IgD. El segundo pico estaba integrado por lipoproteínas, transferrina y proporciones de IgA e IgD. El pico tercero estaba formado fundamentalmente por albúmina y en su porción descendente aparecían las moléculas 19S (IgM).

Obsérvese como la IgG en vez de aparecer en un pico de base estrecha se ensancha mostrando en su contorno varios grupos de fracciones en comparación con la curva obtenida en DEAE celulosa pH máximo de 8,6. La albúmina se incrementa en el pico 2.

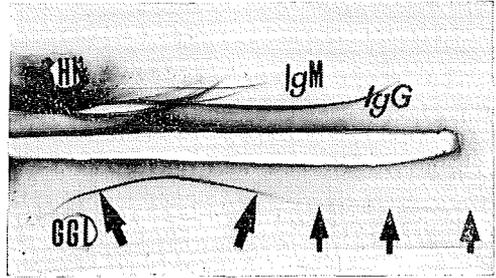


Fig. 13. Inmunoelectroforesis comparativa de un suero humano normal (SHN) y la fracción gamma globulina lenta de bajo peso molecular (GGL) aislada en el primer pico de una cromatografía en DEAE celulosa a pH extremo de 11. Las flechas señalan un arco de precipitación de migración electroforética más lenta.

nes claramente positivas frente al inmunosuero anti-GGL y menos intensamente frente al anti-albúmina. La obtención por inmunoelectroforesis de una larga línea con un doble arco y la existencia de una doble antigenicidad hacían suponer la formación de un agregado molecular entre la GGL y restos de albúmina. Con objeto de investigar la posible existencia de una unión S-S entre la GGL y la albúmina presente en la preparación, se hizo una reducción con DTT. La reducción permitió separar, efectivamente, estos dos componentes (fig. 14). Tras separar estos componentes por filtración en Sephadex se realizó un análisis antigénico de los dos picos obtenidos con ella. El resultado del mismo se repro-



Fig. 14. Inmunoelectroforesis tras un proceso de reducción de la GGL comparada con SHN.

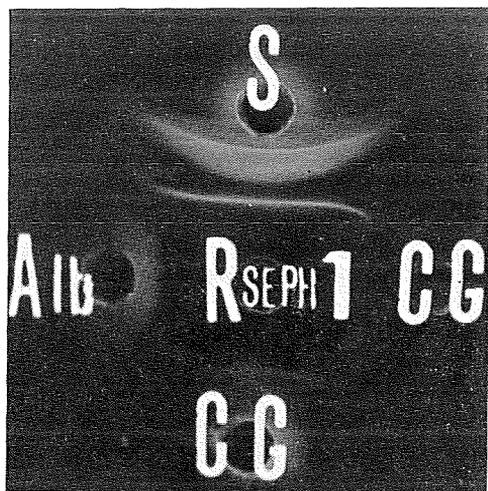


Fig. 15a. Análisis antigénico del eluido del primer pico de la filtración por Sephadex G-200 de una muestra de la GGL obtenida por cromatografía en DEAE celulosa y pH 11, tras realizar un proceso de reducción.

Pocillo central: Muestra 1.^{er} pico.

Pocillo superior: anti SHN.

Pocillo izquierda: Anti albúmina.

Pocillos inferior y derecha: anti cadenas gamma de cabra y caballo.

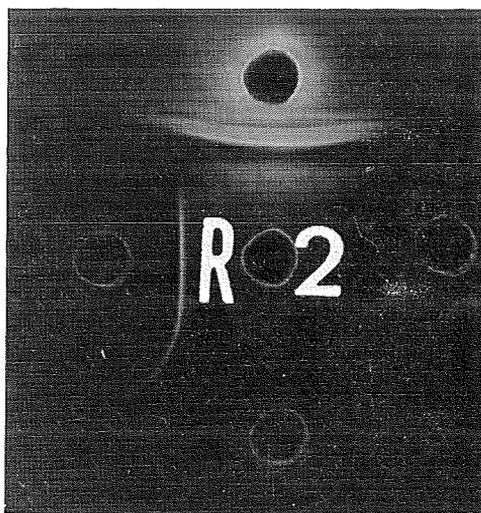


Fig. 15b. Análisis antigénico semejante al de la figura 15a, con idénticos componentes en los pocillos periféricos.

Pocillo central: Muestra del eluido del segundo pico de la filtración por Sephadex de la GGL obtenida por cromatografía en DEAE celulosa.

duce en la figura 15 y confirmó la correspondencia de estos picos con GGL y albúmina respectivamente. El análisis antigénico comparativo entre este pico conteniendo GGL y GGL aislada por Sephadex, GGL del suero humano, así como otras proteínas plasmáticas (IgG, GGP y Transferrina) evidenció identidad con las primeras y ausencia de comunidad con estas últimas (fig. 16).

E. Resultados obtenidos con los inmunosueros.

Cualitativamente y cuantitativamente tanto los inmunosueros antihumanos globales, como los monoespecíficos para las fracciones gammaglobulina lentas dieron resultados satisfactorios. La calidad de estos inmunosueros fue superior cuando los animales correspondientes habían sido inmunizados con una sola dosis semanal de SHN.

F. Actividad antigamma globulina de las distintas preparaciones.

Como puede verse en la tabla III, la GGL y los tres componentes IgG de mayor migración inmunolectroforética y menor constante de sedimentación, dieron resultado negativo. La GGP por el contrario proporcionó clara positividad cuantificable como de 3 ó 4 cruces, según la concentración a que practicamos el estudio.

G. Cálculo de las constantes de sedimentación.

Las muestras de ambas fracciones gammaglobulínicas lentas GGP y GGL fueron estudiadas en sus características físicas por ultracentrifugación. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

La GGP nos proporcionó un material fotográfico que se reproduce en la figu-



Fig. 16 Análisis antigénico de la gammaglobulina lenta de bajo peso molecular (GGL). En los pocillos periféricos:

S: antisuero polivalente humano (aSHN).

G: inmunosuero monoespecífico anti IgG.

Tr: Anti transferrina.

Gp: Inmunosuero es ecífico para la gammaglobulina lenta pesada (GGP).

GGL (sp): Inmunosuero específico para GGL obtenido a partir de su aislamiento por SEPHADEX.

GGL (deae): Inmunosuero específico para la gammaglobulina lenta de bajo peso molecular (GGL) obtenido a partir de su aislamiento por DEAE.

ra 17. Mediante los datos que obtuvimos en estas fotografías y aplicando la formulación ya descrita en el apartado correspondiente pudimos calcular:

$$S_c = 19'8 \cdot 10^{-10} \cdot \frac{0'779596 - 0'776119}{63 - 39}$$

$$= 0'0058198 \cdot 10^{-10}$$

expresión que reducida a unidades Svedberg (10^{-13}) da como resultado para S_c : $S_c = 5'8198$.

Reducida a 20° resulta:

$$S_{20} = 5'8198 \cdot 1'37 = 7'56 \text{ S.}$$

Es la constante de sedimentación obtenida por nosotros para la subclase de IgG de migración lenta GGP.

Para la fracción lenta GGL, no nos fue posible demostrar un pico definido en las diferentes ultracentrifugaciones practicadas a concentraciones distintas, límite de 30 mgr/ml y velocidades de 42040 y 59780, con tiempos de separación máximo entre las fotografías de 16 minutos. La figura 18 constituye un ejemplo del único y pequeño resalte obtenido en la línea de ultracentrifugación. Para estos casos calculamos una constante de sedimentación muy baja y para el problema definido de la GGL, de 0'90 S.

TABLA III

ACTIVIDAD ANTIGAMMA GLOBULINA DE PROTEINAS GAMMA
PREVIAMENTE AISLADAS

Proteína	Aislamiento	Constante de sedimentación	Actividad antigammaglobulina*
GGL	Sephadex	0,9 S	(—)
GGP (IgG-A)	"	7,5 S	+++
IgG-B	"	6,8 S	(—)
IgG-C	"	6,5 S	(—)
IgG-D	"	6,2 S	(—)

* Valorada según la capacidad para aglutinar partículas de latex recubiertas de gamma globulina.

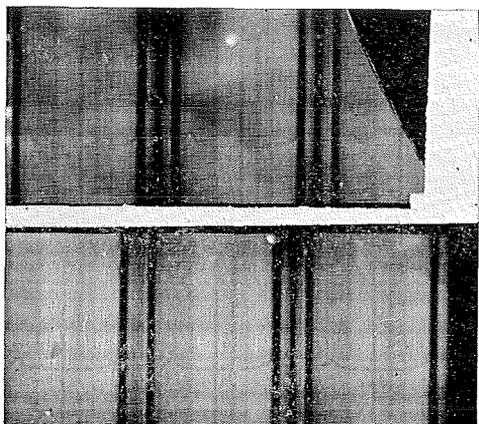


Fig. 17. Material fotográfico de la ultracentrifugación correspondiente a la gammaglobulina lenta pesada (GGP).

Cuando realizamos ultracentrifugación comparativa entre la GGP, GGL y los otros tres componentes IgG aislados por nosotros, se demostró que la GGP superaba a los otros elementos estudiados, aunque esta distinta propiedad física fuese mucho más destacada cuando comparamos la GGL con cualquiera de los otros cuatro componentes séricos sometidos a examen por esta metodología.

H. Cálculo del peso molecular de los componentes gammaglobulínicos lentos.

El peso molecular de la GGL y GGP lo calculamos mediante la fórmula general.

$$M = 5150 \cdot (S_{20} \cdot f/f_0)^{3/2}$$

Para la GGP la expresión resultante fue:

$$M = 5150 \cdot (7.5 \cdot 1.38)^{3/2} = 171481.$$

La GGL dio un resultado de 3700 ó 9500 para su peso molecular según la misma formulación y aplicando respectivamente un coeficiente de desviación de esfericidad de 1 ó de 1.38.

I. Significación clínica de las gammaglobulinas lentas.

Una vez que habíamos podido demostrar actividad antigammaglobulina en la GGP, nos pareció interesante completar el estudio de estas fracciones gamma con una encuesta sobre su posible significación clínica. Orientamos esta investigación principalmente, sobre el papel que pudiera desempeñar en circunstancias patológicas la GGL. Se han investigado con este propósito sueros de enfermos afectados de procesos crónicos hepáticos y de artritis reumatoide. Los resultados obtenidos están resumizados en la tabla IV.

En general los resultados han sido positivos, con una nítida detección de esta banda lenta, cuando la cifra de gammaglobulinas superaba la cifra de 1.5 gr %, sin que fuese necesario, como con los sueros normales una adecuación previa de las concentraciones de los sueros y antisueros. En las *hepatopatías crónicas* (fig. 19) hemos observado un trazo más intenso para la banda correspondiente a la GGL que el hallado en los sueros humanos normales, sin encontrar alteraciones cualitativas de las mismas que trascendiesen sobre su aspecto inmuno-electroforético. Los sueros de enfermos con *artritis reumatoide* (fig. 20), presentan bandas lentas muy diferentes en cuan-

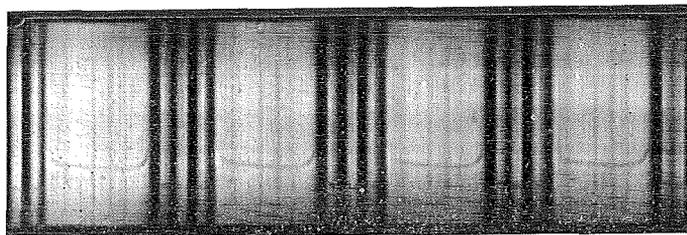


Fig. 18. Material fotográfico correspondiente a una ultracentrifugación de GGL a 42040 r.p.m.

TABLA IV
PRESENCIA DE LA GAMMABLOBULINA EN LOS SUEROS PATOLOGICOS

Proceso clínico	Severidad de la afección *	N.º de casos	Incremento/ (n.º de casos)	Modificaciones cualitativas **	Correlación ***
Cirrosis hepática	I	7	+/3	(-)	+
Cirrosis hepática	II	16	++/16	(-)	++
Artritis reumatoide	I	8	+++ /3	+	(-)
Artritis reumatoide	II	7	+++ /4	++ /2	(-)
			+++ /3	+++ /1	(-)

* Tipo I: hipergammaglobulina menor de 1,5 gr. % en la cirrosis o V. de S. (índice de Katz) menor de 40 en la artritis reumatoide; Tipo II: cifras superiores de ambos parámetros.

** Deformidad del dibujo del arco de precipitación.

*** Correspondencia con el grado de hipoalbuminemia, en particular, y con las restantes características disproteinémicas en general.

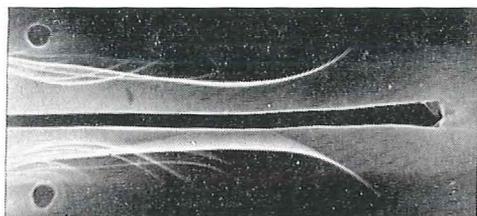


Fig. 19. Aspecto habitual de la GGL en enfermos con cirrosis hepática con antisuero a concentración normal.

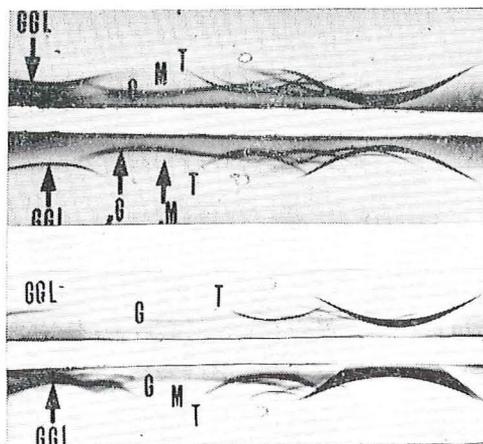


Fig. 20a y b. Inmunolectroforesis de sueros de enfermos con artritis reumatoide. Positividad intensa de la GGL. En la figura 20b aparece la banda lenta con dos "gibas". El arco correspondiente a la albúmina es normal.

to a su grosor y lo que es más interesante todavía, con acusadas modificaciones cualitativas. Las mayores alteraciones cualitativas coincidieron, por lo general, con los cuadros de evolución más agresiva, expresada en su mayor positividad para el factor reumatoide, enorme incremento de la velocidad de sedimentación, mayores lesiones articulares, con deformidades evidentes, etc. En algún caso pudo comprobarse un aspecto que consideramos paraproteinémico de la GGL: enorme incremento de la misma con deformidad patente de la línea de precipitación, que se encontraba como desdoblada por una doble giba (fig. 20a).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha realizado el aislamiento y la caracterización de dos gammaglobulinas de migración electroforética lenta, GGP y GGL. La discusión de los resultados que hemos obtenido

debe centrarse, a nuestro juicio, sobre cuatro puntos fundamentales: *Realidad de su existencia en los sueros humanos normales, incidencia de presentación en los mismos, naturaleza de estas fracciones* y, finalmente, su *significación funcional y clínica*.

El primer motivo de discusión lo constituye pues, *la realidad de la existencia en los sueros humanos normales de las gammaglobulinas GGP y GGL*. Se trata de dos fracciones séricas reales en los SHN, porque su identificación se hizo en sueros de donantes normales, cuya normalidad se comprobó con repetidas determinaciones analíticas generales. La eventualidad de la aparición de artefactos por alteraciones séricas cabe descartarla ya que en una gran proporción de ellos se hizo el estudio en fresco, sin ninguna manipulación especial. En efecto, ha sido comunicado repetidas veces que con las técnicas que usamos para concentrar los sueros o para conservarlos no se producen modificaciones en los mismos^{28, 53}. La realidad de la existencia de estas fracciones queda asegurada, por otra parte, considerando la existencia en inmunosueros, tanto propios como comerciales, de anticuerpos específicos frente a ellas. La presencia de estos anticuerpos en los sueros polivalentes y la relativa facilidad con que se obtuvieron inmunosueros monoespecíficos con bajas dosis inmunizantes de las mismas, indican su estructura proteica. Como estos sueros monoespecíficos fueron producidos después de aislar las fracciones usando diversos métodos fisicoquímicos, cabría la posibilidad de que estas proteínas hubiesen sido el resultado de la acción de estos agentes fisicoquímicos sobre las proteínas plasmáticas. Tal hecho ha sido efectivamente denunciado, habiéndose comprobado, sin embargo, únicamente la aparición de cadenas polipeptídicas libres⁶⁹. El análisis antigénico que hemos realizado, ha descartado claramente la posibilidad de que las proteí-

nas aisladas, GGP y GGL, fuesen cadenas polipeptídicas. La primera se identificó como una subclase de IgG y la segunda no mostró comunidad antigénica, ni con las inmunoglobulinas o sus fragmentos, ni con otros componentes del suero humano. La aparición ocasional de un halo de precipitación frente al anti-suero anti-cadenas gamma cabe atribuirlo a la presencia en las preparaciones de GGL de vestigios contaminantes originados por la precipitación. Si, como hemos visto, la precipitación salina no pudo ser causa de un artefacto, la filtración ulterior en Sephadex, aún menos, debido a las conocidas características de este gel⁸⁰. La identidad de las líneas de precipitación formadas con las fracciones aisladas y con las contenidas en el suero completo, demuestra la ausencia de alteraciones estructurales en el curso de su aislamiento.

Es necesario comentar ahora las circunstancias del aislamiento de la GGL en DEAE-celulosa a pH 11. El pH elevado pudo producir alteraciones estructurales en la GGL si ella fuese de un tamaño molecular semejante a la albúmina o a las globulinas de mayor tamaño⁷², pero evidentemente, no pudo alterar a esta proteína de bajo peso molecular⁷². La muestra obtenida en DEAE-celulosa pH 11, mostró reaccionabilidad con los inmunosueros específicos antialbúmina y anti-GGL. Pero como un proceso de reducción y filtración diferencial en Sephadex consiguieron separar ambos componentes posteriormente, cabe interpretar esta doble reacción como resultado de la formación de un agregado molecular²³, entre la GGL y una subfracción de albúmina desnaturalizada a pH extremo^{8, 18, 58, 59}.

La GGL aislada por este procedimiento presentó un aspecto inmunolectroforético diferente al conseguido por aislamiento en Sephadex G 200. Esta modificación hay que explicarla, según lo di-

matoide, no solamente puede variar el aspecto de la banda de migración lenta correspondiente a la GGL en cuanto al grosor del trazo, como ocurre en las situaciones de hipergammaglobulinemia, sino que se modifica también la forma de la banda en sí, coincidiendo en nuestra experiencia estos arcos de precipitación en dos "gibas" a los casos clínicos de más intensa agresividad. Estas modificaciones fundamentalmente cuantitativas de la GGL, en el caso de incremento global de las gammaglobulinas, pudiera indicar un paralelismo funcional de respuesta inmunitaria, que para el caso de estas gammaglobulinas de bajo peso molecular tendría una motivación específica. Demostrada la actividad precipitante de ácidos ribonucleicos para una proteína de estas características aislada en la ori-

na humana y capaz de filtrarse en glomérulo renal por su pequeño tamaño²³, es interesante la consideración de que el incremento de esta GGL en enfermos con procesos de posible génesis autogresiva podría ser una consecuencia de una eventual liberación de RNA protoplasmático o nuclear, que induciría su incremento a través de un mecanismo de autoagresión. Estas consideraciones son hipotéticas y nuestros resultados no pueden contribuir para decidir sobre ellas. Permiten, por el contrario, afirmar la existencia de un componente gammaglobulina lento, hasta ahora desconocido, que no tiene relación ni con proteínas completas de esta zona electroforética, ni con sus fragmentos y que se modifica notable y significativamente en diversas circunstancias patológicas.

SUMMARY

Slow migration Gammaglobulins

Slow migration Gammaglobulins through immunoelectrophoresis of normal human sera we have found two bands of precipitation slower than IgG, once we analysed the concentrations of sera and anti-sera necessary for the demonstration of these bands. One of these bands appeared as a cathodic duplication of IgG and was termed GGP. The other showed slower migration and crossed the IgG arc it was termed GGL.

GGP was isolated by gel-filtration. Its sedimentation rate was found by ultracentrifuge to be 7.5 S. An antigen analysis of this showed it to correspond to one of the subclasses of IgG. Investigation of antigammaglobulin activity in these preparations gave a positive

result, whereas it was found to be negative in the case of three other subfractions of IgG similarly isolated by gel-filtration and having sedimentation rates of 6.8, 6.5 and 6.2 S.

GGL was isolated by gel-filtration and chromatography in DEAE-celulose showed it to be different from IgG, IgA, IgM, IgE, IgD and reactive C protein among other proteins studied. It did not show antigammaglobulin activity and its sedimentation rate was calculated at 0.9 S.

Investigation of pathologic sera showed quantitative and qualitative alterations in these fractions and their determination in sera of patients could be useful in the differential diagnosis and prognosis of disease states.

BIBLIOGRAFÍA

1. BASTORA, L. M. y A. Y. KUL'BERG. *Vod. Med. Kim.* 14: 170, 1968.
2. BOYD, W. C. *Fundamentals of immunology*. Interscience Publ. Inc. New York, 1956.
3. COE, J. J. *Immunol.* 100: 507, 1968.
4. COHEN, S. y S. GORDON. *Biochem. J.* 97: 460, 1965.
5. CORMANE, R. H. *Clin. Exp. Immunol.* 1: 207, 1966.

6. COSTEA, N., V. YAKULIS y P. HELLER. *J. Immunol.*, 99: 559, 1967.
7. ELIAS, H. G. *Ultrazentrifugen Methoden*. Beckman Instrumts. Munchen, 1961.
8. IRLANDER, S. R., R. M. PURVINAS y G. E. BABCOCK. *J. Macromol. Sci. Chem.* 2: 7, 1393, 1968.
9. FAHEY, J., E. FRANKLIN y G. KUNKEL. *J. Immunol.* 99: 465, 1967.
10. FIRREMAN, P., W. E. VANNIER y H. GODDMAN. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 845, 1964.
11. FLEISCHMAN, J. B., R. R. PORTER y E. M. PRESS. *Biochem. J.* 88: 220, 1963.
12. FLODIN, P. y J. KILLANDER. *Biochim. Bioph. Acta.* 63: 403, 1962.
13. FRANKLIN, E. C. *Minerva Med.* 2: 804, 1961.
14. FRANKLIN, E. C. *J. Immunol.* 91: 730, 1963.
15. FUDENBERG, H. H., J. L. GERMAN y G. M. KUNKEL. *Arthritis Rheumat.* 5: 565, 1962.
16. GAMMAGLOBULINS: Nobel Symposium. Ed. Killander, J. Intersc. Publ. New York, 1967.
17. GERGELY, J. y H. H. FUDENBERG. *Immunochemistry*, 7: 1, 1970.
18. GOLDE, D. W., M. H. MC. GUINISS y P. V. HOLLAND. *Vox Sang.* 16: 5, 465, 1969.
19. GOLEWIOBSKA, H. y D. S. ROWE. *Clin. Exp. Immunol.*, 2: 275, 1967.
20. GRABAR, P. y C. A. WILLIAMS. *Biochim. Bioph. Acta.* 10: 193, 1953.
21. GUILLAMORD, H. J. y H. ISLIKER. *Vox Sang.* 7: 675, 1962.
22. HANNESTAD, K. *Clin. Exp. Immunol.* 3: 67, 1968.
23. HANSON, L. A. y E. M. TAN. *J. Clin. Invest.* 44: 704, 1965.
24. HEFTMANN, E. *Chromatography*. Reinhold Clem. Testbook New York, 1967.
25. HELMEX, R. y F. M. LEVIN. *Immunochemistry*, 3: 1, 1, 1966.
26. HENNEY, C. S. y D. R. STANWORT. *Immunology*, 9: 139, 1965.
27. HEREMANS, J. F. *Les globulines sériques du système gamma*. Masson Cie. Bouxelles-Paris, 1960.
28. HUMPHERY, J. H. y R. G. WHITE. *Immunology*. Blackwell Scient. Publ. Oxford and Edimburg, 1970.
29. IKENAKA, I., D. GITLIN y K. SCHMID. *J. Biol. Chem.* 240: 7, 2868, 1965.
30. JOHNSTON, S. y P. ALLEN. *J. Immunol.* 100: 942, 1968.
31. KABAT, E. y M. MAYER. *Experimental Immunochemistry*, Ch. P. Th. Publ. Springfield, Illinois, USA, 1964.
32. KARUSH, F. *Advances in Immunology*, 2: 1, 1962.
33. KOHN, J. *Arztl. Lab.* 10: 269, 1964.
34. KROGH, H. K. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 37: 1, 104, 1970.
35. KUWAHARA, O. S., S. SHINKA y M. IMANISHI. *Biken J.* 9: 1, 1966.
36. LAMM, M. *Immunochemistry*, 6: 235, 1969.
37. LAMONREUX, G. y A. G. BORDIRAS. *Clin. Exp. Immunol.* 1: 263, 1966.
38. LATERRE, E. C., J. F. HEREMANS y A. CARBONARA. *Clin. Chim. Acta.* 10: 197, 1964.
39. LINDSTROM, F. D. *Clin. Exp. Immunol.* 7: 1, 1970.
40. LINK, H. y O. ZETTERVALL. *Clin. Exp. Immunol.* 6: 435, 1970.
41. ZESSLER, E., J. S. REMINGTON, M. FINLAND y D. GITLIN. *Nature*, 194: 407, 1962.
42. MONTE-WICHER, V., K. WICHER y C. ARBESMAN. *Immunochemistry*. 7: 839, 1970.
43. MORELLA, A. W. D. TERRY y T. A. WALMAN. *J. Clin. Invest.* 49: 4, 673, 1964.
44. NASH, R. D. y J. H. SCHWAB. *J. Immunol.* 100: 252, 1968.
45. NORMANRELL, D. *Immunochemistry*. 7: 787, 1970.
46. NUSSENZWEIG, V. y B. BENACERROF. *J. Immunol.* 93: 1008, 1964.
47. OSSERMAN, E. F. y D. P. LAWLOR. *J. Exp. Med.* 124: 921, 1966.
48. OUCHTERLONY, O. *Prog. Allergy*. 5: 1, 1958.
49. PEDERSEN, K. O. *Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions*. Almquist. Upsala, 1945.
50. PENNELL, R. B. *The Plasma Proteins*. 1: 9, Ed. Putnam F. W. New York, 1961.
51. PÉREZ MIRANDA, M. Z. *Klin. Chem.* 1968.
52. PÉREZ MIRANDA, M. *Lancet*, II, 1305, 1968.
53. PÉREZ MIRANDA, M. y P. LISO. *Soc. Esp. Med. Int. Estudios previos sobre una nueva fracción gammaglobulinica humana*. Comunicación al IX Congreso. Santiago de Compostela, 1970.
54. PÉREZ MIRANDA, M., A. CHORDI y E. ORTIZ DE LANDÁZURI. *Immunologische Studien über verschiedene antigene Komponente der normalen menschlichen Niere*. Vehl. Deut. Gschft. Allergie. Schattavater-Verlag. Stuttgart, 207, 1968.
55. PETERSON, E. A. y H. A. SOBER. *Methods in Enzymology*. Acad. Press New York, 1962.
56. PORTER, R. R. *The Biochem J.* 59: 405, 1955.
57. PORTER, R. R. *The Biochem J.*, 73: 119, 1959.
58. PRESS, E. M. y R. R. PORTER. *The Biochem J.* 83: 172, 1962.
59. RAMSAY, C. A. y G. L. ASHERSON. *Clin. Exp. Immunol.*, 2: 6, 677, 1968.

60. RIVAT, C. *Immunochemistry*, 6: 327, 1969.
61. RODKEY, L. S. y M. J. FREEMAN. *J. Immunol.*, 102: 713, 1969.
62. ROSSEN, R. D., S. M. WOLFF, W. T. BUTLER y W. VANNIER. *J. Immunol.* 98: 764, 1967.
63. ROWE, D. S. y J. FAHEY. *J. Exp. Med.* 121: 171, 1965.
64. SCHEIDEGGER, J. J. *Int. Arch. Allergy*, 7: 103, 1955.
65. SCHROHENLOHER, R. E. *Arch. Biochem. Bioph.* 101: 456, 1963.
66. SCHULTZE-HEREMANS. *Molecular Biology of Humans Proteins*. Elsevier Publ. Comp. New York, 1966.
67. SCHULTZE, H. E. y col. Citados por NASH (98).
68. SINGER, J. M. y CH. M. PLOTZ; *JAMA*, 168, 1958.
69. SMITH, E. L. *J. Biol. Chem.*, 164: 345, 1946.
70. SMITH, C. *Molecular Biology*. Faber and Faber. London, 1967.
71. STANWORTH, D. R. y C. S. HENNEY. *Immunol.* 12: 3, 267, 1967.
72. STEINHARDT, T. y S. BEYCHOK. *The Proteins*, Ed. Hans Neurat. 11: 140, 1964.
73. STEVENSON, G. T. *J. Clin. Invest.* 41: 1190, 1962.
74. STRAUSS, A. J. L., P. G. KEMP, W. E. VANNIER y H. C. GOODMAN. *J. Immunol.* 93: 24, 1964.
75. TAKAHASHI, S. y K. SCHMID. *Bioch. Bioph. Acta*, 63: 343, 1962.
76. TAKATSUKY, K. y E. F. OSSERMAN. *J. Immunol.* 92: 100, 1964.
77. TERRY, W. D. y J. L. FAHEY. *Science*, 146: 400, 1964.
78. THOMPSON, J. J. *Introducción a la energética química*. Ed. Alhambra, 1969.
79. TISELIUS, A. *Clin. Chim. Acta* 3: 1, 1958.
80. WEIR, D. M. *Handbook of Experimental Immunology*. Blakwell Scientific Publ. Oxford y Edimburgh, 1967.
81. WOODS, R. *Immunochemistry*. 7. 4, 1970.