



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Química**

**ESTUDIO INMUNOQUIMICO DEL FACTOR REUMATOIDE**

**T E S I S**

Para obtener el título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a :**

**Armando Francisco Vargas Albores**

**México, D. F.**

**1994**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SECCION 1. REVISION.

1.1. GENERALIDADES	1
1.2. EVENTOS INMUNOLOGICOS PRESENTES EN LA AR	3
A. Complejos Inmunes	3
B. Anticuerpos Antinucleares	7
C. Crioglobulinas	8
D. Complemento	14
1.3. EL FR Y LA MOLECULA DE IgG	26
A. El Anticuerpo: El Factor Reumatoide	26
B. El Antígeno: La Molécula de IgG	29

SECCION 2. TRABAJO EXPERIMENTAL.

2.1. PLANTEAMIENTO	46
2.2. MATERIALES Y METODOS	47
A. Obtención de la IgG	47
B. Obtención de los péptidos de la IgG	49
C. Prueba de la inhibición del FR	50
2.3. RESULTADOS	52
2.4. DISCUSION	63
2.5. CONCLUSIONES	66

SECCION 3. BIBLIOGRAFIA.	67
--------------------------	----

## SECCION 1. REVISION

### 1.1. GENERALIDADES.

Una de las enfermedades sistémicas mas frecuentes y de mayor capacidad invalidante es la artritis reumatoide (AR), la cual tiene una gran incidencia en nuestro medio y su etiología aún no ha sido establecida.

La enfermedad afecta del 2 al 5% de la población y preferentemente a individuos mayores de 40 años. Aunque la mayor incidencia se presenta en mujeres de mediana edad, se ha establecido que ninguna edad está exenta de padecerla. De acuerdo con Lawrence (1), la enfermedad es dos veces mas común en mujeres que en hombres y la incidencia aumenta progresivamente con la edad hasta que, a los 65 años o mas, es de 6% en varones y 16% en mujeres. Esto concuerda con los datos de proporción de 3:1 que presentan las mujeres sobre los hombres, según Fye y cols (2). Por otro lado los estudios familiares no han revelado, en forma concluyente, alguna transmisión genética de la enfermedad.

La AR es una enfermedad inflamatoria sistémica crónica que afecta preferentemente las articulaciones, aunque no en forma exclusiva. Característicamente el padecimiento ataca las articulaciones pequeñas de las manos y los pies progresando en sentido centripetal y simétrico produciendo deformaciones. Probablemente ningún sistema o tejido este exento de afección, pero ciertas áreas muestran mayor susceptibilidad. Despues de las articulaciones las áreas mas comúnmente dañadas son: la envoltura de los tendones, el tejido celular subcutáneo, el corazón, los vasos pequeños y los pulmones. La manifestaciones extraarticulares incluyen: vasculitis, atrofia de la piel y músculo, nódulos subcutáneos, linfadenopatías, esplenomegalia y leucocitopenia.

La naturaleza sistémica del padecimiento se manifiesta por la elevación de la velocidad de sedimentación de los eritrocitos, anemia hipocrómica y cambios característicos en los patrones proteicos del suero. Los síntomas incluyen fiebre y pérdida de peso.

A pesar de los estudios sobre la enfermedad, en muchos centros del mundo, su causa es desconocida. Definitivamente no existe la descripción de algún microorganismo como agente, al menos durante el curso del padecimiento; aunque el proceso se ha relacionado con la presencia de un virus (3). Por otro lado, se ha considerado seriamente la etiología autoinmune sin que las pruebas sean convincentes (4). Sin embargo, hoy es ampliamente aceptado que las reacciones inmunológicas juegan un papel importante -probablemente esencial- en la patogénesis de la AR. Este fenómeno está mediado por reacciones consecuentes a la formación de complejos inmunes; pero al respecto aún se plantean varias interrogantes como: ¿Cuál es el agente que desencadena las reacciones inflamatorias?, ¿Que factores favorecen estas reacciones?, ¿Cuál es la etiología de la AR?. Responder a estas preguntas sería facilitar los caminos dirigidos hacia la prevención y curación de este padecimiento y la búsqueda de tal respuesta orienta hacia el estudio y comprensión de los fenómenos inmunológicos existentes durante el padecimiento. Por lo tanto en las siguientes secciones se revisan algunos aspectos sobre estos fenómenos.

## 1.2. EVENTOS INMUNOLÓGICOS PRESENTES EN LA ARTRITIS

### A.- COMPLEJOS INMUNES.

Las lesiones articulares características del padecimiento, se deben al proceso inflamatorio local. Dicha inflamación es posible por la presencia de complejos inmunes (CI). Es sabido que la vasculitis y los nódulos subcutáneos se deben a la presencia de CI. Entonces, ¿Cuál es la génesis de los CI?, ¿Como están constituidos?

El fluido sinovial de pacientes con AR seropositivos, contienen considerables cantidades de complejos de gammaglobulina o complejos específicos antígeno-anticuerpo. Aún antes de su demostración las evidencias circunstanciales sugerían la presencia de CI, derivada de las siguientes observaciones:

- a). El descenso de los niveles intra-articulares de componentes del complemento, por el consumo de tales moléculas.
- b). La detección por inmunofluorescencia de depósitos de inmunoglobulinas asociadas con complemento en la membrana sinovial.
- c). La presencia en las efusiones articulares de células fagocíticas con inclusiones citoplasmáticas que contienen inmunoglobulinas y/o componentes del complemento.

Broder y cols., empleando una técnica de liberación de histamina en pulmón de cobayo, para determinar la presencia de complejos antígeno-anticuerpo, detectaron factores liberadores de histamina en el fluido sinovial y en el suero de pacientes con AR (5,6). Este material liberador de histamina, el cual ellos llamaron "Factor Reumatoide Biológicamente Activo", contenía IgG y poseía las propiedades biológicas, bioquímicas e inmunológicas de un complejo inmune soluble. Este agregado no era disociado por tratamiento ácido y se comportaba como una macromolécula en filtración por Sephadex G-200 y en ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Estas características no fueron modificadas por la reducción y la alquilación. La ac

tividad de liberación de histamina se encontró en 29 de 40 efusiones sinoviales de pacientes con AR, pero en ninguna de las de pacientes con padecimientos articulares degenerativos inflamatorios no reumatoides (6).

La primera evidencia directa de la presencia de complejos inmunes en el fluido articular fué reportada por Hannestad en 1967. El observó la formación de precipitados al hacer reaccionar en gel el liquido sinovial de pacientes con AR y sueros con altos titulos de FR (7). Este fenómeno estuvo limitado a fluidos articulares provenientes de pacientes con AR activa y reactividad de FR en su suero.

El producto de la reacción entre el FR del suero y la IgG del liquido sinovial se comportaba, en estudios de centrifugación e inmunolectroforesis, igual que gammaglobulina G agregada. Sin embargo se observó diferencia en que la IgG agregada por calor no se disocia a pH bajos, mientras que el complejo la presenta a pH de 5.6 o menos. A este pH los complejos se disocian presentando actividad antigammaglobulínica localizada en la región IgM, cuando se hace sedimentar en gradiente de sacarosa (8).

Los complejos de gammaglobulina del fluido sinovial de pacientes con AR fueron caracterizados por Winchester y asociados (9-11). Ellos encontraron que los complejos existen como compuestos de alto peso molecular y coeficientes de sedimentación de 9 a 30S. Los complejos mas grandes se detectaron por reacciones de precipitación con Clq (9) y con FR purificado (10), mientras que los mas pequeños reaccionan únicamente con FR obtenido de pacientes con enfermedades linfoproliferativas (11). Los complejos inmunes aislados por la precipitación con estos reactivos se disocian facilmente a pH ácidos o en urea 4 a 6 mol/l, y consisten fundamentalmente de IgG. No se han detectado antigenos adicionales.

Una porción de los complejos presentó actividad anti-IgG similar al FR encontrado en el suero de pacientes con AR (10, 12). No existen evidencias directas de que esta actividad anti-gammaglobulínica esté dirigida contra un grupo específico de gammaglobulinas, ya sea nativas o desnaturalizadas, sin embargo esta alternativa no puede ser descartada.

Los complejos inmunes presentes en el fluido sinovial fijan complemento. Se ha observado una relación directa entre la cantidad de complejos y el descenso de los niveles del complemento. Además la fijación de C1q no requiere la presencia de IgM, ya que si el fluido sinovial se trata con suficiente 2-mercaptoetanol para destruir la actividad del FR 19S, no se altera la cantidad del material precipitado (10).

El tamaño del complejo gammaglobulínico también puede tener un papel en la fijación de complemento (13,14), ya que se ha descrito que los fluidos que contienen complejos abundantes y pesados, son anticomplementarios cuando se prueban con sueros humanos normales frescos a 4°C; mientras que los fluidos conteniendo complejos pequeños reaccionan bien a 37°C, en la presencia del FR del tipo IgM. Estas temperaturas son las óptimas para la fijación del complemento por anticuerpos IgG e IgM respectivamente (13), así como para la fijación de complemento por IgG agregada y FR estudiada por Zvaifler y Schur (14).

Por otra parte la adición de fluidos articulares que contienen complejos de gammaglobulina a suero de pacientes con AR seropositivos, da por resultado el aumento del efecto anticomplementario del fluido articular. Esto sugiere que el FR presente en el suero reacciona con el complejo de gammaglobulina causando un incremento en el consumo del complemento (10).

Posteriormente, Hurd (15) obtuvo resultados similares al incubar leucocitos normales con fluido sinovial de pacientes con AR seronegativos y no detectó inclusiones citoplasmáticas por inmunofluorescencia; sin embargo, si posteriormente se añ

día FR del tipo IgM aislado, era posible observar, por la misma técnica inclusiones citoplasmáticas de IgG, IgM y C3.

Los complejos séricos detectados y aislados con FR de la clase IgM monoclonal difieren en algunas características de aquellos encontrados en el fluido sinovial. Los complejos séricos se presentan como pequeños agregados de gammaglobulina, no precipitan con Clq, no muestran efectos anticomplementarios y no es un reactivo dominante aún cuando el FR clase IgG esté presente (11). Posiblemente esto se deba a que los grandes complejos de gammaglobulina son removidos de la articulación por la vía linfática y no retornan al torrente sanguíneo, mientras que los agregados pequeños salen de la articulación y pueden ser detectados en el suero (16).

Además del FR convencional, el suero y fluido sinovial de pacientes con AR a menudo contienen otras antigammaglobulinas (17), entre las cuales hay anticuerpos que reaccionan específicamente con determinantes antigénicos ocultos en la porción  $F(ab')_2$  de la molécula de IgG. Ya que las estructuras antigénicas son reveladas después del tratamiento con pepsina, estos anticuerpos son denominados pepsina-aglutinadores.

La digestión, *in vitro*, de IgG humana por proteasas lisosomales revelan sitios antigénicos similares. Por otro lado, el flujo sinovial de pacientes con AR contiene enzimas con esta capacidad por lo que posiblemente este evento suceda *in vivo* durante el padecimiento reumatoide (18).

Por otra parte, Quismorio y cols. (19) produjeron una sinovitis crónica en la articulación de la rodilla de un conejo por repetidas inyecciones intra-articulares de fragmento  $F(ab')_2$ . Ellos postularon que el fragmento de la gammaglobulina fue reaccionando con los anticuerpos en forma natural en el suero del conejo, los cuales son análogos a los pepsina-aglutinadores y así se refuerza de manera experimental los conceptos antes mencionados. Sin embargo, en humanos únicamente se ha podido producir sinovi

tis por inoculaciones intra-articulares de pequeñas cantidades del fragmento Fc, pero no con F(ab')<sub>2</sub>. Ambos fragmentos fueron preparados por digestión de la IgG con papaína (19,20).

Se ha aislado del tejido sinovial reumatoide tanto los sitios antigénicos revelados por la digestión con pepsina como los complejos inmunes que contienen anticuerpos contra estos sitios antigénicos que fueron demostrados en el fluido sinovial de pacientes con AR por Mellbye y Natvig (22).

El papel de estos anticuerpos como agentes flogogénicos es cuestionable, ya que la adición de pepsina-aglutinadores a precipitados inmunes preformados no incrementa la cantidad de complemento fijado. Por otro lado los complejos de pepsina-aglutinadores y fragmentos F(ab')<sub>2</sub> fijan pequeñas cantidades de complemento humano *in vitro* (18). Esto es de interés debido a la demostración de que el C3 puede ser fijado y activado por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> por la vía clásica (23). Además las efusiones sinoviales de pacientes con AR pueden fijar complemento por la vía alterna, como lo demuestra Götze (24).

## B.- ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

Se ha reportado la existencia de anticuerpos dirigidos contra otros antígenos tales como los antinucleares (ANA), los cuales se detectaron frecuentemente en el suero y en el fluido articular de pacientes con AR (25,26), y por lo general se encuentran simultáneamente con el FR. Sin embargo ocasionalmente, mientras que en el fluido articular se detecta ANA, no ha sido posible determinar su presencia en el suero correspondiente del mismo paciente (15, 27).

Se ha descrito que la actividad de los factores antinucleares en AR se detectan mas facilmente cuando se utiliza como antígeno el núcleo de granulocitos que cuando se emplean núcleos de linfocitos, tiroides, mucosa gástrica o hígado de rata.

Los ANA parecen ser granulocito específicos en varios fluidos sinoviales estudiados (26). Regularmente se encuentran en los exudados articulares de pacientes con AR nucleoproteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN) probablemente liberados por la desintegración de los granulocitos (28). Al respecto, se especula que los ANA y los restos de degradación nuclear pueden ser constituyentes de las inclusiones en los granulocitos que están presentes en efusiones sinoviales reumatoideas (25,29). La identificación de nucleoproteínas en el citoplasma de los leucocitos que se encuentran en el contenido sinovial reumatoide ha sido posible por inmunofluorescencia y esto confirma lo anterior (30).

Zvaifler (31) presenta otra evidencia experimental para el mismo criterio quien encuentra ANA en células obtenidas de efusiones reumatoideas. En varias ocasiones los ANA fueron demostrados en el lisado de células, aún cuando no se les encontró en el fluido sinovial correspondiente. Ninguno de estos hallazgos está limitado a fluidos articulares de pacientes con AR, ya que también fueron encontrados en otras formas de sinovitis, aunque en menor cantidad y frecuencia.

Por otro lado, recientemente se ha reportado la existencia de un FR policlonal que presenta reacción cruzada con antígenos del núcleo celular (32, 33).

### C.- CRIOGLOBULINAS.

En 1971 Marcus y Townes (34, 35) y Cracchiolo y cols. (36) reportaron en forma independiente que, en casi todos los fluidos sinoviales de pacientes con AR existen proteínas que precipitan cuando se enfria la muestra a 4°C denominándolas por esta propiedad, crioproteínas. Rara vez se encuentran proteínas similares en el suero de pacientes con AR, así como en efusiones articulares de individuos con procesos inflamatorios no reumatoide, es decir, parecen ser exclusivas de la articulación reumatoide.

Estas crioproteínas están constituidas principalmente de inmunoglobulinas, con marcada predominancia de IgG e IgM, además se encuentran fibrinógeno y productos de degradación del mismo; pero estos pueden eliminarse por lavados repetidos (35).

Se ha detectado ADN en la mayoría de estas crioproteínas, empleando la reacción de la difenilamina. La identificación inmunoquímica del ADN se ha hecho con menor frecuencia y ha sido motivo de confusión. Marcus y Townes han detectado ADN con poca frecuencia, ya sea empleando suero de pacientes con lupus eritematoso diseminado como reactivo en un sistema de precipitación o trabajando con una microtécnica de fijación de complemento. Por otro lado Cracchiolo usando suero de conejos anti-ADN de una sola cadena pudo identificar en forma constante ADN; pero únicamente después de calentar las crioproteínas a 100°C.

Las propiedades biológicas que presentan estas proteínas crioprecipitables son de gran interés. La mayoría de ellas presentan actividad de anti-gammaglobulina y de ANA (35-37). La actividad anti-gammaglobulina disminuye en forma significativa después del tratamiento con 2-mercaptoetanol, lo que sugiere la presencia de proteínas de la clase IgM (37). Además, presentan actividad anticomplementaria (34). En este precipitado se pudo determinar por actividad hemolítica la presencia de C1q y por inmunodifusión a C4, en casi la mitad de los casos. Sin embargo, no fue posible determinar la presencia de C3 posiblemente por encontrarse en cantidades muy pequeñas ya que, los conejos inmunizados con el crioprecipitado produjeron anticuerpos contra este componente del complemento.

Marcus y Townes (35) señalan que las crioproteínas pueden ser disociadas parcialmente con solución de cloruro de sodio al 15% y este material disociado tiene la capacidad de reaccionar con DNA de timo de ternera, desnaturalizado por calor.

Además las fracciones se estudiaron separándolas por gradiente de densidad, haciéndolas reaccionar con DNA desnaturalizado y con complemento humano obtenido de un suero agammaglobulinémico. Se observó que las fracciones mas pesadas tenían la máxima actividad de fijación de complemento cuando se utilizaba ADN desnaturalizado; pero no ocurrió fijación cuando se empleó ADN nativo. Estas evidencias apoyan la posibilidad de que exista una reacción específica antígeno-anticuerpo, y están basadas en que el ADN *per se* no fija complemento y que cuando reacciona con gammaglobulina agregada por calor, no incrementa la cantidad de complemento fijada por la gammaglobulina agregada sola.

Zvaifler (37) presentó resultados adicionales sobre el material crioprecipitable del fluido sinovial, los cuales difieren de los presentados por Marcus y Townes (34). Esta diferencia posiblemente se deba a que Zvaifler utilizó mayor número de lavados y mayor tiempo de crioprecipitación (72 horas). El crioprecipitado obtenido se redisolvió completamente a 37°C, el C3 fué identificado en forma regular; mientras que C1q fué detectado solamente en algunas ocasiones. Los datos sobre los crioprecipitados se resumen en la tabla I.

Generalmente, la capacidad del crioprecipitado para fijar complemento estuvo relacionada inversamente con la concentración de complemento detectado en el fluido sinovial del cual se obtuvo, indicando su posible utilización intra-articular. Además esta capacidad del crioprecipitado de fijar complemento estuvo relacionada en forma directa con la cantidad de proteína total en el precipitado. Cantidades similares de complemento de cobayo y de humano fueron fijadas, observándose que ocurre mejor fijación después de incubar toda la noche a 4°C, que a 37°C durante 45 minutos. Ambos hallazgos fueron mas consistentes cuando la fijación fué hecha por IgG que por IgM (38). El consumo de complemento no estuvo relacionado con la concentración de IgG o IgM en el crioprecipitado; pero fué proporcional al cociente IgG/IgM (figura 1). Si esto representa un balance entre la fija

P R O T E I N A S (mg%)				C O M P L E M E N T O			A N T I C U E R P O S	
PROTEINA TOTAL	IgG <sup>1</sup>	IgM <sup>1</sup>	IgA <sup>1</sup>	C <sub>1q</sub> <sup>2</sup>	C <sub>3</sub> <sup>2</sup>	% DE C' FIJADO	ANA <sup>3</sup>	FR <sup>4</sup> (Título)
100	5.0	25.0	0.0	0	+	9	0	0
480	31.0	31.0	1.9	0	+	19	0	80
47	7.1	8.6	0.0	0	+	7	±	40
92	41.0	18.5	1.1	±	+	55	±	
60	56.0	7.6	4.5	0	+	64	+	0
35	5.4	3.0	0.0	0		39	±	40
120	47.0	49.0	1.9	+	+	6	±	80
100	32.0	6.6	1.2	0		38	+	
34	7.5	0.0	0.0	0	0	45		10
73	37.0	6.2	2.1	+	+	43	0	0
366	4.5	60.0	15.5	0	+	69	0	160

TABLA I. CRIOPRECIPITABLES OBTENIDOS DEL FLUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.

1.-Determinadas por Inmunodifusión radial.  
3.- Inmunofluorescencia.

2.- Método de Ouchterlony.  
4.- Flocculación de Bentonita.

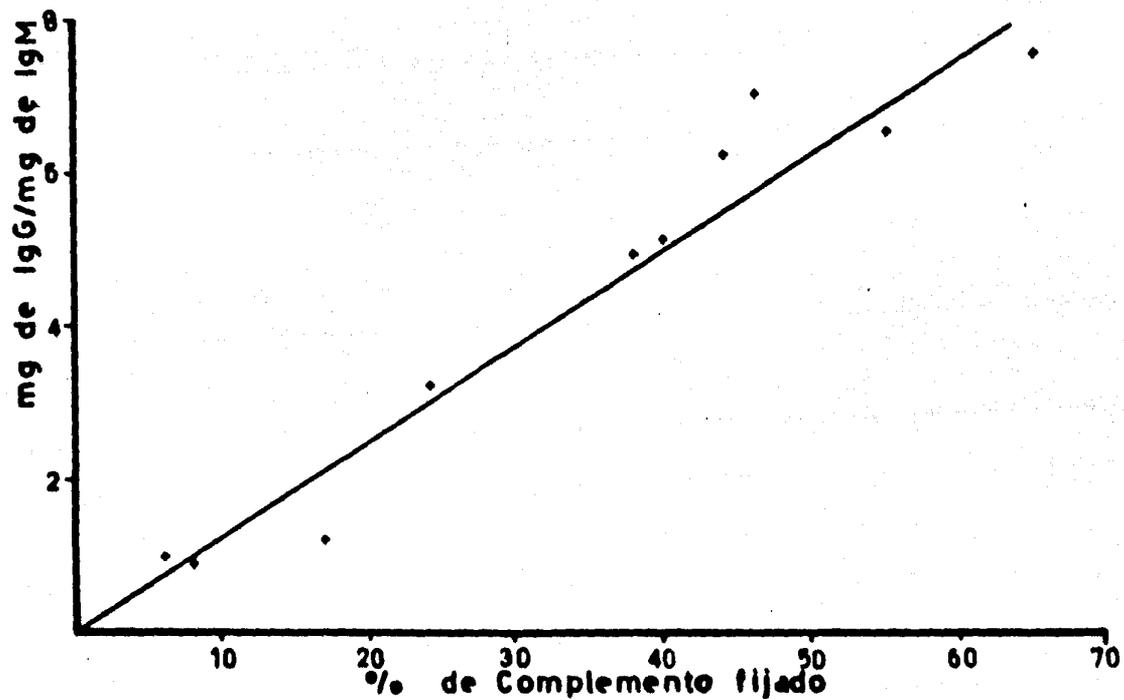


FIGURA 1. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE IgG/IgM Y EL % DE COMPLEMENTO FIJADO POR EL FLUÍDO SINOVIAL DE PACIENTES CON AR.

ción de complemento por IgG y su inhibición por el FR tipo IgM no está establecido, pero los datos obtenidos son consistentes con tal hipótesis.

Basándose en sus actividades biológicas, su contenido de anti-gammaglobulina, su actividad antinuclear y su similitud con las proteínas crioprecipitables séricas, se ha sugerido que los crioprecipitados del fluido sinovial son representativos de complejos inmunes. Esto se ve reforzado por el hallazgo de anticuerpos en los crioprecipitados, los cuales no se encuentran en el suero del mismo paciente, es más, ni en el fluido sinovial del cual se obtuvo (36). No se conoce la razón de por qué estos anticuerpos se detectan con facilidad en los precipitados del fluido sinovial reumatoide, cuando no están presentes en el suero correspondiente. Una razón podría ser que la solubilidad de las proteínas se haya alterado por la acción de las enzimas presentes en el exudado inflamatorio. Otra razón sería que estos anticuerpos sean sintetizados en la membrana sinovial y reaccionan con sus antígenos antes de alcanzar el torrente circulatorio. Por otro lado, debe enfatizarse que existe un error al comparar el fluido sinovial con el suero, ya que el fluido de una articulación inflamada es análogo al plasma. Por lo tanto es más apropiado comparar los crioprecipitados del fluido sinovial reumatoide con los criofibrinógenos; los cuales son proteínas que precipitan cuando el plasma es enfriado. Estos crioprecipitados plasmáticos se detectan en diversas condiciones clínicas incluyendo: tumores malignos metastásicos, enfermedades supurativas agudas, embarazo y ocasionalmente en desórdenes del tejido conectivo.

Zvaifler reportó que 9 de 10 sujetos con AR tenían proteínas plasmáticas crioprecipitables (39). La cantidad de proteína del precipitado obtenido fue un promedio de 0.56 mg/ml. El mayor constituyente del precipitado fue fibrinógeno; se detectaron pequeñas cantidades de IgG (0.08-0.14 mg/ml), sin embargo no fue posible detectar ni IgM, ni IgA. A diferencia de los crioprecipitados del fluido sinovial, los crioprecipitados del plas

ma no tienen actividad antinuclear y, aunque el FR estuvo presente en 7 de las 9 muestras de plasma, únicamente 3 de los crioprecipitados presentaron actividad anti-gammaglobulina. En este estudio no se pudo determinar la presencia de C1q y C3; tampoco se observó fijación de complemento después de la incubación del precipitado con complemento de cobayo (39).

Característicamente las efusiones reumatoideas contienen grandes cantidades de fibrinógeno y productos de degradación del mismo; la actividad antitrombina de estos productos podría explicar el hecho de que este líquido coagula muy poco y lento (40).

Por otro lado, cabe remarcar que los complejos solubles de monómeros de fibrina y productos de degradación del fibrinógeno son marcadamente insolubles en frío (41, 42). Por lo tanto, es muy probable que cuando el fluido sinovial reumatoide se enfria a 4°C, la mezcla de fibrina y productos de degradación del fibrinógeno, se hacen insolubles y precipitan. En este proceso se pueden atrapar mecánicamente complejos inmunes solubles ya existentes (17, 10). Así se deduce que los crioprecipitados del fluido sinovial pueden ser el resultado de una combinación fortuita de eventos fisicoquímicos, sobre productos crioprecipitables de la digestión de fibrinógeno formándose en la presencia de complejos inmunes solubles.

#### D.- COMPLEMENTO.

En general la actividad hemolítica total del complemento (C') en el suero de pacientes con AR se encuentra normal o ligeramente elevada (43-45). Considerando que el sistema del C' está compuesto por un grupo de proteínas séricas, se esperaría que éstas estén presentes en el fluido sinovial en concentraciones parecidas a las otras proteínas de tamaño similar. Sin embargo, Hedberg (46, 47) y Pekin y Zvaifler (48) reportaron, casi simultáneamente y en forma independiente, que en los pacientes con AR la actividad hemolítica del C' en el fluido sinovial es-

tá significativamente deprimida en comparación con la actividad del C' sérico. En cambio, en padecimientos articulares no reumatoides la actividad del C' no se encontró baja y fué proporcional a la cantidad de leucocitos, proteínas totales y a la concentración de gammaglobulina presentes en el fluido sinovial. Los niveles de C' se encontraron mas bajos en las efusiones de sujetos reumatoides, con nódulos, seropositividad al FR y con signos clínicos característicos de AR. En cambio en los pacientes seronegativos los niveles de C' intra-articular fueron mas altos, y fueron mayores todavía en pacientes con otros padecimientos articulares inflamatorios pero no reumatoides tales como: gota, espondilitis anquilosante, o síndrome de Reiter. Cuando se realizan determinaciones repetidas en la misma articulación se aprecia una marcada estabilidad por meses y aún por años. Estas observaciones iniciales han sido confirmadas por numerosos reportes (14, 25, 49-54).

Las apreciaciones anteriores, de que los pacientes con AR seropositiva tienen relativamente bajos niveles de C' hemolítico total en el fluido sinovial, sirvieron para sostener la existencia de una activación intra-articular del sistema del C'. Las evidencias directas presentadas incluyen: descenso de los niveles de los componentes individuales del sistema del C' en el fluido sinovial de pacientes con AR (50, 53); un acelerado catabolismo de las proteínas del C' tanto sistémicamente (55) como en el espacio intra-articular (56), y la demostración de los productos de la reacción secuencial del C' mediante técnicas fisicoquímicas, inmunoquímicas e inmunobiológicas (57-59).

Como las proteínas del C', durante su participación en las reacciones de activación, son modificadas y pierden sus propiedades y, además, son rápidamente degradadas *in vivo*, para asentar su posible participación en el proceso del padecimiento, se puede utilizar la medición de los niveles de los componentes individuales, ya sea los que intervienen en la vía clásica o los de la vía alterna. Para la vía clásica el componente C4 parece ser un indicador sensible de la activación de

C1, mientras que para la vía alterna son de gran utilidad las mediciones específicas del factor B. De este modo las mediciones individuales de componentes del C' hechas por métodos semi-cuantitativos revelan una reducción de las concentraciones de C1 y C4 (60) y de C2 (50). Las reducciones son proporcionales al decremento del C' hemolítico total. Estos hallazgos han sido confirmados por otros métodos para medir los componentes individuales tales como la inmunodifusión radial y las titulaciones hemolíticas estequiométricas (53, 57, 61).

La concentración de C1 en la mayoría de los fluidos sinoviales de pacientes con AR no está reducida significativamente aunque, ocasionalmente, en pacientes seropositivos se encuentran niveles muy bajos. Una posible explicación es que C1 se disocia de la inmunoglobulina activadora por algún fenómeno fisiológico; pero la reducción paralela de sus sustratos naturales, C4 y C2, es una evidencia indirecta de la activación de C1 (53)

Ruddy y Austen (53) encontraron que la actividad hemolítica de C4 en pacientes con AR seropositivos es de  $700 \pm 200$  unidades por gramo de proteína total del fluido sinovial. La reducción se observa si se compara con las  $4,300 \pm 500$  unidades encontradas en el fluido sinovial de pacientes con AR seronegativos, y con las  $7,800 \pm 1,100$  unidades en el fluido sinovial de pacientes con artritis degenerativa no reumatoide. La actividad de C2 en el fluido sinovial fue similar a la de C4, en los tres grupos de pacientes, aunque la reducción no fue tan marcada.

Los niveles de C3 en el fluido sinovial decrecieron proporcionalmente con el C' hemolítico total cuando fueron determinados por inmunodifusión radial (59), contraelectroforesis (63), o titulación hemolítica (53).

Ruddy y cols. (61) encontraron que los niveles séricos de C3 están elevados casi al doble de los normales en pacientes con AR, tanto seronegativos como seropositivos; sin embargo, los ni

veles de C9 en el fluido sinovial de pacientes seronegativos fueron mas altos que los de pacientes seropositivos. Esto puede interpretarse como una evidencia adicional de la actividad intra articular y terminación de la secuencia de las reacciones del C' durante el padecimiento, preferentemente en los pacientes seropositivos.

Es de todos sabido que la acción secuencial de C1 sobre C4 y C2 genera un factor con actividad enzimática denominado C3 convertasa (64). La formación intraarticular de la C3 convertasa apoya la idea del consumo de C3 en el espacio articular de pacientes con AR. El apoyo experimental está dado por los estudios de Weinstein y cols. (55) y Ruddy y cols. (56) sobre el metabolismo de C3 purificado y radiomarcado.

Se ha demostrado un marcado hipermetabolismo sistémico de C3 en pacientes con síntomas de vasculitis reumatoide (54) y aún en los pacientes que tienen limitada la enfermedad a las articulaciones. En seis pacientes con AR seropositivos sin vasculitis la velocidad del catabolismo plasmático de C3 fué de 1.6, 1.8 y 2.6% por hora; mientras que en personas normales los valores son de 0.9 a 2.2% por hora. El ligero incremento en el catabolismo de C3, demostrable en algunos pacientes, ocurre aún cuando los niveles séricos de C3 sean normales. Por otro lado, las mediciones efectuadas en el fluido sinovial de pacientes con AR, despues de la inyección intravenosa e intra-articular de C3 marcado con <sup>125</sup>I, indican un hipermetabolismo de C3 en el espacio articular (56).

La activación de C3, mediada por la C3convertasa, es la responsable del incremento en la eficiencia del sistema hemolítico. Además se generan factores biológicamente activos que favorecen la fagocitosis; estos tienen actividades quimiotácticas y anafilótóxicas y son responsables del fenómenos de adherencia inmune. Los productos de degradación de C3 pueden ser detectados por análisis inmunoelectroforético como protefnas que comparten determinantes antigénicos con C3, pero con mayor mo-

vilidad electroforética. Aún cuando estos productos, indicadores de la utilización de C3, se pueden detectar en fluidos sinoviales de pacientes con diversas afecciones articulares, solamente existe una relación directa con el diagnóstico de la AR, particularmente en pacientes seropositivos (62, 63).

La evidencia de que la secuencia de reacciones continúa está dada por la presencia de actividad quimiotáctica en el fluido sinovial. Puesto que se conoce que durante la activación del C' se liberan productos con actividad quimiotáctica para leucocitos, se analizaron los fluidos sinoviales provenientes de pacientes con AR. Aproximadamente dos tercios (38/54) de los fluidos sinoviales reumatoides mostraron actividad quimiotáctica para granulocitos de conejo; esta actividad estuvo en gran parte relacionada con el quinto (C5) y sexto (C6) componente del C' humano (58). Cuando las efusiones se analizaron por una combinación de técnicas inmunológicas y fisicoquímicas se demostró la presencia de dos mediadores moderados de la quimiotaxis. Todos, menos uno, de los fluidos reumatoides examinados mostraron un factor quimiotáctico de alto peso molecular: el complejo trimolecular C5b.6.7. Dos tercios de los fluidos contenían también un factor de bajo peso molecular, C5a, identificado como un producto de la ruptura de C5. Además, cuando se adiciona C5 humano purificado al fluido sinovial reumatoide, es posible observar la generación *in situ* de un factor quimiotáctico idéntico a C5a.

Si a la mezcla de C5 y fluido sinovial reumatoide se le adiciona anti-C5, la recién iniciada actividad quimiotáctica se inhibe en un 72%, mientras que al agregar anti-C3 no se presenta efecto alguno.

Sandberg y cols. en 1970 (23), reconocieron la activación del C' por la vía alterna mediada por complejos inmunes, la cual consume componentes del sistema únicamente de la secuencia de C3 a C9, produciendo sustancias biológicamente activas sin afectar los niveles de C1 y C4. La activación del C' por esta vía también se puede lograr por preparados de pared celular de levaduras (65) y por LPS de bacterias Gram-negativas (66).

Estos hallazgos sobre la vía de activación del C', permitieron postular que los agregados de ciertas inmunoglobulinas y polisacáridos que se encuentran en plantas y bacterias activan una enzima sérica distinta a las previamente descritas como componentes del C', la cual puede romper a C3. Los constituyentes de esta reacción han sido descritos en detalle por Gotze y Muller-Eberhard (67).

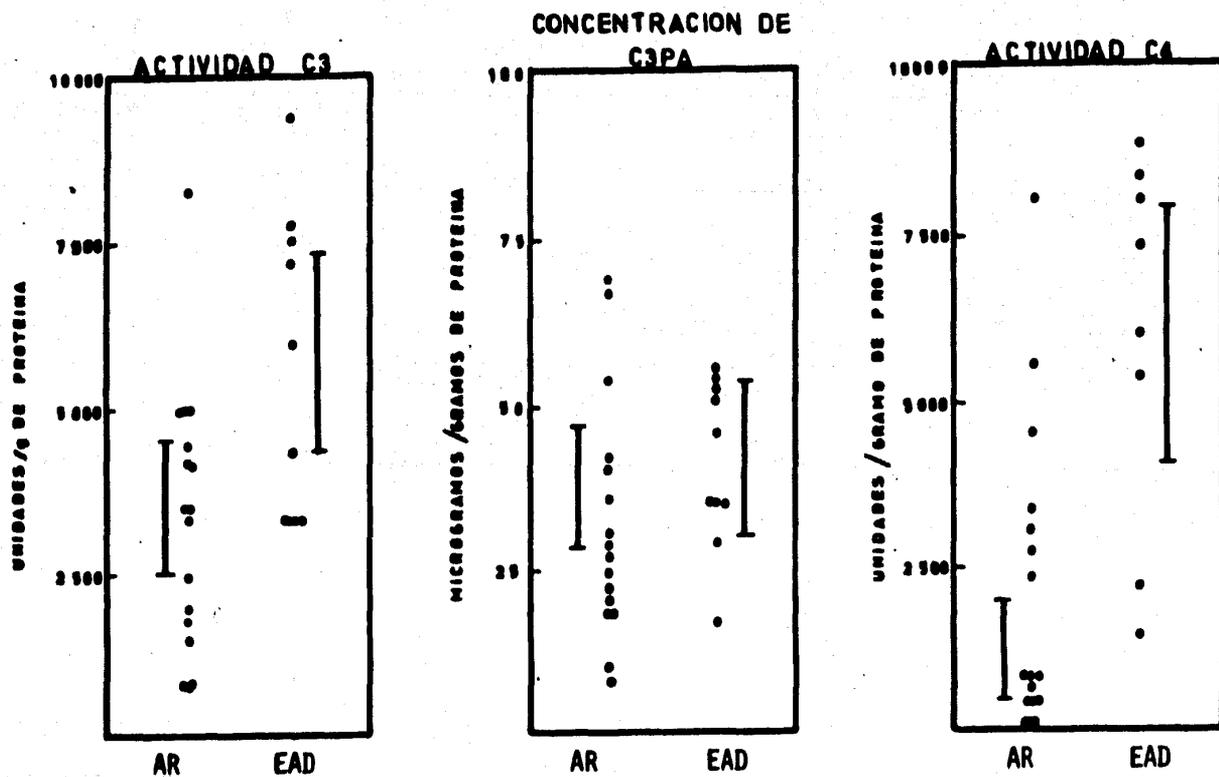
En el suero humano existe una proteína denominada proactivador de C3 (C3PA), la cual puede ser activada por polisacáridos de plantas o bacterias (inulina, zimosan, endotoxinas), o por agregados de ciertas clases de inmunoglobulinas. La activación de C3PA da por resultado la fragmentación de la molécula en dos piezas menores. Una de ellas, el activador de C3 (C3A), tiene una movilidad electroforética igual a la de una gammaglobulina y se asemeja a la C3 convertasa por su acción enzimática sobre la molécula de C3. Puesto que este mecanismo activa el sistema hemolítico del C' se le ha llamado "sistema activador de C3" o vía alterna.

Se han estudiado los fluidos sinoviales para determinar la presencia de C3A mediante la conversión de C3PA cuando se incuban con inulina. El promedio de concentración de C3PA en el grupo de pacientes con AR fué de 79  $\mu\text{g/ml}$ ; mientras que en pacientes con artritis infecciosa fué de 209  $\mu\text{g/ml}$  y en pacientes con enfermedades articulares no reumatoideas fué de 201  $\mu\text{g/ml}$ . La concentración de C3PA estuvo correlacionada con el nivel promedio de C' hemolítico total en el fluido articular de los tres grupos de pacientes. El C3A se determinó en 2 de las 7 efusiones reumatoideas y en 3 de los 5 fluidos articulares de pacientes con artritis infecciosa; pero estuvo ausente en las 8 efusiones de pacientes con artritis inflamatoria no reumatoide. Al adicionar inulina a los fluidos reumatoideos no se observa la conversión de C3PA, lo que hace suponer que los componentes del sistema alterno ya han sido utilizados; mientras que éstos parecen estar intactos en los otros padecimientos articulares que han sido estudiados (24).

Las determinaciones comparativas de C4, como indicador de la activación de la vía clásica, y de C3PA, como señalador de la vía alterna, en el suero de pacientes con glomerulonefritis crónica o con nefritis asociada a lupus eritematoso sistémico, han revelado perfiles utilizables para dilucidar la intervención de cada vía en la AR (66). En glomérulonefritis hipocomplementaria, los niveles disminuidos de C3 están correlacionados con la disminución de C3PA; mientras que C4 se encuentra en concentraciones normales, lo que indica una activación preferente de C3 por la vía alterna. Según los resultados en la nefritis lúpica la activación de C3 parece ser por ambas vías. La activación de la vía clásica se observa por la reducción de los niveles séricos de C4, y la activación de la vía alterna se manifiesta por la disminución de los niveles de C3PA en el suero.

Al comparar los niveles de C3, C4 y C3PA del fluido sinovial de 16 pacientes con AR seropositiva con 8 de pacientes con enfermedades articulares degenerativas, se observó que los niveles de C3 en los pacientes con AR fueron mas bajos a los encontrados en el otro grupo, aún cuando se aprecia una sobreposición de los datos (figura 2). Hay una gran diferencia cuando se comparan los niveles de C4 en el fluido sinovial de los dos grupos; en cambio para C3PA no se observa diferencia significativa, lo cual implica que la activación de C3 se lleva a cabo preferentemente por la vía clásica(68).

Las alteraciones en los niveles de los componentes del C' en el fluido sinovial de pacientes con AR sugiere que las inmunoglobulinas alteradas en su estructura como consecuencia de la unión con un antígeno o por otras razones, inician la activación del C' . Además, las moléculas de IgG agregadas (7) y los complejos IgG-anti-IgG(10) son capaces de activar el C'. Por otro lado se ha demostrado actividad anti-IgG en los complejos inmunes presentes en el fluido sinovial de pacientes con AR. Las alteraciones en las concentraciones de los componentes del C' son mas aparentes en los fluidos sinoviales



**FIGURA 2. NIVELES DE C3, C3PA Y C4 EN EL FLUÍDO SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE SEROPOSITIVA (AR) Y DE PACIENTES CON ALGUNA ENFERMEDAD ARTICULAR DEGENERATIVA (EAD). RUDDY Y AUSTEN (68).**

de pacientes con niveles elevados de IgM con actividad anti-IgG, la inmunoglobulina característica de pacientes seropositivos. Esto concuerda con los resultados que demuestran que la IgM es un activador potente del C' por la vía clásica, con poco o ningún efecto sobre la vía alterna (69).

Los componentes del C' pueden detectarse por inmunofluorescencia tanto en la membrana sinovial como en las células basales de ésta, usualmente en combinación con IgG.

Los leucocitos, presentes en el fluido sinovial de pacientes con AR, tienen inclusiones citoplasmáticas de inmunoglobulinas y componentes del C'. Además existe una correlación inversa entre la concentración de C' en el fluido sinovial y la presencia de las inclusiones de inmunoglobulinas en los leucocitos (57, 70, 71). Sin embargo es notable la detección frecuente de C1q, C4 y C3 en fagosomas de leucocitos provenientes de efusiones de pacientes con enfermedades articulares diferentes a la AR (57, 58).

Los complejos de gammaglobulinas de alto peso molecular pueden ser precipitados del fluido sinovial reumatoide y la cantidad de éstos está relacionada con el grado de depresión del C' en el mismo fluido (7, 10). Se han detectado complejos crioprecipitables conteniendo IgG, ADN, ANA y moléculas con actividad antigammaglobulínica en un gran porcentaje de fluidos articulares de pacientes con AR seropositivos (34, 36, 37). Estos complejos crioprecipitables fijan C' (35) y su anticomplementaridad es proporcional al descenso del C' hemolítico total del fluido en el cual se han detectado (37). De este modo hay evidencias de que el C' se consume en cuando menos tres sitios de la articulación: la membrana sinovial, el fluido sinovial y en los leucocitos presentes en la articulación inflamada.

Si en la AR existe una depresión de los niveles del C' debido a su activación y consumo y además, como característica del padecimiento hay presencia del FR, la pregunta a responder sería: ¿es el FR el responsable del descenso de los niveles de los componentes del C' en el fluido sinovial?

Los hallazgos para contestar esta pregunta son confusos. Por un lado, los títulos de FR encontrados en el suero o en el fluido sinovial de los pacientes artríticos tienen una completa correlación con el descenso de la actividad hemolítica del C' en el fluido sinovial (63). Además, cuando se incuban células polimorfonucleares normales con el fluido sinovial de pacientes seropositivos se presentan inclusiones de IgM y C3, que pueden ser determinadas por inmunofluorescencia, lo cual sugiere que los complejos de IgM y C' existen preformados en tales fluidos (15). Por otra parte, estudios por inmunofluorescencia hechos en membrana sinovial y granulocitos de articulaciones muestran que hay antiglobulinas clase IgG y C' formando complejos con IgG; el hallazgo de uno usualmente excluye al otro (62).

Los estudios *in vitro* para determinar la capacidad del FR clase IgM o del suero con actividad anti-gammaglobulínica para fijar C' son igualmente confusos. Los primeros reportes sugieren que el FR puede inhibir la fijación de C' por parte de la IgG cuando ésta se encuentra unida a eritrocitos de carnero (72, 73), a partículas de látex (74) o a mitocondrias (75).

Para demostrar en forma indirecta la influencia del FR en las reacciones de la fijación de C' por parte de la molécula de IgG, Wiedermann (76) empleó 2-mercaptoetanol (2-ME) para reducir las moléculas de anticuerpos del tipo 7S o a la gammaglobulina agregada. Con este tratamiento la molécula pierde su capacidad de fijar C', pero mantiene su capacidad de reaccionar con el FR. Así, se controló la actividad de la IgG pudiendo determinarse la cantidad de C' fijada por la molécula del FR.

Los complejos formados de FR [IgM] y gammaglobulina agregada y reducida fijan el C' humano a 37°C; pero no a 4°C. Es de hacerse notar que estos complejos no fijan el C' de cobayo a ninguna temperatura (77). Los requerimientos de C' humano y una temperatura de reacción de 37°C han sido señalados en otros estudios hechos sobre las moléculas de anticuerpos del tipo 19S (13, 78, 79). Ya que en este caso los primeros componentes del complemento están disminuídos se ha sugerido que la activación es por la vía clásica. La reducción de C2 y C3 estuvo relacionada con el decremento de la actividad hemolítica total (77).

La incubación de inmunoglobulina agregada y reducida, con suero fresco normal o con suero de pacientes con AR se ronegativos dá por resultado la fijación de una pequeña cantidad de complemento o bien, no hay fijación. Por otra parte, cuando la fijación se hace con suero de pacientes seropositivos la fijación de C' se incrementa proporcionalmente con los títulos de FR en el suero. Sin embargo, esta cantidad de C' fijado es unicamente de la mitad a la sexta parte de la que se fija cuando se adiciona a suero normal humano gammaglobulina agregada no reducida (62).

Tesar y Schmid (80) demostraron que la unión del FR a complejos antígeno-anticuerpo dá por resultado una fijación adicional de complemento al ya fijado por el complejo. Ellos muestran que los complejos de albúmina sérica bovina (BSA) y su anticuerpo, anti-BSA, tratado con 2-ME fija cantidades pequeñas de complemento a 37°C; pero observaron un gran incremento en la fijación despues de la adición de FR, de la clase IgM, al complejo. Sin embargo, no hay fijación de C' cuando la reacción se efectúa a 4°C o cuando el FR-IgM es sustituido por FR de la clase IgG, previamente reducido con 2-ME. Estos resultados concuerdan con las observaciones previas de que los anticuerpos humanos de la clase IgM son disociados de C1 cuando se incuban a 4°C (78). Finalmente, el efecto del FR fué inhibido por la adición de anti-IgM humana, la cual habia sido tratada para des

truir su capacidad de fijar C'. La explicación a este fenómeno es que, el FR bloquea el sitio de fijación del C' en la molécula de IgG, por impedimento estérico; posiblemente debido a que el determinante para el FR y el sitio para la fijación del C' estén localizados cerca uno del otro en la porción Fc de la molécula de IgG. Así la fijación de C' observada se deba a que el C' se una a la molécula de FR-IgM.

También se ha estudiado la fijación del C' por el FR y gammaglobulinas no reducidas. La interacción del virus del herpes simple y su correspondiente anticuerpo, clase IgG, da por resultado la formación de un complejo virus-anticuerpo, el cual mantiene su infectividad (81). Estos complejos han sido identificados y aislados de la sangre de animales infectados crónicamente. La neutralización del complejo infeccioso, virus-anticuerpo, ocurre cuando se adicionan los tres primeros componentes del C'; pero no con el FR-IgM. Sin embargo, si se emplean concentraciones subneutralizantes de componentes del C', con la adición del FR resulta la neutralización. Parece ser que la neutralización es el resultado del recubrimiento de la superficie del virion por las anti-gammaglobulinas y el C' (81).

La cantidad de C' fijado por la adición de agregados de gran tamaño de moléculas de IgG a suero normal o suero fresco conteniendo FR se comparó con la cantidad fijada por el mismo suero pero con la adición de agregados de gammaglobulina de menor tamaño (38). Cuando se adicionó IgG en pequeños agregados el suero con altos títulos de FR fijó más complemento que el suero normal. En contraste, cuando se utilizaron agregados grandes de IgG sólo la mitad del complemento se fijó por el suero con FR, comparado con el suero normal.

### 1.3. EL FACTOR REUMATOIDE Y LA MOLÉCULA DE IGG.

En la artritis reumatoide el fenómeno inmunológico principal está mediado por una reacción antígeno-anticuerpo cuyas características y componentes, la IgG y el FR, han sido ampliamente estudiados.

De este modo, para una mejor comprensión del fenómeno y hacer un planteamiento experimental cuyo objetivo sea la determinación del sitio antigénico que presenta la molécula de IgG en su reacción con el FR, es menester revisar algunos aspectos relacionados con tales moléculas y sus interacciones.

#### A.- EL ANTICUERPO: EL FACTOR REUMATOIDE.

La clasificación del FR como un anticuerpo, está relacionada en forma confusa a la identificación del antígeno que estimuló su formación. Esto parece paradójico debido a que, si bien la naturaleza del anticuerpo del FR es ampliamente aceptada, las características estructurales de su antígeno se encuentran sujetas a muchas conjeturas. El hallazgo de Waaler (82) y Rose y cols. (83) de que el suero de pacientes con AR causaban específicamente la aglutinación de glóbulos rojos recubiertos con gammaglobulina establece primeramente que el antígeno son las gammaglobulinas. Posteriormente este concepto fué ratificado al observar que los preparados de gammaglobulina producen precipitación directa cuando se adicionaban al suero proveniente de pacientes con AR (84). Investigaciones posteriores (85-87) han enfatizado sobre la importancia de la configuración de la gammaglobulina en este sistema.

El FR puede ser de la clase IgM, IgG o IgA (88-104), y se encuentra circulando en el suero del paciente formando complejos 22S, constituidos por este anticuerpo e IgG como antígeno (12, 20, 89). Estos complejos también se encuentran en el fluido sinovial de los pacientes (9, 10) y pueden ser responsables, total o parcialmente, de la sinovitis asociada a la AR.

El FR también reacciona con IgG de otras especies de mamíferos (90). Esta característica, primeramente reconocida por Waaler (82), es la base de una técnica para la determinación del FR. La prueba, denominada de Waaler-Rose se fundamenta en la reactividad de la IgG de conejo con el FR (82, 83). Así se observa la capacidad del suero de pacientes con AR de aglutinar glóbulos rojos de carnero (GRC) sensibilizados con el amboceptor anti-GRC obtenido en conejo. Los estudios de absorción usando agregados o precipitados antígeno-anticuerpo, conteniendo IgG humana indican que la reactividad del FR con la IgG de conejo representa una reacción cruzada (90, 91, 92, 103, 104).

Se ha postulado un posible efecto benéfico del FR en el organismo; Golberg y Fudenberg (93) especulan que el FR podría tener un papel en la eliminación de complejos inmunes del suero, puesto que es innegable la capacidad que tiene el FR de unirse a ciertos complejos solubles y causar su precipitación (85). Asimismo puede combinarse con complejos infecciosos de herpes simple-anticuerpo y, el subsecuente tratamiento del complejo virus-anticuerpo-FR con C', da por resultado la pérdida de infectividad del virus (95). Por otra parte, el FR puede inhibir la fagocitosis de ciertos complejos bacteria-anticuerpo por combinación con la IgG opsónica y evitar la unión al fagocito (94), sugiriendo esto un efecto nocivo.

El FR precipita mejor si se hace reaccionar con IgG desnaturalizada o agregada, que con la IgG nativa; esta propiedad se emplea para la detección del FR al utilizar IgG agregada y/o unida a partículas (83). Aunque la reacción del FR con la IgG nativa también ha sido demostrada se ha reportado que la constante de afinidad para tal interacción es relativamente baja (96, 97). Los estudios empleando IgG tanto agregada como nativa han demostrado una clara preferencia del FR para unirse con la forma agregada (89). Sin embargo, Normansell y Stanworth (98, 99) han determinado que la afinidad del FR, estudiada por ellos, es igual para la forma agregada que para

la IgG nativa. Además, se ha demostrado por estudios recientes emple ando el Fab del FR que el sitio activo del FR no tiene preferencia por algún determinante antigénico presente en la IgG agregada, ni una mayor afinidad por ésta, sino que la misma afinidad que por la IgG nativa (102).

Con base en lo anterior, algunos investigadores sos tienen que parte de la especificidad del sitio de reacción del FR está dirigida hacia determinantes antigénicos que no son accesibles en la molécula intacta y que son revelados o incrementan su afinidad cuando la molécula de IgG es modificada en su estructura por agregación (17, 87, 106, 107). Sin embar go, tales estudios realizados con la técnica de doble difusión en gel (Ouchterlóny), no permiten observar la importante interacción polivalente antígeno-anticuerpo, la cual podría incrementar la afinidad total de la unión y favorecer la precipitación (96, 100, 101).

Se ha demostrado que el FR puede reaccionar con una o varias subclases de IgG humana (108); no obstante es claro que pueden presentarse ciertos patrones de especificidad, por ejemplo: frecuentemente se ha visto que el FR reacciona con IgG1, IgG2 e IgG4, pero no con la IgG3 (109, 110). El determinante antigénico isotípico, denominado Ga, presente en el dominio CH2 de la IgG1, IgG2 e IgG4 actúan, al parecer, determinando tal especificidad (109, 111, 113). Empero, algunos pacientes con crioglobulinemia del tipo IgG tienen anticuerpos con actividad anti-IgG3 (114). Por otro lado, ocasionalmente el FR puede reaccionar mas fuertemente con IgG de otras especies de mamíferos, como la del conejo, que con la IgG humana; esto es particularmente propio del FR denominado monoclonal (108, 115)

Además existen anticuerpos contra IgG, clasificados por algunos autores como FR, que pueden reaccionar con algún determinante alotípico de la cadena L de la IgG, con determinantes alotípicos de la porción Fc o Fd de las cadenas H, o

o con marcadores alotípicos de una subclase de IgG humana y de terminantes isotípicos de otras subclases (111). Muchos de los sueros empleados para la identificación de alotipos humanos, marcadores Gm, son de pacientes con AR (112, 116).

## B.- "EL ANTIGENO": LA MOLECULA DE IGG.

Las inmunoglobulinas representan un grupo de proteínas relacionadas estructural y funcionalmente. Básicamente consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas denominadas H [Heavy] y L [Light], respectivamente (117-119), que se encuentran unidas por medio de puentes disulfuros y fuerzas no covalentes (120-122). Se han definido cinco clases de inmunoglobulinas y pueden ser separadas del suero por medio de procedimientos físicos y químicos (123, 124).

Cada cadena, tanto H como L, tiene una zona en la región correspondiente al extremo N-terminal de casi 110 aminoácidos, la cual contiene secuencias variables y su principal función es la de interacción específica con el antígeno. El resto de la molécula, de cada cadena, forma una región de secuencias casi constantes y es ahí donde se localizan otras funciones biológicas importantes. Figura 3.

La cadena pesada [cadena H], de 450 aminoácidos, es diferente bioquímica y antigénicamente para cada una de las clases y subclases de inmunoglobulinas (125, 126). Estas diferencias forman la base para la clasificación de las inmunoglobulinas en cinco clases, y en subclases para la IgG y para la IgA (127-131). La cadena ligera [cadena L], está constituida por 213 ó 214 aminoácidos y es común para todas las clases de inmunoglobulinas, en cualquiera de sus dos variables: cadena Kappa ( $\kappa$ ) o cadena Lambda ( $\lambda$ ).

Muchas evidencias indican que la síntesis de las regiones variables y constantes de las cadenas están controladas

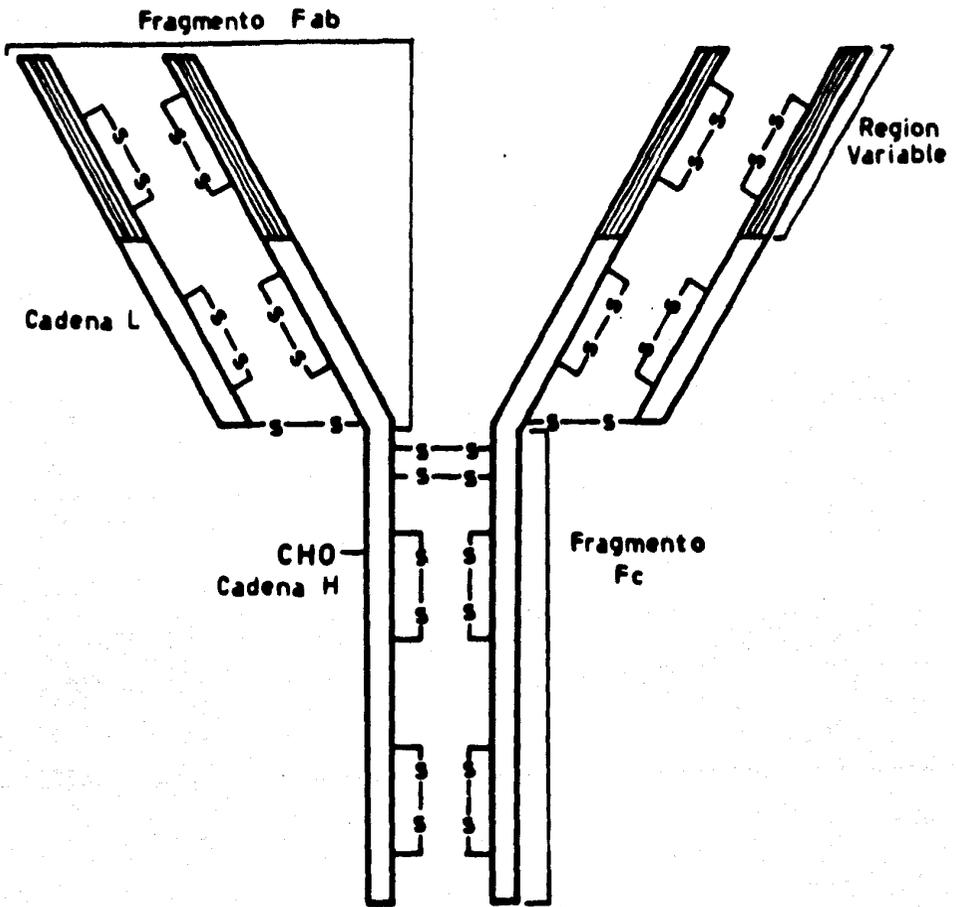


FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS CUATRO CADENAS DE LA MOLÉCULA DE IGG MOSTRANDO LOS PUENTES DI-SULFURO INTER E INTRA CADENA.

por diferentes genes; uno variable [V] y uno constante [C] (132, 133). De este modo, parecen existir tres grupos principales de genes V; aquellos para las cadenas  $\lambda$ , aquellos para las cadenas  $\kappa$ , y aquellos para todas las cadenas pesadas. Cada uno de los grupos de genes V tiene un número de subgrupos (134-137). Así, probablemente exista un conjunto de genes V que codifiquen para la región variable de la cadena H, los cuales pueden combinarse con cualquier gen C, codificante para la región constante de la misma cadena, e integrar así una cadena H completa. Un mecanismo similar es aplicado para las cadenas L.

Aunque poseen estructura muy similar, existen varias diferencias químicas entre moléculas de la misma clase y subclase; más aún, los anticuerpos purificados contra un hapteno simple [Anticuerpos monoespecíficos] constan de una población de diferentes moléculas (138). Esta heterogeneidad constituye un problema ya que, por ejemplo, no es posible purificar las proteínas de este complejo y poder así determinar su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, se producen grandes cantidades de inmunoglobulinas químicamente homogéneas por ciertas células plasmáticas tumorales [mielomas] de humanos y ratón (119). Las inmunoglobulinas, productos del mieloma, pueden ser aisladas, purificadas y secuenciadas (126).

En la IgG una cadena pesada y una cadena ligera se encuentran unidas por cuando menos un puente disulfuro y por interacciones no covalentes formando el par H-L. A su vez, dos pares H-L se unen entre sí por fuerzas no covalentes y a través de 2 o más, hasta 15, puentes disulfuros localizados en las cadenas H (139). La molécula puede ser hidrolizada por algunas enzimas proteolíticas (140-143) y producir dos tipos de fragmentos: el Fc [Fragmento cristalizante] y el Fab [Fragment antigen binding].

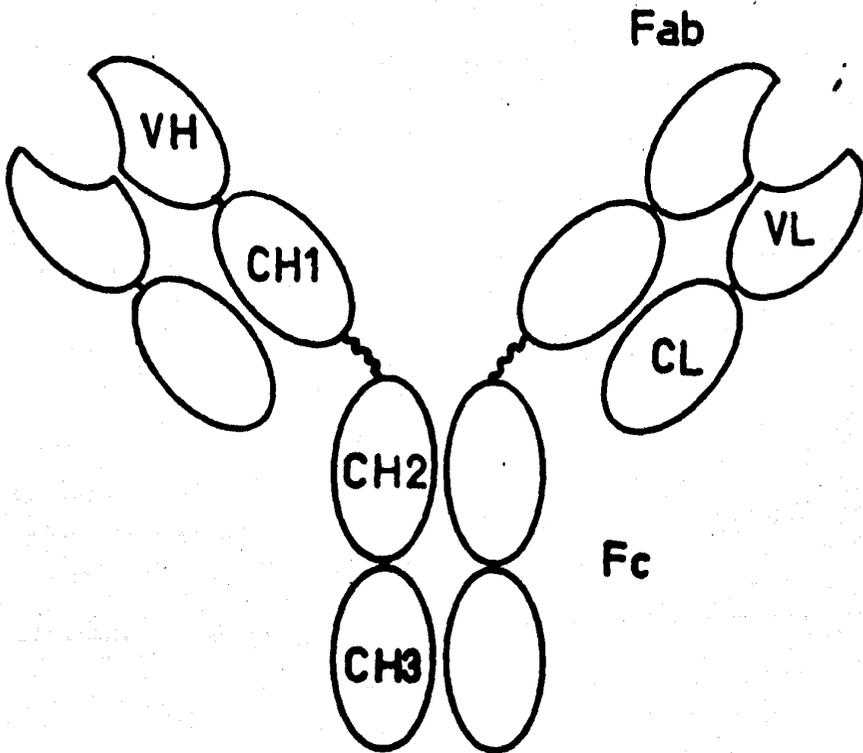
El fragmento Fab, como su nombre lo indica, contiene el sitio de unión al antígeno (142) y consiste en la cadena L completa y la mitad amino-terminal de la cadena H [porción Fd]. El fragmento Fc, el cual es un dímero constituido por las mitades carboxi-terminal de las cadenas H, es el mediador de otras propiedades biológicas de la molécula de anticuerpo (144-148).

Como se puede observar en la figura 3, las moléculas de inmunoglobulina contienen carbohidratos, en cantidades que varían de una clase a otra (149). La IgG contiene aproximadamente 3% de carbohidratos en forma de un oligosacárido, localizado en la región Fc, probablemente unido al grupo  $\beta$ -carboxil del ácido aspártico [residuo 290] (150). Se han aislado glucopéptidos con secuencia similar a partir de la IgG de otras especies de mamíferos (151, 152).

Algunos experimentos han demostrado que el oligosacárido se acopla a la molécula de IgG en el aparato de Golgi, después de la síntesis y el ensamble de las cadenas polipeptídicas; pero antes de que la molécula sea secretada por la célula (153-155). De este modo se considera que la parte glucosídica puede ser necesaria para la secreción de la molécula, pero no hay evidencias de que los carbohidratos jueguen algún papel en la especificidad del anticuerpo.

Por otro lado, Edelman y cols. (126, 156, 157) al determinar la secuencia de aminoácidos de una molécula de IgG proveniente de un mieloma, observaron cierta periodicidad lo que les permitió proponer que la molécula posee zonas llamadas "Dominios", los cuales poseen estructura terciaria propia con características globulares. Así se determina que para la IgG existen tres dominios constantes en la cadena H [CH1, CH2, CH3], uno constante en la cadena L [CL], uno variable en la cadena H [VH] y otro variable en la cadena L [VL]. La figura 4 esquematiza este concepto.

La IgG constituye del 60 al 70% de las inmunoglobulinas presentes en el suero. Dentro de este, el porcentaje de composición con respecto a las subclases es: IgG1, 61±8; IgG2, 23±8; IgG3, 7±4; IgG4, 4±2.5 (158). Las cuatro subclases fueron inicialmente definidas por métodos inmunológicos (127, 128). Así se estableció que, independientemente de la gran antigenicidad cruzada, cada subclase tiene, cuando menos, dos determinantes antigénicos propios localizados en dos o tres de los do



**FIGURA 4. EL MODELO DE DOMINIOS COMPACTOS DE LA IGG. CADA ELIPSE REPRESENTA UNA CADENA POLIPEPTIDICA COMPACTA DE APROXIMADAMENTE 11,000 DALTONES DE PESO MOLECULAR Y CONTIENE UN PUENTE DISULFURO INTRACADENA.**

minios CH (159, 160). Ciertos determinantes subclase-específicos están localizados en el fragmento Fab [dominio CH1], y otros determinantes son compartidos por dos o tres subclases, pero no por las cuatro (109, 110, 161).

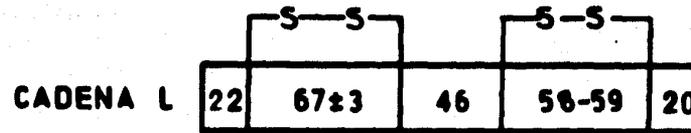
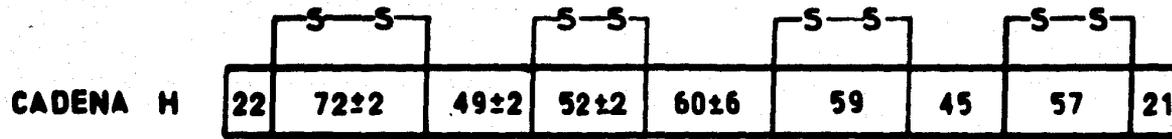
En las diferentes subclases de IgG hay un puente disulfuro que une la cadena H a la cadena L, en la cisteína C-terminal de la cadena  $\kappa$  o en el penúltimo residuo de la cadena  $\lambda$ , el cual también es una cisteína (162). En la cadena H, el puente disulfuro H-L, se localiza en la región de la bisagra [posición 220] para la IgG1, mientras que para las otras subclases, la parte cisteínica corresponde a la posición 131 (126, 163-166). La cristalografía de rayos X indica que los residuos 130 y 220 se encuentran muy próximos debido a la conformación propia del dominio (167-171). Para las otras clases de inmunoglobulinas humanas y la IgG de conejo el puente disulfuro H-L tiene su origen en posiciones similares (152, 166, 172).

Todos los puentes disulfuros, entre las cadenas pesadas, están localizados en la región de la bisagra; sin embargo hay marcada variabilidad respecto al número de tales puentes, entre las subclases (126, 171-174). Existen dos puentes disulfuros H-H en la IgG1 y en la IgG4, y cuatro en la IgG2. Mientras que para la IgG3 las primeras evidencias señalaban la presencia de cinco puentes (171), Michaelsen (175) reporta la existencia de quince puentes disulfuros todos localizados en, o muy cerca de, la región de la bisagra.

El peso molecular de la cadena H de la IgG3 [ $\gamma$ 3] es de 60 000 (176, 177), esto es aproximadamente 10 000 daltones más alto que la cadena H de la IgG1 [ $\gamma$ 1] lo que sugiere la presencia de 91 residuos adicionales en la cadena  $\gamma$ 3, ya que no existe diferencias en el contenido de carbohidratos. Al comparar el tamaño molecular de los productos de digestión con papaína y pepsina, Damacco y cols. (177) proponen que los residuos adicionales de la IgG3 están presentes en forma extendida en la región de la bisagra.

Los puentes disulfuro intracadena en cada una de las cadenas H son similares en su disposición lineal a aquellos en las cadenas L. La presencia de un puente disulfuro por cada 110 ó 120 aminoácidos dá la primera sugerencia que existe homología interna en la secuencia de la cadena polipeptídica (178). Esto fué posteriormente demostrado por una comparación de las secuencias parciales en las dos mitades del fragmento Fc de la IgG de conejo (179), el cual tiene dos dominios CH2 y CH3 y el grado de homología secuencial que presentan éstos es de casi un 30%. Además existen muchas posiciones en las cuales se encuentran presentes grupos químicos similares en los dos segmentos, por ejemplo: isoleucina y valina.

Una comparación de los tres fragmento CH de la cadena H humana indica que en la secuencia de 100 residuos, cualquier par de dominios son idénticos respecto a 29-34 residuos (157). Los análisis estadísticos muestran que este grado de homología es altamente significativo. Por lo contrario, la comparación de VL o de VH con CH indica un promedio de homología cercano al 15%. Esto aunado a la similitud de tamaño, composición de aminoácidos y la estructura apoyada por puentes disulfuros sugiere un antecedente evolutivo común, pero una temprana divergencia de los genes controladores de las regiones V y C. Cuando la secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas o diferentes dominios de una cadena polipeptídica son comparadas, los residuos de cisteína se encuentran en la misma posición. Por lo tanto, el número de aminoácidos que se encuentran formando un puente disulfuro intracadena es una evidencia de homología. Esto se esquematiza en la figura 5 donde además se muestra la distancia entre cada puente (180). Tomando como referencia los puentes disulfuro intracadena, se aprecia una mayor distancia entre los dominios CH1 y CH2 que la que existe entre CH2 y CH3. Estos 10 a 15 aminoácidos extras se encuentran localizados en la región de la bisagra; en la IgG1 comprende los residuos 221 a 233. Esta región muestra considerable diversidad de secuencia cuando son comparadas dos cadenas H de diferentes clases o subclases, y es la región en la cual se situán



**FIGURA 5. VARIACIÓN EN TAMAÑO DE LAS PSEUDOUNIDADES ESTRUCTURALES DE LAS CADENAS H Y L DE LA IGG HUMANA. (180).**

muchos puentes disulfuros entre cadenas pesadas; y en la IgG1 está el residuo de cisteína por la cual la cadena H se une a la cadena L. Al parecer, la flexibilidad de esta región es la responsable de la movilidad del fragmento Fab. Las secuencias de la bisagra de la IgG de conejo y de las cuatro subclases de IgG humana se representan en la figura 6.

Al igual que los residuos de cisteína, los de prolina se encuentran con elevada frecuencia en la región de la bisagra de las cadenas  $\gamma$  humanas y del conejo. Por ejemplo, la cadena  $\gamma 1$  tiene cinco residuos de prolina entre las posiciones 211 y 234. Respecto a ésto, Welscher (181) propone que la prolina le dá rigidez a un segmento de la región flexible de la bisagra, evitando así que las secuencias adyacentes se doblen de tal manera que hagan contacto con la región de la bisagra y de este modo queda expuesta siendo la zona mas susceptible a la proteólisis.

La figura 7 indica la secuencia conocida de aminoácidos de la región C, de las cuatro subclases de la IgG humana y de la IgG de conejo. Las secuencias que se muestran, con excepción de la de conejo, son proteínas de mieloma. El sistema de numeración empleado es el propuesto por Edelman y cols. (182), quienes fueron los primeros en reportar la secuencia completa de la cadena H, en una proteína de mieloma denominada Eu.

Una comparación de las secuencias, en la figuras 6 y 7, indica que existe una homología extensa entre éstas, en las regiones CH de las cuatro subclases de IgG humana y la IgG de conejo. Pink y cols. (183) comparan la secuencia completa del segmento Fc de la IgG1 e IgG4 y la IgG de conejo y encuentran que, con las supresiones apropiadas, el grado de homología entre la IgG4 y la IgG de conejo es de 68%. Entre la IgG1 y la IgG de conejo existe 69% de homología (184). Entre la IgG1 y la IgG4 hay únicamente 14 diferencias entre los 220 aminoácidos conocidos (94% de homología); las subclases IgG2 e IgG3 muestran una homología comparable entre sí, así como con IgG1 e IgG4 (168, 174, 185).

CADENA PESADA	209					215						220				
HUMANA gamma 1	TRE	LIS	VAL	ASP	LIS	ARG LIS	VAL	GLU	PRO	LIS	SER	CIS	ASP	LIS	TRE	HIS
gamma 2	_____					TRE	_____			ARG	_____	CIS	_____			
gamma 3	(CIS	TRE	PRO	HIS)	ARG	CIS	PRO	_____					TRE	PRO	PRO	
gamma 4	_____					ARG	_____	SER	_____			TIR	GLI	_____		
CONEJO	_____					TRE	_____	ALA	_____	SER	TRE	_____	SER	_____	PRO	_____
		225				230					235				240	
HUMANA gamma 1	TRE	CIS	PRO	PRO	CIS	PRO	ALA	PRO	GLU	LEU	LEU	GLI	GLI	PRO	SER	VAL
gamma 2	GLU	_____							PRO	VAL	ALA	_____				
gamma 3	PRO	_____				ARG	_____									
gamma 4	PRO	_____							SER	_____	FEN	_____				
CONEJO	TRE	_____														
		MET	_____													

FIGURA 6. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS EN LA REGIÓN DE LA BISAGRA DE LAS CADENAS DE GAMMA GLOBULINA HUMANA Y DE CONEJO. LA LÍNEA CONTÍNUA REPRESENTA IDENTIDA DE SECUENCIA.

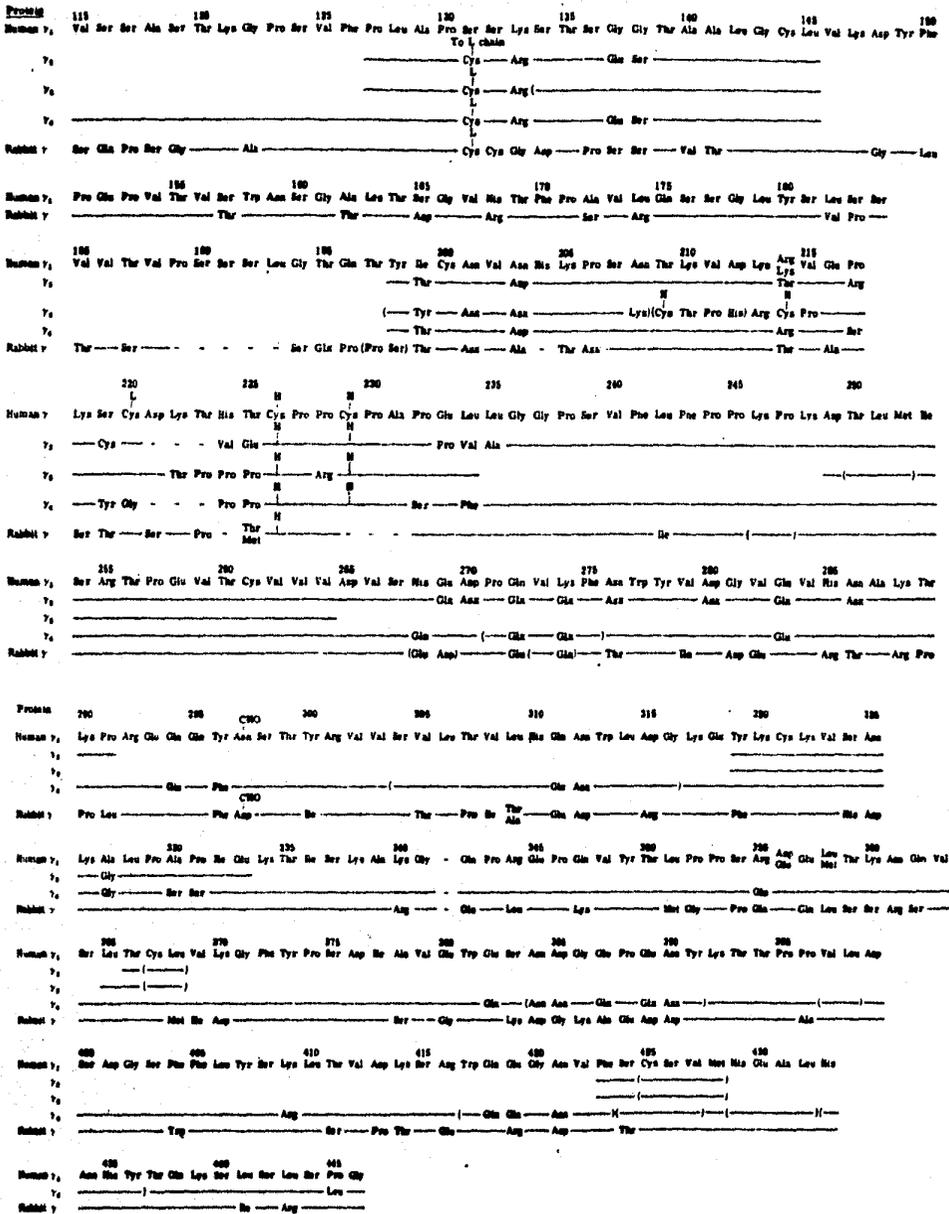


FIGURA 7. SÉCUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS REGIONES CONSTANTES DE LAS CADENAS GAMMA HUMANAS Y DE CONEJO.

Sin embargo, las grandes similitudes entre las subclases de IgG no pueden ser aplicadas a la región de la bisagra. El grado de homología entre dos subclases cualesquiera al nivel de los residuos 208 al 237 es de 60-70%, mientras que el resto del segmento Fc muestra valores de mas del 90%. Debido a esto, se ha sugerido que las mutaciones pueden ocurrir con mayor frecuencia en la región de la bisagra, que en cualquier otra parte del fragmento Fc (186). Las mutaciones en la región de la bisagra pueden ser toleradas por el individuo, ya que esta región no posee función biológica efectora; por ejemplo, fijación de complemento, y además, es probable que no interactúe con otros segmentos de la cadena.

La estrecha relación entre las secuencias de las cadenas H, de las cuatro subclases de IgG, sugiere que su divergencia evolutiva es un evento relativamente reciente, en comparación con la divergencia que presenta la IgG con la IgM, el cual sólo representa una homología, en los segmentos CH, del 33%. El hecho de que la IgG de conejo esté mas relacionada con la IgG humana, que ésta última con la IgM humana, indica que la divergencia de IgM a IgG es un evento antiguo (187).

Por otro lado, existe una estrecha semejanza entre la estructura tridimensional de las cadenas polipeptídicas de cada dominio. Los dominios VL y VH se encuentran en íntimo contacto, así como los dominios CL y CH1. El término "módulo" se puede emplear para describir éstos pares de dominios. Edelman y Gall (156, 157) proponen que cada dominio tiene su propia función biológica. La principal función del par de dominios V o del módulo V, aparentemente es la especificidad del anticuerpo. En cambio, se ha sugerido que el módulo que comprende los dominios CL y CH1 puede dar estabilidad al sitio de combinación del anticuerpo (156).

Existen evidencias que el módulo que comprende el par de dominios CH2 de la IgG [la porción N-terminal del Fc] está involucrada en la fijación de complemento. Mientras que Fab o F(ab)<sub>2</sub> no fijan C' a través de la vía clásica, los fragmentos

Fc agregados tienen esta capacidad. Sin embargo, un fragmento de la IgG de conejo, denominado Facb, al cual le falta únicamente el dominio CH3 es capaz de llevar a cabo la fijación de C' (188). Esto indica que la capacidad de fijar complemento se encuentra localizada en el dominio CH2. Kehoe y Fougereau (189), encuentran que un fragmento del dominio CH2 de la proteína de mieloma IgG2 de ratón, preparado con bromuro de cianógeno y que comprende casi 60 residuos de aminoácidos, es capaz de fijar C' cuando esta adsorvido en partículas de látex. Un fragmento parecido a un dímero de CH2, aislado de proteína de mieloma IgG humana, presenta la propiedad de fijar complemento (190); la obtención de éste se llevo a cabo por la exposición del fragmento Fc a pH de 2.5 seguida por una digestión con tripsina, por menos de un minuto a pH neutro. El fragmento CH3 no posee la propiedad de fijar C', sin embargo las propiedades de este segmento, sugiere que CH3 es el responsable de la actividad citoflica de la IgG humana hacia el macrófago (191). El dímero CH3, a diferencia del dímero CH2, inhibe la unión de eritrocitos de carnero recubiertos con IgG1 a macrófagos de cobayo, al igual que el fragmento Fc y la molécula completa de IgG; pero no así el fragmento Fab.

Se han localizado otras funciones efectoras en el fragmento Fc, aunque no definitivamente en un dominio, incluyen la capacidad de atravesar por la placenta, la fijación a la piel de cobayo, el control del catabolismo y la fijación a células cebadas o leucocitos basófilos como en el caso de la IgE (192).

En base a mediciones de depuración se ha determinado la vida media de las moléculas de IgG (193). Esta velocidad de catabolismo no está relacionada con el tipo de cadena L, el tipo de marcador genético, el contenido de carbohidratos, ni con la carga neta de la proteína (194); sin embargo parece estar relacionada con la longitud de la región de la bisagra la cual es el sitio principal de ataque proteolítico. Así, la IgG3 tiene una vida media relativamente corta debido posiblemente a que tiene la región de la bisagra mas larga que las otras subclases y mayor tendencia a la agregación (195).

Las enzimas papaína y pepsina han sido muy utilizadas en estudios de la estructura de la IgG humana. Cuando la IgG normal, en cualquiera de sus subclases se trata con papaína se liberan los fragmentos Fab y Fc (196). Los fragmentos Fc, obtenidos por la digestión de la IgG completa, son cristalizados con dificultad (197); pero aquellos obtenidos a partir de proteínas de mieloma son cristalizados fácilmente (198). Después de una corta digestión de IgG normal con papaína se pueden encontrar cristales, los cuales provienen del Fc de la IgG1, ya que ésta es fácilmente digerida y está presente en mayor concentración en el suero normal (199).

Se ha establecido que existen marcadas diferencias entre las subclases de IgG, respecto a sus velocidades de proteólisis. Por lo tanto, la medición de tales velocidades puede ayudar a la identificación de la subclase a la cual pertenece una proteína de mieloma (186, 200-204). Las proteínas de mieloma de IgG3, y muchos mielomas de IgG1, son muy susceptibles a la digestión con papaína, aún en ausencia de cisteína. Sin embargo, algunas proteínas de la clase IgG1, requieren la presencia de cisteína 0.01M durante la digestión. Las proteínas de IgG2 son resistentes a la digestión aún en presencia de cisteína 0.01M, por lo que concentraciones altas de este agente reductor se requieren para tales procesos de proteólisis. Por otra parte, las distintas subclases de IgG presentan diferentes velocidades relativas de digestión con papaína y pepsina (202, 205). La IgG1, que es susceptible a la papaína, es la más resistente de las subclases a la digestión por pepsina; la IgG3 y la IgG4 son muy susceptibles a la pepsina, frente a la cual la IgG2 es completamente resistente. Sin embargo, es posible obtener los fragmentos, a partir de cualquier subclase, si las condiciones de digestión son apropiadas (202).

La papaína hidroliza selectivamente a la IgG1 en el enlace peptídico N-terminal del residuo cisteínico 226 o entre la histidina 224 y la treonina 225. La cisteína 226 participa en un puente disulfuro intercadena pesada (163). La IgG2 es hi-

drolizada inicialmente entre los residuos 230 y 231 [Pro-Ala] y posteriormente en una posición indeterminada en la región de la bisagra, con la producción de Fab (186, 204). En la IgG3, la proteólisis por papaína ocurre justamente en la cisteína N-terminal 219, la cual forma un puente disulfuro intercadena pesada (166), mientras tanto, el puente disulfuro H-H en el residuo Cis 214 es roto probablemente por el agente reductor presente, resultando la liberación del fragmento Fab.

Por la digestión de proteínas de mieloma IgG1 e IgG4 con papaína, se pueden obtener cantidades significantes de fragmento  $F(ab)_2$ , si las condiciones son seleccionadas cuidadosamente (206). La digestión débil de IgG normal sin cisteína libera un producto interesante el cual comprende un fragmento Fab unido al fragmento Fc; esto es producido por la ruptura de una cadena H antes que la otra (207) y se logra principalmente a partir de IgG1. Se ha obtenido un producto similar por la digestión controlada con papaína de la IgG de conejo (208, 209).

La pepsina a pH de 4 rompe selectivamente a la IgG1 humana y a la IgG de conejo en posiciones homólogas, entre los dos residuos de lisina en las posiciones 234 y 235 (162, 210). El sitio exacto de ruptura en las otras subclases de IgG humana es incierto, y se produce el fragmento  $F(ab)_2$ .

Aunque la digestión peptídica no produce un fragmento Fc intacto, debido a la degradación del dominio CH2, se puede aislar un subfragmento denominado pFc' (211, 212). El fragmento pFc', el cual corresponde a un dímero del dominio CH3 y con un peso molecular de 25 000, se puede obtener a partir de cualquiera de las cuatro subclases (202, 205). En la IgG cada segmento del dímero comprende desde el residuo 335 ó 336 hasta el extremo C-terminal (213). El fragmento pFc' es comparado con un producto de la digestión de la IgG de conejo; un segmento C-terminal, denominado Pep III, que se libera de la región Fc por digestión peptídica (214).

La tripsina ha sido menos utilizada que la papaína para la digestión enzimática de la inmunoglobulina, aunque el efecto de ambas enzimas, sobre la molécula de IgG es muy similar. Los primeros estudios mostraron que la tripsina es capaz de hidrolizar preparaciones de gammaglobulina (215, 216); pero la caracterización de los productos fué efectuada posteriormente (217, 218) encontrando que, durante la digestión de IgG por tripsina, se producen fragmentos muy similares a los Fc y Fab producidos por la papaína. El sitio del ataque por tripsina en la proteína de mieloma Eu, la cual pertenece a la subclase IgG1, fué identificado por Edelman y cols. (219) y los principales productos proteolíticos fueron designados como Fab(t) y Fc(t) con el fin de distinguirlos de aquellos producidos por la digestión con papaína.

Al igual que las anteriores, la tripsina presenta la capacidad de hidrolizar a la IgG humana en la región de la bisagra y en la IgG rompe específicamente en el residuo Lis 222, liberando un fragmento Fab(t) (220). Sin embargo, la IgG de conejo es resistente a la tripsina bajo condiciones no desnaturizantes, posiblemente debido a que la Lis 222 en la proteína de conejo, se encuentra unida a una prolina, la cual reduce la susceptibilidad a la enzima; pero se pueden producir fragmentos Fab a partir de la IgG de conejo por digestión con tripsina, si la cisteína 220 primero se reduce y se trata con etilenimina para su conversión a aminoetilcisteína, lo cual facilita el ataque por esta proteasa (210).

Además del fragmento Fc en la digestión de la IgG humana con papaína, se encuentran concentraciones pequeñas de un subfragmento denominado Fc' (212, 221-226). Este fragmento también puede prepararse por una digestión posterior del fragmento Fc o del pFc' con papaína (222, 224). De este modo, el fragmento Fc' es más pequeño que el fragmento pFc'. En la IgG1 es un dímero de residuos que se extiende de la posición 342 a la 432 (213), por lo que comprende un segmento de los dos dominios CH3.

Por la digestión de IgG de conejo con papaína a pH de 4.5 se obtiene un fragmento que ha sido designado como stFc por Utsumi (227). Este fragmento tiene un peso molecular de 25 000 y contiene únicamente los determinantes antigénicos C-terminal de la molécula y de este modo, se asemeja a los fragmentos Fc' y pFc' que se obtienen de la IgG humana.

## SECCION 2. TRABAJO EXPERIMENTAL.

### 2.1. PLANTEAMIENTO.

En estudios previos se ha localizado al determinante antigénico que presenta la molécula de IgG en su reacción con el FR en el fragmento Fc, y específicamente en el dominio CH2. Sin embargo, este dominio posee aproximadamente 110 aminoácidos y como es sabido un determinante antigénico no es tan grande.

Las evidencias que permiten afirmar que el FR reacciona con una estructura de CH2 están dadas por: a) El complemento se fija en CH2; pero cuando se fija FR a la molécula de IgG, le quita a ésta la capacidad de fijar C'. Por otro lado, si primero se fija C', este impide la reacción de la IgG con el FR. b) Ambos sistemas, el FR y C', necesitan que se efectúe un cambio conformacional en la molécula de IgG, para su reacción con ésta. Este cambio conformacional puede presentarse cuando la IgG, como anticuerpo, reacciona con el antígeno, donde la región de la bisagra y el dominio CH2 participan estabilizando la unión, o bien cuando la molécula de IgG es agregada por calentamiento.

Con base en lo anterior, lo que se pretende en este trabajo es determinar la existencia de una estructura antigénica específica que reaccione con el FR. Las estructuras a probar corresponden a oligopéptidos del dominio CH2 obtenidas por digestión de IgG humana con pepsina. Se determinará la actividad biológica de los fragmentos obtenidos por la capacidad de inhibir la hemaglutinación en el sistema Waaler-Rose.

El conocimiento de la estructura antigénica involucrada podría explicar el origen del padecimiento y así dar una alternativa en el tratamiento de la artritis reumatoide.

## 2.2. MATERIALES Y METODOS.

### A. OBTENCION DE LA IGG.

**PRECIPITACION CON SALES NEUTRAS.** Se utilizó suero humano total, al que se le adicionó sulfato de amonio al 33% de saturación (228). La suspensión se centrifugó a 4 000 rpm durante 20 minutos; el precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de solución salina 0.15 M y se repitió dos veces todo el proceso. Esta suspensión proteica se dializó contra cloruro de sodio 0.15 M hasta que la reacción para sulfatos, empleando cloruro de bario, fué negativa.

**CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO.** Esencialmente se siguió el método reportado por Fahley (229). La solución de gammaglobulinas se equilibró por diálisis con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM [pH=8] y se aplicó a una columna de 2.6 por 65 cm., empacada con DEAE-Celulosa [Merck] y calibrada con amortiguador de fosfatos 0.01M y con un pH de 8. Se aplicó un gradiente de elusión con molaridad creciente, manteniendo el pH constante, en un volumen de elusión total de 900 ml. Para esto, 600 ml del amortiguador inicial se colocaron en una cámara mezcladora y se conectó mediante un sifón a un matraz que contenía 300 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.20 M y pH de 8. Se igualaron los niveles y la mezcla se llevó a cabo mediante un agitador magnético. El gradiente lineal se logró manteniendo un flujo, de la cámara mezcladora a la columna [R2] de 80 ml/h; mientras que el flujo de la solución concentrada a dicha cámara [R1] era de 40 ml/h; es decir  $R2=2R1$ . De este modo la concentración del gradiente a la que se eluye cada pico se determinó según la ecuación [1]:

$$C_t = C_f \left( 1 - \left( \frac{V_0 - tF}{V_0} \right) \right) + C_i \quad \text{Ecuación [1]}$$

donde: Ci = Concentración del amortiguador inicial.  
Cf = Concentración del amortiguador final.  
Ct = Concentración a un tiempo dado.  
t = Tiempo.  
F = R2-R1  
Vo = Volúmen inicial en la cámara mezcladora.

La ecuación [1] es una modificación de la planteada previamente por Lakshmanan y Lieberman (230):

$$C_t = C_f \left( 1 - \left( \frac{V_t}{V_o} \right)^{\frac{R_1}{R_2 - R_1}} \right)$$

donde Vt= volúmen existente en la cámara mezcladora en un tiempo dado.

Se colectaron fracciones de 4.0 ml y a cada una se les midió su densidad óptica [D.O.] a 280 nm.

**INMUNOELECTROFORESIS.** La IgG obtenida se analizó por inmunolectroforesis para verificar su pureza. Se prepararon placas de 8x8x0.1 cm de agarosa al 1% [Gibco Co.] en solución amortiguadora de veronal, con fuerza iónica de 0.05. Esta solución se empleó también para equilibrar por diálisis la muestra y en el corrimiento de la placa. Se aplicaron muestra de 0.1 ml, con teniendo 2 mg de proteína por mililitro. La placa se corrió durante 5 horas a 100 volts y 15 mA. Se aplicaron los anticuerpos y se dejaron difundir durante 24 horas a 4°C y en cámara húmeda. Las placas se lavaron con solución salina 0.85% y se tificaron con amido negro al 1%, en ácido acético al 3%, durante 20 minutos. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados con ácido acético al 3%.

Los sueros: anti-IgG y anti-humano polivalente, así como la IgG que se empleó como referencia se obtuvieron de fuente comercial [Behring Institut].

## B. OBTENCIÓN DE LOS PÉPTIDOS DE IGG.

**DIGESTIÓN ENZIMÁTICA.** La solución de IgG se sometió a proteólisis enzimática según el método descrito por Nisonoff (231) para esto, la solución proteica se ajustó a una concentración de 10 mg/ml y se equilibró con amortiguador de acetatos 0.1 M y pH de 4.5. La pepsina 1:10 000, con una actividad de 1200-2000 unidades por mg [Sigma Chem. Co.], se disolvió en una pequeña cantidad de la misma solución amortiguadora de acetatos y ambas soluciones se mezclaron en una relación enzima:sustrato 1:100 [p/p]. La mezcla se incubó en baño de agua a 37°C, con agitación suave durante 24 horas. La digestión se suspendió por adición de Tris [Trishidroximetil-amino-metano] sólido, hasta alcanzar un pH de 8.

**SEPARACIÓN DE LOS PÉPTIDOS.** Para separar los productos de la digestión enzimática, se siguió el procedimiento descrito por Natvig y cols. (226). Para esto, la solución obtenida en el paso anterior se filtró por una columna de Sephadex G-150-120 [Sigma Chem. Co.], calibrada con solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M, adicionada con NaCl 0.2M y EDTA 2mM, con un pH de 7.7, la cual se pasó con un flujo de 15 ml/h. Se colectaron fracciones de 3 ml y a cada una se les determinó su D.O. a 280 nm.

**DESALINIZACIÓN.** Para desalinizar los oligopéptidos, se aplicó la muestra concentrada por liofilización, en una columna de 1.6 x 85 cm, empacada con Sephadex G-10-120 [Sigma Chem. Co.] calibrada con agua destilada. La muestra se eluyó también con agua y se colectaron fracciones de 3 ml, a las cuales se les de terminó su D.O. a 214 nm. Los oligopéptidos desalinizados fueron concentrados por liofilización y disueltos en solución amortigua dora de fosfatos, pH=7.2, para su uso en las reacciones de hemaglutinación.

### C. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL FACTOR REUMATOIDE.

**HEMAGLUTINACIÓN.** Para la detección del FR se utilizó la técnica de hemaglutinación de Waaler-Rose (82, 83), empleando placas de microtitulación y volúmenes de 25  $\mu$ l.

**FACTOR REUMATOIDE.** Se emplearon sueros de pacientes con artritis reumatoide clínicamente demostrada y con la prueba de látex positiva (232). Los sueros fueron absorbidos previamente con GRC para evitar hemaglutinación no específica y descomplementados por calentamiento a 56°C durante 20 minutos.

**SENSIBILIZACIÓN DE LOS GRC.** El suero anti-glóbulos rojos de carnero [anti-GRC] se obtuvo en conejos Nueva Zelanda, mediante la inoculación intravenosa de 1 ml de GRC al 10, 20, 30 y 40% en forma progresiva y una dosis por semana respectivamente. El suero hiperinmune se obtuvo al término de la sexta semana y el título se determinó por hemaglutinación en placas de microtitulación. Los GRC sensibilizados se prepararon incubando los eritrocitos de carnero con suero anti-GRC en dosis subaglutinante, durante 6 horas a 37°C; después se lavaron cinco veces centrifugando a 900 g durante 8 minutos. Finalmente se resuspendieron en PBS ajustándolos a una concentración del 1%. La dosis subaglutinante fue una dilución 1:3 del título (233).

**INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN.** La IgG agregada, utilizada como inhibidor, se preparó por desnaturalización con calor como lo indican Henney e Ishizaka (234): 20 mg de IgG se disolvieron en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.02M pH de 8 y se incubó a 63°C durante 30 minutos. El material no agregado se eliminó pasando la solución por una columna de 27 x 0.7 cm conteniendo Sephadex G-200, empleando como eluyente PBS, pH de 7.2, y con un flujo de 2.4 ml/h. Las fracciones conteniendo oligómeros se concentró hasta 20 mg/ml.

Cada uno de los fragmentos obtenidos de la IgG se ajustaron a una concentración de 12 mg/ml en PBS. La concentración

de proteína se determinó según el método de Lowry (235), empleando el reactivo de Folin, e IgG humana como patrón.

Se prepararon diluciones seriadas 1:2 en las dos direcciones de las placas de microtitulación. En todos y cada uno de los pozos de la fila A se colocaron 25  $\mu$ l del inhibidor o cada uno de los fragmentos de IgG a probar y se diluyeron hasta la línea G; la línea H se empleó como control negativo de inhibición. En el pozo 1 de cada línea se colocaron 25  $\mu$ l del suero conteniendo FR y se diluyó hasta el pozo número 11; el pozo número 12 sirvió como control negativo del suero. Se incubó la placa a 4°C durante 20-24 horas, se les agregó a cada pozo 25  $\mu$ l de la suspensión de GRC sensibilizados y se continuó la incubación a la misma temperatura 12 horas mas.

### 2.3. RESULTADOS.

La figura 8 muestra el perfil cromatográfico de elusión de gammaglobulinas en la columna de DEAE-Celulosa. En esta gráfica se pueden observar varios picos, correspondiendo el primero a IgG según algunos autores (236-238) ya que se eluye a una concentración de fosfatos comprendida entre 0.015 y 0.025M. Para comprobar lo anterior, a esta fracción se le determinó identidad y pureza por inmunoelectroforesis en agarosa. A diferencia de la IgG obtenida comercialmente, nuestra IgG revela única mente una banda de precipitación cuando reacciona con anti-IgG o contra suero anti-humano polivalente, como se observa en la figura 9.

La IgG así obtenida se sometió a digestión enzimática empleando pepsina. Los productos se separaron por filtración en una columna de Sephadex G-150-120 y el perfil cromatográfico es presentado en la figura 10. El primer pico corresponde al fragmento  $F(ab)_2$ , el segundo al  $pFc'$  y el tercero a oligopéptidos del dominio CH2, según lo reportado previamente (239). Debido a que estos fragmentos se encuentran disueltos en Tris-HCl 0.1M con 0.2M de NaCl, y para su empleo en hemaglutinación se requiere que estén disueltos en PBS con pH de 7.2, es necesario el cambio de amortiguador. Para los dos primeros picos,  $F(ab)_2$  y  $pFc'$ , el cambio de amortiguador se llevó a cabo por diálisis. Los oligopéptidos de bajo peso molecular se desalinizaron por cromatografía en Sephadex G-10 [figura 11], luego se liofilizaron y finalmente se resuspendieron en PBS. Es preciso hacer notar que el pico correspondiente a los oligopéptidos presentaron un bajo coeficiente de extinción cuando se leyeron a 280 nm. Por esta razón se consideró pertinente elaborar un espectro de absorción, para este fragmento, entre 200 y 300 nm. Como se observa en la figura 12, la muestra presenta máximos a 214, 224 y 280, siendo el de 214 el de mayor coeficiente de extinción. Por este motivo en los pasos posteriores la detección de los oligopéptidos se realizó a 214 nm.

Por otro lado, en el proceso de desalinización de los oligopéptidos en la columna de Sephadex G-10 se logró además, la separación de cuatro picos los cuales se denominaron como: I, II, III y IV respectivamente, de acuerdo a su orden de aparición. Los cuatro picos, en forma separada, se desecaron por liofilización y posteriormente se resuspendieron en PBS, hasta lograr una concentración de 12 mg/ml. Además se preparó una mezcla de volúmenes iguales de los cuatro picos, la cual se le llamó CH2 fragmentado.

Ya ha sido demostrado que la IgG agregada por calor es un inhibidor de la reacción del FR (103, 234); por lo que se preparó tal inhibidor por calentamiento de una solución de IgG. Para verificar la agregación se pasó la solución por una columna de Sephadex G-200 y se detectó la presencia de una fracción excluida, como se aprecia en la figura 13. Como es sabido, la IgG con un peso molecular de 160 000 daltones, es incluida en este gel; de esta manera, la exclusión indicó la formación de polímeros.

Para obtener la dosis inhibitoria en el control positivo, se preparó una curva de inhibición con la IgG agregada. Partiendo de una solución de 20 mg/ml, se hicieron diluciones para determinar el porcentaje de inhibición a diferentes dosis. Esto está definido como:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{\text{título con inhibidor}}{\text{título sin inhibidor}} \times 100$$

Los resultados obtenidos en la inhibición de la hemaglutinación de GRC sensibilizados, con suero FR positivo en presencia de IgG agregada, a diferentes dosis, se presentan en la figura 14.

Los sueros que fueron empleados para probar la actividad inhibitoria de los fragmentos obtenidos de la IgG fueron: 8 pacientes adultos, 7 pacientes infantiles y una mezcla de sueros de 30 pacientes adultos. Todos con AR demostrada clínicamente y con la prueba de látex positiva.

Cuando los diversos fragmentos obtenidos de la digestión enzimática de la IgG fueron probados como agentes inhibidores de la reacción de la IgG con el FR, no se encontró efecto alguno, mientras que la IgG agregada presentó la esperada inhibición. Los resultados se muestran en la tabla 2. Aunque para cada fragmento y cada suero se preparó una curva de inhibición, partiendo de una concentración de 12 mg/ml y haciendo diluciones seriadas, en la tabla 2 solamente se menciona la dosis máxima probada.

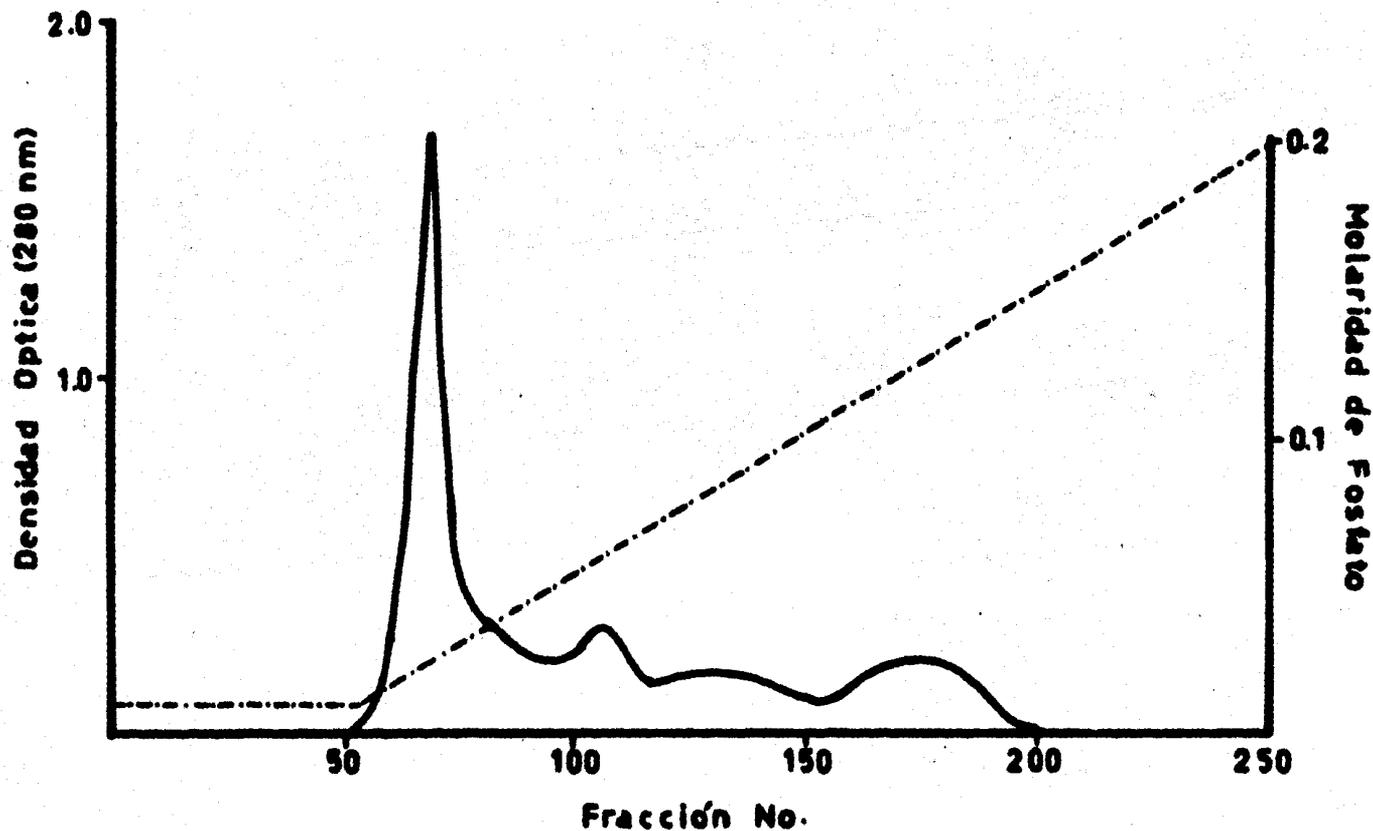


FIGURA 8. PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTENIDO DE LA ELUSIÓN DE 300 MG DE GAMMAGLOBULINAS PRECIPITADAS CON SULFATO DE AMONIO, EN UNA COLUMNA DE 2.6 x 50 CM EMPACADA CON DEAE-CELULOSA. LA LÍNEA PUNTEADA REFIERE EL GRADIENTE OBTENIDO SEGÚN LA ECUACIÓN (1).

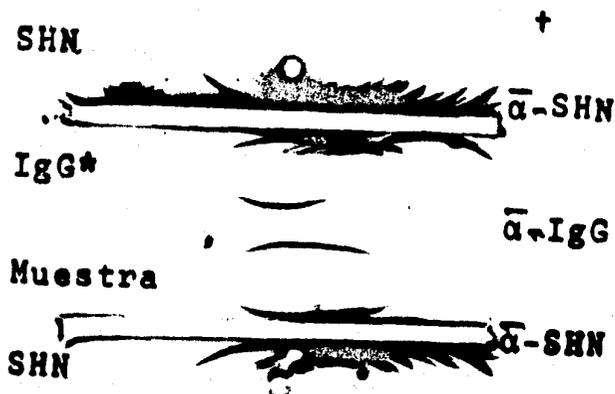


FIGURA 9. INMUNOELECTROFORESIS DE LA IGG OBTENIDA POR DEAE-CELULOSA, EN PLACA DE AGAROSA AL 1% EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE VERONAL CON FUERZA IÓNICA IGUAL A 0.05. DESPUES DE LAVADA LA PLACA SE TIÑO CON AMIDO NEGRO 0.7% EN ACÉTICO AL 7%.

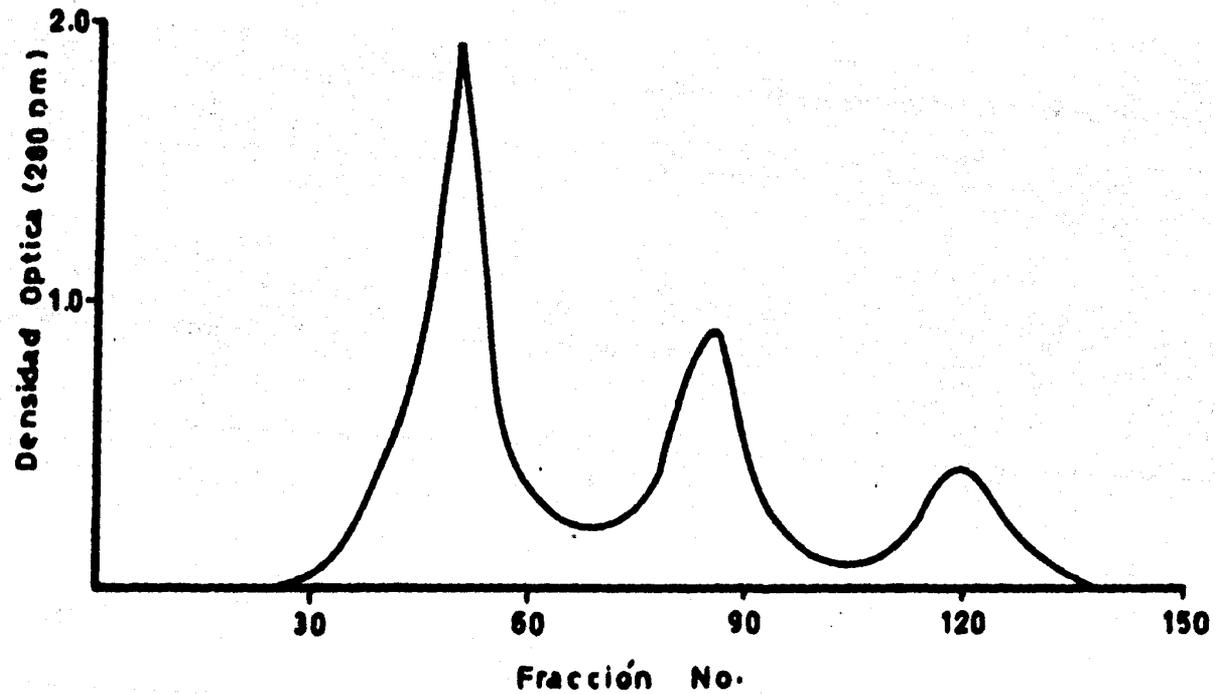


FIGURA 10. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS PRODUCTOS DE LA DIGESTIÓN DE IGG CON PEPSINA OBTENIDO POR FILTRACIÓN EN SEPHADEX G-150-120, TAMAÑO DE LA COLUMNA 2.6 X 90 CM.

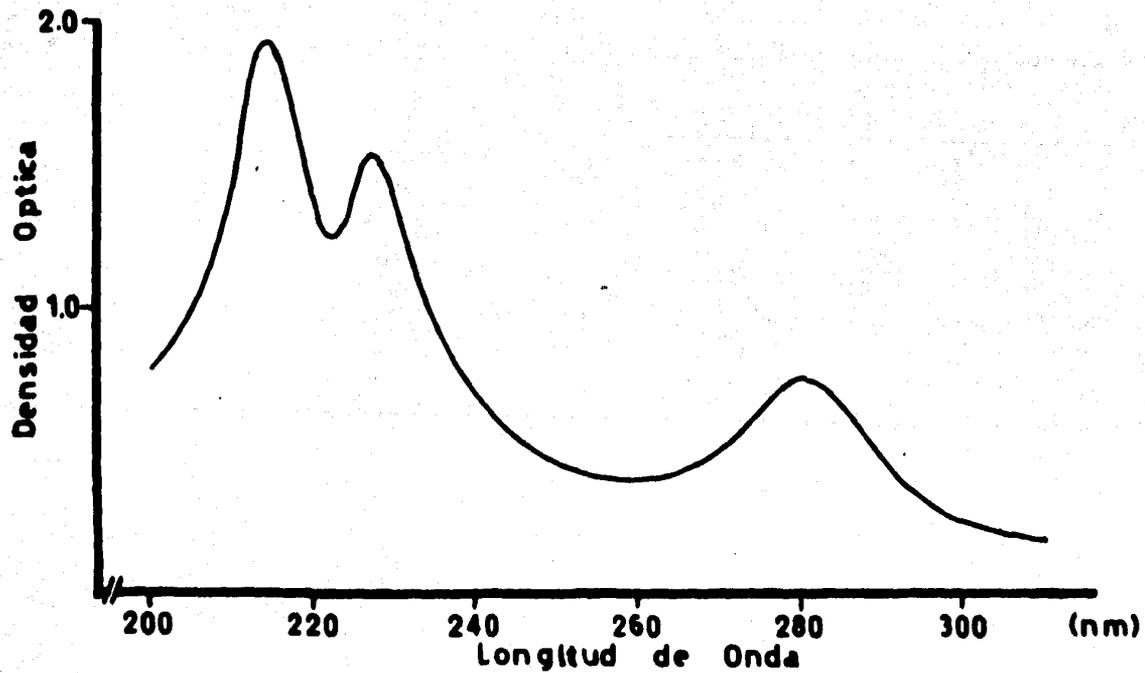


FIGURA 11. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LOS OLIGOPÉPTIDOS CORRESPONDIENTES A CH2 DE IGG HUMANA (TERCER PICO DE LA FIGURA 10) EN EL INTERVALO DE 200 A 300 NANÓMETROS.

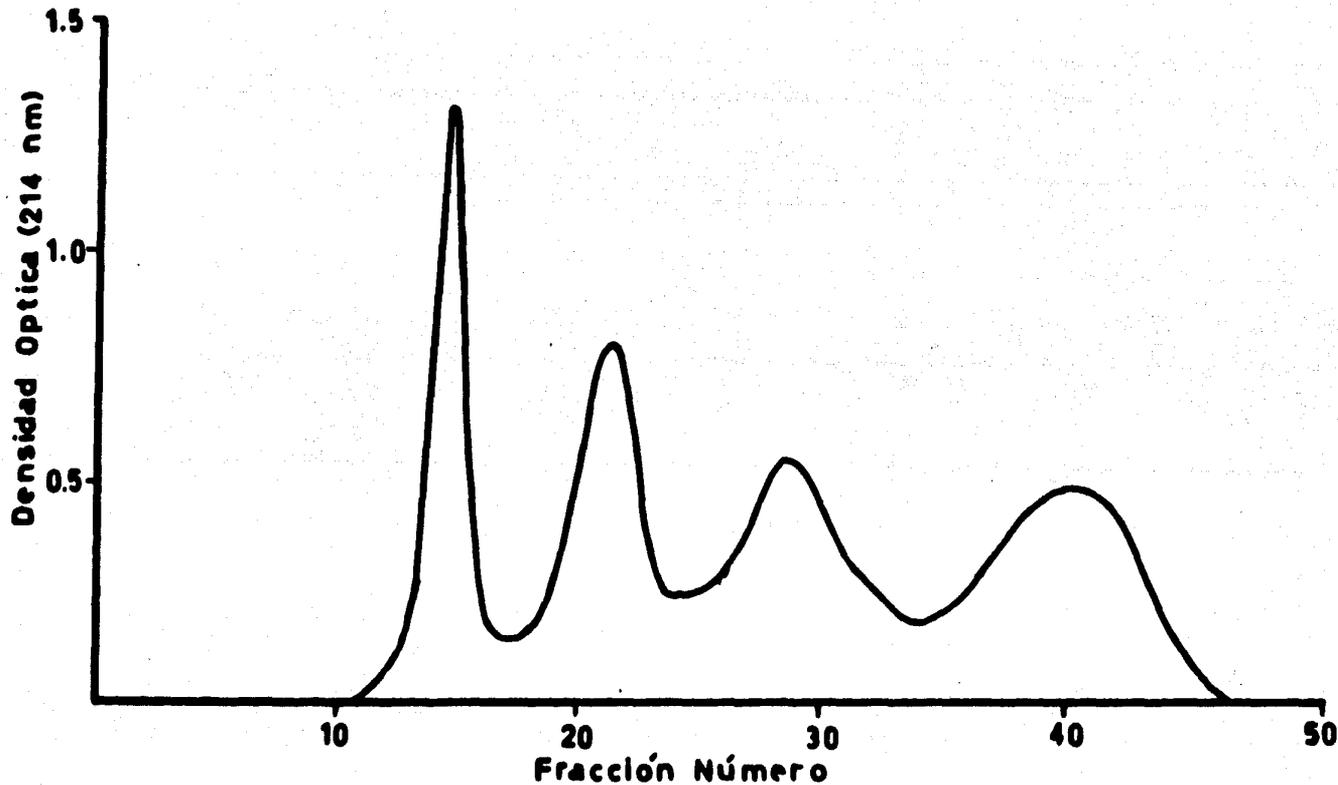


FIGURA 12. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA DESALINIZACIÓN DE LOS OLIGOPÉPTIDOS DE CH<sub>2</sub> EN UNA COLUMNA DE 1.6 X 85 CM, CONTENIENDO SEPHADEX G-10-120. ELUYENTE: AGUA TRIDESTILADA.

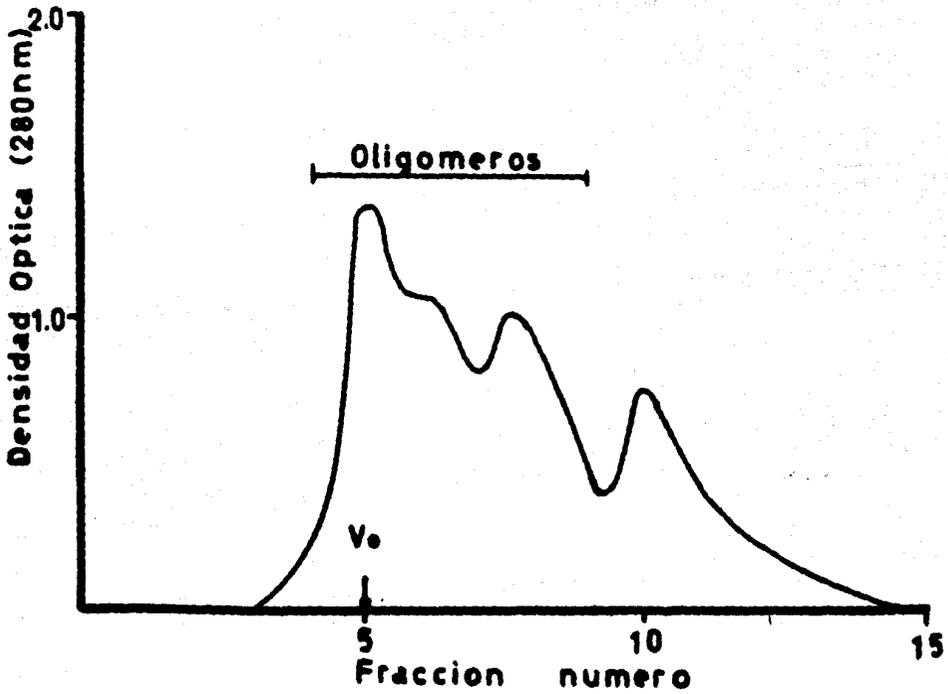


FIGURA 13. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200-120 DE UNA SOLUCIÓN DE IGG AGREGADA POR CALOR. TAMAÑO DE LA COLUMNA: 0.7 X 27 CM. ELUYENTE: PBS, PH=7.2

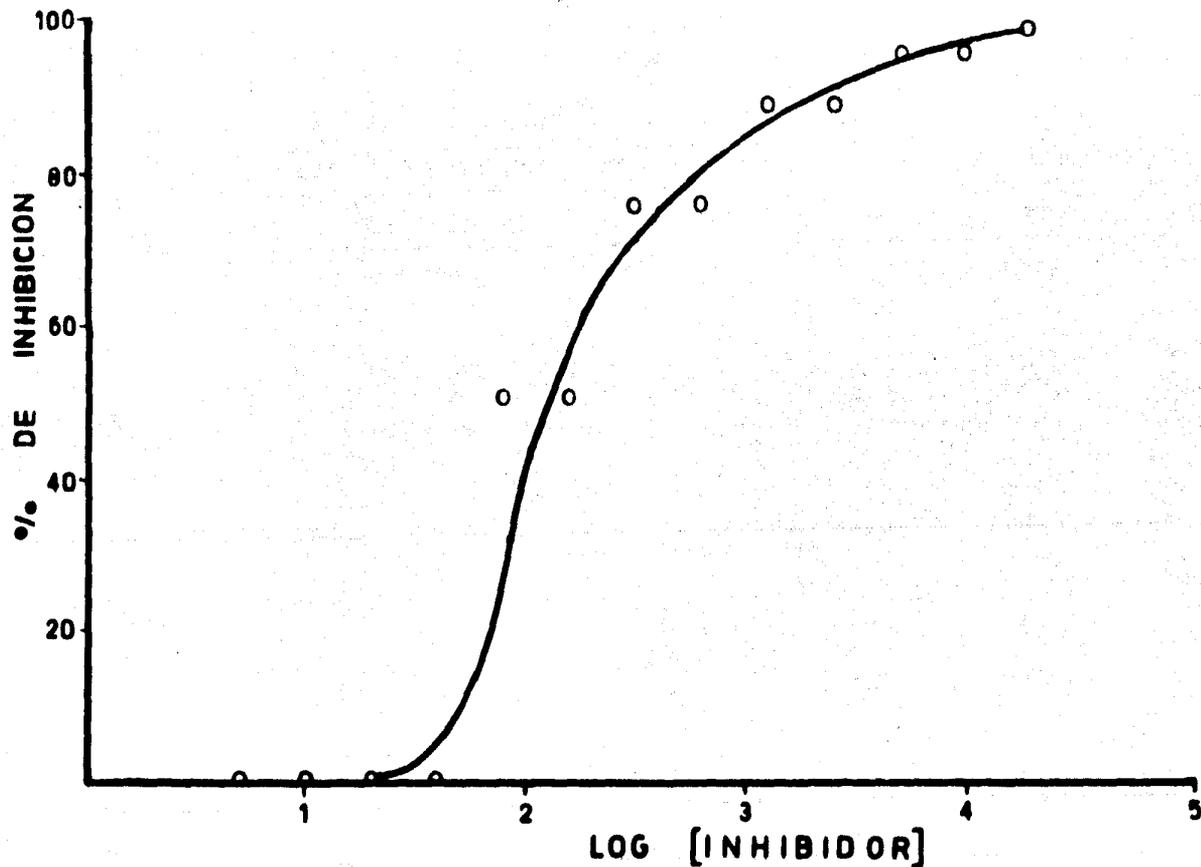


FIGURA 14. CURVA DE INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN DEL FR CON LA IGG, POR LA IGG AGREGADA POR CALOR, TITULADA EN PLACA SEGÚN LA TÉCNICA DE WAALER-ROSE Y EMPLEANDO VOLÚMENES DE 25 MICROLITROS. EL % DE INHIBICIÓN SE DETERMINÓ SEGÚN LA ECUACIÓN 2.

Suero	INHIBIDOR.								
	ninguno	IgGag.	F(ab) <sub>2</sub>	pFc'	CH2f	I	II	III	IV
<i>Mezcla</i>	9	5	9	9	9	9	9	9	9
<i>adulto</i>	1	7	3	7	7	7	7	7	7
	2	9	5	9	9	9	9	9	9
	3	11	7	11	11	11	11	11	11
	4	7	3	7	7	7	7	7	7
	5	8	4	8	8	8	8	8	8
	6	9	5	9	9	9	9	9	9
	7	10	6	10	10	10	10	10	10
	8	9	5	9	9	9	9	9	9
<i>infante</i>	1	7	4	7	7	7	7	7	7
	2	9	5	9	9	9	7	7	7
	3	7	3	7	7	7	7	7	7
	4	8	4	8	8	8	8	8	8
	5	13	9	13	13	13	13	13	13
	6	11	7	11	11	11	11	11	11
	7	8	4	8	8	8	8	8	8

TABLA 2. EFECTO INHIBIDOR DE LOS FRAGMENTOS DE IGG OBTENIDOS POR LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON PEPSINA, EN LA REACCIÓN DE LA IGG CON EL FR. EL TÍTULO ES EXPRESADO COMO  $\text{LOG}_2$  DEL INVERSO DEL TÍTULO.

## 2.4. DISCUSION.

La artritis reumatoide es uno de los padecimientos mas estudiados en los diferentes campos de la investigación biomédica. Así, ha sido objeto de estudio para bioquímicos, histólogos, reumatólogos, infectólogos, inmunólogos, etc. Sin embargo hasta la fecha no se ha podido determinar con precisión el o los agentes causales, como tampoco se ha podido encontrar un tratamiento efectivo para detener el avance del padecimiento y para resolver los problemas causados.

Todo parece indicar que la AR es un padecimiento con etiología variada y/o múltiple. Lo mismo se ha considerado que el agente causal es un virus, una alteración en la conformación de las proteínas séricas, como una alteración del sistema inmune. Sin embargo, las manifestaciones clínicas indican que se trata de una enfermedad autoinmune y los análisis bioquímicos e inmunológicos señalan que la IgG es el antígeno y el FR el anticuerpo. Este último puede ser de las clases IgM, IgG e IgA.

Aunque se han efectuado muchos estudios sobre la naturaleza del FR, la estructura de la IgG, y acerca de las interacciones y cinética de la reacción entre estas dos moléculas, hasta la fecha no se ha podido indicar con precisión las características estructurales del determinante antigénico que presenta la molécula de IgG en dicha reacción. Asimismo, se han hecho muchos intentos por aislar la secuencia reactiva empleando métodos diferentes, tanto para obtención del fragmento, como para la detección de sus propiedades biológicas.

Reportes previos indican que el sitio de reacción de la IgG con el FR se encuentra localizado en el fragmento Fc de la molécula de IgG (17, 85, 104, 240-242), mas aún como se demuestra posteriormente en el dominio CH2 (113, 242, 244). Henney y cols. (244), al someter la molécula de IgG a una digestión con pepsina, durante 16 horas, obtuvieron ademas de F(ab)<sub>2</sub> y pFc,

dos fracciones peptídicas productos de la ruptura de CH<sub>2</sub>, de los cuales uno de ellos, posee una pequeña capacidad inhibitoria en el sistema IgG-FR.

Con estos fundamentos, se intentó obtener un fragmento peptídico de CH<sub>2</sub>, poseedor de la estructura antigénica y con la capacidad de inhibir la reacción en el sistema Waaler-Rose. Como ha sido demostrado previamente, la digestión de la IgG por pepsina, durante dos horas, produce los fragmentos Fc y F(ab)<sub>2</sub>; pero si en tiempo de digestión se prolonga, el fragmento Fc empieza a ser digerido dando origen al fragmento pFc y diversos segmentos, productos del dominio CH<sub>2</sub>, cuyo número y tamaño son dependientes del tiempo de digestión. De acuerdo con esto, al digerir la IgG con pepsina, durante 24 horas, se encontraron 4 fragmentos peptídicos de CH<sub>2</sub> los cuales fueron separados por Sephadex G-10. Sin embargo, al probar la capacidad inhibitoria de los fragmentos obtenidos, los resultados fueron negativos para los oligopéptidos de CH<sub>2</sub> y para F(ab)<sub>2</sub>; mientras que dicha capacidad

Al comparar los resultados obtenidos, con los reportados por Henney y cols., se infiere que el posible factor causante de la pérdida de actividad de los fragmentos CH<sub>2</sub>, es la mayor fragmentación producida por el tiempo de incubación. De esta manera, los resultados apoyarían la idea de que el determinante antigénico en la AR es conformacional, ya que tampoco la mezcla de los péptidos presenta actividad inhibitoria. Por otro lado tomando en cuenta el número de aminoácidos del dominio, la pérdida de una secuencia es menos probable que la pérdida de una conformación.

El no haber obtenido un fragmento capaz de inhibir la reacción, plantea la necesidad de utilizar otra metodología. Posiblemente con el uso de IgG de mieloma y/o FR monoclonal se lo gre identificar la fracción mas pequeña posible capaz de inhibir la reacción. También es necesario probar otros sistemas enzimáticos, ya sea variando la enzima o las condiciones de incubación.

Tambien se deberán probar otros sistemas de inhibición ya que las pruebas de detección del FR se siguen incrementando en variedad, sensibilidad, especificidad y precisión, indicando que posiblemente la hemaglutinación no sea el método mas adecuado para el estudio de esta reacción.

Al aislar el fragmento y conocer la estructura antigénica de la reacción con el FR, no solamente serviría para establecer su etiología, sino que ademas tendría uso terapéutico en el tratamiento de la AR. Por ser una sustancia de origen homólogo no sería capaz de inducir fenómenos alérgicos, y así permitiría la administración a pacientes con AR activa con el objeto de inhibir *in vivo* la formación de complejos IgG-FR e impedir de esta manera la lesión tisular por hipersensibilidad de tipo III. Además se sabe que los antígenos solubles son capaces de inducir tolerancia inmunológica por activación de células T supresoras. De esta forma, si fuese posible la administración de un fragmento soluble, se tendría un arma terapéutica.

## 2.5. CONCLUSIONES

El método empleado para la purificación de la IgG fué satisfactorio, ya que se obtuvo una muestra homogénea que superó la adquirida de fuente comercial cuando se analizó por inmunolectroforesis.

La técnica de Waaler-Rose para la detección del FR es aceptable; pero posiblemente no sea satisfactoria para medir inhibición ya que, como utiliza IgG de conejo [amboceptor] y se pretende inhibir con fragmentos de IgG humana, el sistema es heterogéneo, aún cuando se haya demostrado una reacción cruzada.

Los fragmentos de IgG, obtenidos por proteólisis, no fueron capaces de inhibir la reacción del FR con la IgG en el sistema de Waaler-Rose, cuando se probaron cada uno por separados o en mezcla. Por otro lado, la IgG agregada por calor demostró poseer esta capacidad.

Los resultados apoyan la hipótesis que el determinante antigénico en la AR es conformacional ya que la estructura antigénica se pierde por la fragmentación proteolítica y la mezcla de los fragmentos no produce la inhibición.

### 3.0. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Lawrence, J.S., Laine, V.A. y Gaff, R. (1961). The Epidemiology of Rheumatoid Arthritis in Northern Europe. Proc. Roy. Soc. Med. 54: 454.
- 2.- Fye, K.H., Moutsopoulos, H.M. y Talal, N. (1978). Rheumatic Disease. En Basic and Clinical Immunology. 2da. Ed. Fudenberg, H. H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. y Wells, J.V. Lange Med. Publ. pp. 422.
- 3.- Glynn, L.E. y Holborow, E.J. (1960). Immunological Aspects of Rheumatoid Disease: a Review. Ann. Rheum. Dis. 19: 197.
- 4.- Johnson, P.M. y Page-Faul, W. (1976). Rheumatoid Factor: Its Nature, Specificity and Production in Rheumatoid Arthritis. Clin. Immunol. Immunopath. 6: 414.
- 5.- Baumal, R. y Broder, I. (1968). Studies into the Occurrence of Soluble Antigen-Antibody Complexes in Disease. Clin. Exp. Immunol. 3: 555.
- 6.- Broder, I., Baumal, R., Gordon, D., Bell, D. (1969). Histamine-releasing Activity of Rheumatoid and Nonrheumatoid Serum and Synovial Fluid. Ann. N.Y. Acad. Sci. 168: 126.
- 7.- Hannestad, K. (1967). Precense of Aggregated Gamma-G-globulin in Certain Rheumatoid Synovial Effusions. Clin. Exp. Immunol. 2: 511.
- 8.- Hannestad, K. (1968). Rheumatoid Factors Reacting with Autologous Native Gamma-G-globulin and Joint Fluid Gamma-G-aggregates. Clin. Exp. Immunol. 3: 671.
- 9.- Agnello, V., Winchester, R.J. y Kunkel, H.G. (1970). Precipitin Reactions of the C1q Component of Complement with Aggregated Gamma-globulin and Immune Complexes in Gel Diffusion. Immunology 19: 909.
- 10.- Winchester, R.J., Agnello, V. y Kunkel H.G. (1970). Gamma-globulin Complexes in Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis. Clin. Exp. Immunol. 6: 689.
- 11.- Winchester, R.J., Kunkel, H.G. y Agnello, V. (1971). Occurrence of Gamma-globulin Complexes in Serum and Joint Fluid of Rheumatoid Arthritis Patients. J. Exp. Med. 134: 286s.
- 12.- Kunkel, H.G., Müller-Eberhard, J.H. y Fudenberg, H.H. (1961). Gammaglobulin Complexes in Rheumatoid Arthritis and Certain Other Conditions. J. Clin. Invest. 40: 117.
- 13.- Cunniff, R.V. y Stollar, B.D. (1968). Properties of 19S Antibodies in Complement Fixation. J. Immunol. 100: 7.
- 14.- Zvaifler, N.J. (1968). Antimalarial Treatment of Rheumatoid Arthritis. Univ. Mich. Med. Cent. J. 34: 234.

- 15.- Hurd, E.R., LoSpalluto, J. y Ziff, M. (1970). Formation of Leukocytes Inclusions in Normal Polymorphonuclear Cells Incubated with Synovial Fluid. *Arthr. Rheum.* 13: 724.
- 16.- Sliwinski, A.J. y Zvaifler, N.J. (1969). The Removal of Aggregated and Nonaggregated Autologous Gammaglobulin from Rheumatoid Joints. *Arthr. Rheum.* 12: 504.
- 17.- Kunkel, H.G. y Tan, E.M. (1964). Autoantibodies and Disease. *Adv. Immunol.* 4: 351.
- 18.- LoSpalluto, J., Fehr, K. y Ziff, M. (1970). Degradation of Immunoglobulins by Intracellular Proteases in the Range of Neutral pH. *J. Immunol.* 105: 886.
- 19.- Quismorio, F.P., Rawson, A.J. y Abelson, N.M. (1968). The Experimental Induction of Synovitis in Normal Rabbits with Intra-articular Fab; A Possible Model for Rheumatoid Arthritis. *Arthr. Rheum.* 11: 505.
- 20.- Hollander, J.L. y Rawson, A.J. (1968). Immunologic Models Used for the Study of Rheumatoid Arthritis. *Bull. Rheum. Dis.* 18: 502.
- 21.- Munthe, E. y Natvig, J.B. (1971). Characterization of IgG Complexes in Eluates from Rheumatoid Tissue. *Clin. Exp. Immunol.* 8: 249.
- 22.- Mellbye, O.I. y Natvig, J.B. (1971). Evidence for Immune Complexes Containing Antibody to the Pepsin Site of IgG in Rheumatoid Synovial Fluids. *Clin. Exp. Immunol.* 8: 889.
- 23.- Sandberg, A.L., Osler, A.G., Shin, H.S. y Oliviera, J. (1970). The Biological Activities of Guinea Pig Antibodies. II. *J. Immunol.* 104: 329.
- 24.- Götze, O., Zvaifler, N.J. y Müller-Eberhard, H.J. (1972). Evidence for Complement Activation by the C3 Activator System in Rheumatoid Arthritis. *Arthr. Rheum.* 15: 111.
- 25.- Barnett, E.V., Bienenstock, J. y Bloch, K.J. (1966). Antinuclear Factors in Synovia. Possible Participants in the Rheumatoid Inclusion Body. *JAMA.* 198: 143.
- 26.- Elling, P., Graudal, H. y Faber, V. (1968). Granulocyte-specific Antinuclear Factors in Serum and Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 27: 225.
- 27.- McSween, R.N.M., Dalakas, T.G., Jasani, M.K., Boyle, J.A., Buchanan W.W. y Goudie, R.B. (1968). A Clinico-immunological Study of Serum and Synovial Fluid Antinuclear Factors in Rheumatoid Arthritis and Other Arthritides. *Clin. Exp. Immunol.* 3: 17.
- 28.- Robitaille, P. y Tan, E.M. (1972). Demonstration of Nuclear Antigens and Antinuclear Antibodies in Synovial Fluids by Radioimmunoassay. *Arthr. Rheum.* 15: 124.
- 29.- Zvaifler, N.J. (1965). A Speculation on the Pathogenesis of Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Arthr. Rheum.* 8: 289.

- 30.- Brand, K.D., Cathcard, E.S. y Cohen, A.S. (1968). Studies of Immune Deposits in Synovial Membranes and Corresponding Synovial Fluids. *Lab. Clin. Med.* 72: 631.
- 31.- Zvaifler, N.J. y Martinez, M.M. (1970). Antinuclear Factors and Chronic Articular Inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 8: 271.
- 32.- Hannestad, K. y Johannessen, A. (1976). Polyclonal Human Antibodies to IgG (RF) which Crossreact with Cell Nuclei. *Scand. J. Immunol.* 5: 541.
- 33.- Hannestad, K. y Stollar, B.D. (1978). Certain Rheumatoid Factors React with Nucleosomes. *Nature* 275: 671.
- 34.- Marcus, R. y Townes, A.J. (1971). The Occurrence of Cryoprotein in Synovial Fluid. *J. Clin. Invest.* 50: 282.
- 35.- Marcus, R. y Townes, A.J. (1971). Partial Dissociation of Rheumatoid Synovial Fluid Cryoprotein: Microcomplement Fixation by IgG- or IgG and IgM-containing Fractions and Denatured Calf Thymus DNA. *J. Immunol.* 106: 1499.
- 36.- Cracchiolo, A., Goldberg, L.S., Barret, E.V. and Bluestone, R. (1971). Studies of Cryoprecipitates from Synovial Fluid of Rheumatoid Patients. *Immunology* 20: 1067.
- 37.- Zvaifler, N.J. (1973). The Immunopathology of Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Adv. Immunol.* 16: 265.
- 38.- Zvaifler, N.J. (1969). Rheumatoid Factor and the Fixation of Complement. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 168: 146.
- 39.- Zvaifler, N.J. (1972). Cryofibrinogens in Scleroderma. *Arthr. Rheum.* 15: 133.
- 40.- Gormsen, J., Anderson, R.B. y Feddersen, C. (1971). Fibrinogen-fibrin Breakdown Products in Pathologic Synovial Fluids. *Arthr. Rheum.* 14: 503.
- 41.- Shainoff, J.R. y Page, I. (1962). Significance of Cryoprotein in Fibrinogen-fibrin Conversion. *J. Exp. Med.* 116: 687.
- 42.- Wegrzynowicz, Z., Kopec, M. y Latallo, Z.S. (1971). Formation of Soluble Fibrin Complexes and Some Factors Affecting Their Solubility. *Scand. J. Hematol.* 13: 49.
- 43.- Vaughan, J.H., Bayles, T.B. y Favor, C.V. (1951). Serum Complement in Rheumatoid Arthritis. *Amer. J. Med. Sci.* 222: 186.
- 44.- Laurell, A.B. y Grubb, R. (1958). Complement, Complement Component, Properdin and Agglutination Promoting Factors in Rheumatoid Arthritis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 43: 310.
- 45.- Ellis, H.A. y Felix-Davies, D. (1959). Serum Complement, Rheumatoid Factor, and other Serum Proteins in Rheumatoid Disease and Systemic Lupus Erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 18: 215.

- 46.- Hedberg, H. (1963). Studies on the Depressed Hemolytic Complement Activity of Synovial Fluid in Adult Rheumatoid Arthritis. *Acta Rheumatol. Scand.* 9: 165.
- 47.- Hedberg, H. (1964). The Depressed Synovial Complement Activity in Adult and Juvenil Rheumatoid Arthritis. *Acta Rheum. Scand.* 10:109
- 48.- Pekin, T.J. y Zvaifler, N. (1964). Hemolytic Complement in Synovial Fluid. *J. Clin. Invest.* 43: 1372.
- 49.- Hedberg, H. (1967). Studies on Synovial Fluid in Arthritis. I. The Total Complement Activity. *Acta Med. Scand. suppl.* 479: 137.
- 50.- Fostiropoulos, G., Austen, K.F. y Bloch, K.J. (1965). Total Hemolytic Complement (CH50) and Second Component of Complement (C2hu) Activity in Serum and Synovial Fluid. *Arthr. Rheum.* 8: 219.
- 51.- Peltier, A.R., Coste, F. y Delbarre, F. (1966). Haemolytic Complement Level in Synovial Fluid. *Presse Med.* 74: 1523.
- 52.- Vaughan, J.H., Barnett, E.V., Sobel, M.V. y Jacox, R.F. (1968). Intracytoplasmatic Inclusions of Immunoglobulins in Rheumatoid Arthritis and Other Diseases. *Arthr. Rheum.* 11: 125.
- 53.- Ruddy, S. y Austen, K.F. (1970). The Complement System in Rheumatoid Arthritis Synovitis. *Arthr. Rheum.* 13: 713.
- 54.- Gligore, V., Bolosiu, H.D., Duter, A. y Podut, A. (1971). Studies on Cyto-immunological Changes of the Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis. *Acta Rheumatol. Scand.* 17: 72.
- 55.- Weinstein, A., Peters, D.K., Brown, D.L. y Bluestone, R. (1971). Complement Metabolism in Rheumatoid Arthritis. *Clin. Sci.* 40: 12p.
- 56.- Ruddy, S., Müller-Eberhard, H.J. y Austen, K.F. (1971). Direct Measurement of Intra-articular Hypercatabolism of Third Complement Component (C3) in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Arthr. Rheum.* 14: 410.
- 57.- Britton, M.C. y Schur, P.H. (1971). The Complement System in Rheumatoid Synovitis. II. Intracytoplasmatic Inclusions of Immunoglobulin and Complement. *Arthr. Rheum.* 14: 87.
- 58.- Ward, P.A. y Zvaifler, N.J. (1971). Complement-Derived Leukotactic Factors in Inflammatory Synovial Fluids of Human. *J. Clin. Invest.* 50: 606.
- 59.- Zvaifler, N.J. (1969). Breakdown Products of C'3 in Human Synovial Fluids. *J. Clin. Invest.* 48: 1532.
- 60.- Zvaifler, N.J. y Pekin, T.J. (1963). Activation of the C4 in Rheumatoid Synovitis. *Clin. Res.* 11: 180.
- 61.- Ruddy, S., Everson, L.K., Schur, P. y Austen, K.F. (1971). Hemolytic Assay of the Ninth Complement Component. Elevation and Depletion in Rheumatic Diseases. *J. Exp. Med.* 134: 259s.

- 62.- Schmid, F.R., Roitt, I.M. y Rocha, M.J. (1970). Complement Fixation by a Two Component Antibody System: Immunoglobulin G Immunoglobulin M Anti-globulin (Rheumatoid Factor). *J. Exp. Med.* 132: 673.
- 63.- Hedberg, H. (1970). Depression of Synovial Fluid Complement Activity and Rheumatoid Factor Positivity. *Acta Med. Scand.* 188: 409.
- 64.- Müller-Eberhard, H.J., Polley, M.H. y Calcott, M.A. (1967). Formation and Functional Significance of Molecular Complex Derived from the Second and the Fourth Component of Human Complement. *J. Exp. Med.* 125: 359.
- 65.- Pillemer, L., Blurr, L., Lepow, I.H., Todd, C.W. y Wardlaw, A. C. (1954). Properdin System and Immunity; Demonstration and Isolation of New Serum, Properdin, and Its Role in Immune Phenomena. *Science* 120: 279.
- 66.- Gewurz, H., Shin, H.S. y Mergenhagen, S.E. (1968). Interactions of the Complement System with Endotoxic Lipopolysaccharide: Consumption of Each of the Six Terminal Component Complement. *J. Exp. Med.* 128: 1049.
- 67.- Gotze, O. y Müller-Eberhard, H.J. (1971). The C3-Activator System: An Alternat Pathway of Complement Activation. *J. Exp. Med.* 134: 90s.
- 68.- Ruddy, S. y Austen, K.F. (1973). Activation of the Complement System in Rheumatoid Synovitis. *Fed. Proc.* 32: 134.
- 69.- Spiegelberg, H.L. y Gotze, O. (1972). Conversion of C3 Proactivator and Activation of the Alternate Pathway of Complement Activation by Different Classes and Subclasses of Human Immunoglobulins. *Fed. Proc.* 31: 655 abs.
- 70.- Vaughan, J.H., Jacox, R.F. y Noell, P. (1968). Relation of Intracytoplasmatic Inclusions in Joint Fluid Leukocytes to Anti-gamma-G-globulins. *Arthr. Rheum.* 11: 135.
- 71.- Peltier, A.P., Delbarre, F. y Krassinine, G. (1967). Haemolytic Complement Level and Ragocytes (R.A. Cell) Concentration in Synovial Fluid. *Ann. Rheum. Dis.* 26: 528.
- 72.- Heimer, R., Levin, F.M., Primack, A., Corcos, J.M. y Nosenzo, C. (1962). Inhibition of Complement Fixation by Human Serum. *J. Immunol.* 89: 382.
- 73.- Zvaifler, N.J. y Bloch, K.J. (1962). Rheumatoid Factor an Inhibitor of the Complement Fixation. *Arthr. Rheum.* 5: 127.
- 74.- Bernhard, G.G., Cheng, W. y Talmage, D.W. (1962). The Reaction of Rheumatoid Factor and Complement with Gamma-globulin Coated Latex. *J. Immunol.* 88: 750.
- 75.- Davis, J.S. y Bollet, A.J. (1964). Protection of a Complement Sensitive Enzyme System by Rheumatoid Factor. *J. Immunol.* 92: 139.

- 76.- Wiedermann, G., Meischer, P.A. y Franklin, E.C. (1963). Effect of Mercaptoethanol on Complement Binding Ability of Human 7S Gammaglobulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113: 609.
- 77.- Zvaifler, N.J. y Schur, P. (1968). Reactions of Aggregated Mercaptoethanol-Treated Gammaglobulin with Rheumatoid Factor-Precipitin and Complement Fixation Studies. *Arthr. Rheum.* 11:523.
- 78.- Leon, M.A. (1957). Kinetics of Human Complement. III. Intermediates in the Reaction Between Human Complement and Sensitized Cells. *J. Immunol.* 79: 480.
- 79.- Ostgard, P. y Orjasaeter, H. (1962). Naturally Occurring Anti-A and Anti-B and Their Ability to Fix Complement. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 56: 426.
- 80.- Tesar, J.T. y Schmid, F.R. (1970). Conversion of Soluble Immune Complexes into Complement-Fixing Aggregates by IgM-Rheumatoid Factor. *J. Immunol.* 105: 1206.
- 81.- Notkins, A.L. (1971). Infectious Virus-Antibody Complexes: Interaction with Anti-Immunoglobulins, Complement and Rheumatoid Factor. *J. Exp. Med.* 134: 41. supl.
- 82.- Waaler, E. (1940). On The Occurrence of a Factor in Human Serum Activating the Specific Agglutination of Sheep Blood Corpuscles. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 17: 172.
- 83.- Rose, H.M., Ragan, C., Pearce, E. y Lipman, M.O. (1948). Differential Agglutination of Normal and Sensitized Sheep Erythrocytes by Sera of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68: 1.
- 84.- Epstein, W.V., Engleman, E.P. y Rose, M. (1957). Quantitative Studies of the Precipitation and Agglutination Reactions Between Serum of Patients with Connective Tissue Disease and a Preparation of Fraction II of Human Gammaglobulin. *J. Immunol.* 79: 441.
- 85.- Edelman, G.M., Kunkel, H.G. y Franklin, E.C. (1958). Interaction of the Rheumatoid Factor Antigen-Antibody Complexes and Aggregated Gammaglobulins. *J. Exp. Med.* 108: 105.
- 86.- Christian, C.L. (1958). Characterization of the "Reactant" Gammaglobulin Factor in the F II Precipitin Reaction and the F II Tanned Sheep Cell Agglutination Test. *J. Exp. Med.* 108: 139.
- 87.- Henney, C.S. y Stanworth, D.R. (1965). The Reactivity of Rheumatoid Factor with Human Gamma-G-Globulin. *Immunol.* 9: 139.
- 88.- Heimer, R. y Levin, F.M. (1966). On the Distribution of Rheumatoid Factor Among the Immunoglobulins. *Immunochem.* 3: 10.
- 89.- Franklin, E.C., Müller-Eberhard, H.J., Holman, H. y Kunkel, H.G. (1957). An Unusual Protein Component of High Molecular Weight in the Serum of Certain Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Exp. Med.* 105: 425.

- 90.- Butler, V.P. Jr. y Vaughan, J.H. (1965). The Reaction of Rheumatoid Factor with Animal Gammaglobulins: Quantitative Considerations. *Immunology* 8: 144.
- 91.- Aho, K. y Simons, K. (1963). Studies of the Antibody Nature of the Rheumatoid Factor. Reaction of the Rheumatoid Factor with Human Specific Precipitates and with Native Human Gammaglobulin. *Arthr. Rheum.* 6: 676.
- 92.- Harboe, M. (1961). Interactions of Rheumatoid Factor with Immune Precipitates Containing Antibody of Human Origin. *Ann. Rheum. Dis.* 20: 363.
- 93.- Goldberg, L.S. y Fudenberg, H.H. (1971). Antiglobulins and Human Disease. *Vox. Sang.* 20: 1.
- 94.- Messner, R.P., Caperton, E.M., King, R.A. y Williams, R.C. --- (1969). Interaction Among Rheumatoid Factors, Gamma-G-antibodies, Lymphocytes and Phagocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 168: 937.
- 95.- Ashe, W.K., Daniels, C.A., Scott, G.S. y Notkins, A.L. (1971). Interaction of Rheumatoid Factor with Infectious Herpes Simplex Virus-Antibody Complexes. *Science* 172: 176.
- 96.- Stone, M.J. y Metzger, H. (1968). Binding Properties of a Waldenström Macroglobulin Antibody. *J. Biol. Chem.* 243: 5977.
- 97.- Chavin, S.I. y Franklin, E.C. (1969). Studies on Antigen-Binding Activity of Macroglobulin Antibody Subunits and Their Enzymatic Fragments. *J. Biol. Chem.* 244: 1345.
- 98.- Normansell, D.E. y Stanworth, D.R. (1968). Interactions Between Rheumatoid Factors and Native Gamma-G-Globulins Studied in the Ultracentrifuge. *Immunology* 15: 549.
- 99.- Normansell, D.E. (1971). Anti-Gammaglobulins in Rheumatoid Arthritis Sera. II. The Reactivity of Anti-Gammaglobulin Rheumatoid Factors with Altered Gamma-G-Globulin. *Immunochem.* 8: 593.
- 100.- Metzger, H. (1967). Characterization of a Human Macroglobulin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 57: 1490.
- 101.- Crothers, D.M. y Metzger, H. (1972). The Influence of Polyvalency on the Binding Properties of Antibodies. *Immunochem.* 9: 341.
- 102.- Eisenberg, R. (1976). The Specificity and Polyvalency of Binding of a Monoclonal Rheumatoid Factor. *Immunochem.* 13: 355.
- 103.- Gaarder, P.I. y Michaelsen, T.E. (1974). Specificity of Rheumatoid Factors Cross-reacting with Human and Rabbit IgG. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B.* 82: 733.
- 104.- Goodman, J. W. (1961). Reaction of Rheumatoid Sera with Fragments of Papain Digested Rabbit Gammaglobulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.* 106: 822.

- 105.- Bianco, N.E., Dobkin, L.W. y Schur, P.H. (1974). Immunological Properties of Isolated IgG and IgM Anti-Gamma-Globulins (Rheumatoid Factors). *Clin. Exp. Immunol.* 17: 91.
- 106.- Henney, C.S. e Ishizaka, K. (1968). Antigenic Determinants Specific for Aggregated Gamma-G-Globulin. *J. Immunol.* 100: 718.
- 107.- Henney, C.S. e Ishizaka, K. (1968). Heterogeneity in Antibodies Specific For Aggregated Human Gamma-G-Globulin. *J. Immunol* 101: 79.
- 108.- Mackenzie, M.R., Goldberg, L.S., Barnett, E.V. y Fudenberg, H. H. (1968). Serological Heterogeneity of the IgM Component of Mixed (Monoclonal IgM-Polyclonal IgG) Cryoglobulins. *Clin. Exp. Immunol.* 3: 931.
- 109.- Allen, J.C. y Kunkel H.G. (1966). Hidden Rheumatoid Factors with Specificity for Native Gamma-Globulins. *Arthr. Rheum.* 9:758.
- 110.- Gaarder, P.I. y Natvig, J.B. (1970). Hidden Rheumatoid Factors Reacting with "non a" and Other Antigens of Native Autologous IgG. *J. Immunol.* 105: 928.
- 111.- Natvig, J.B. y Kunkel H.G. (1973). Human Immunoglobulins: Classes, Subclasses, Genetic Variants and Idiotypes. *Adv. Immunol.*16:1.
- 112.- Williams, R.C. y Lawrence, T.G. (1966). Variations Among Gamma globulins at the Antigenic Site Reveled by Pepsin Digestion. *J. Clin. Invest.* 45: 714.
- 113.- Natvig, J.B., Gaarger, P.I. y Turner, M.W. (1972). IgG Antigens of the CH2 and CH3 homology Regions Interacting with Rheumatoid Factor. *Clin. Exp. Immunol.* 12: 177.
- 114.- Grey, H.M., Kohler, P.F., Terry, WD., y Franklin, E.C. (1968). Human Monoclonal Gamma-G-Cryoglobulins with Anti-Gamma-Globulin Activity. *J. Clin. Invest.* 47: 1875.
- 115.- Stone, M.J. y Metzger, H. (1969). The Specificity of a Monoclonal Macroglobulin (Gamma M) Antibody: Reactivity with Primate Gamma-G Immunoglobulin. *J. Immunol.* 102: 222.
- 116.- Natvig, J.B. (1966). Heterogeneity of Anti-Gamma-Globulin Factors detected by Pepsin-Digested Human Gamma-G-Globulin. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 66: 369.-
- 117.- Waxdal, M.J., Konigsberg, W.H., Henley, W.L. y Edelman, G.M. (1968). The Covalent Structure of a Human Gamma-G Immunoglobulin. II. Isolation and Characterization of the Cyanogen Bromide Fragments. *Biochemistry* 7: 1959.
- 118.- Fleischman, J.B., Porter, R.R. y Pres. E.M. (1963). The Arrangement of the Peptide Chain in Gamma-Globulin. *Biochem. J.*88: 220.
- 119.- Waxdal, M.J., Konigsberg, W.H. y Edelman, G.M. (1968). The Covalent Structure of a Human Gamma-G Immunoglobulin. III. Arrangement of the Cyanogen Bromide Fragments. *Biochemistry* 7: 1967.

- 120.- Edelman, G.M. (1959). Dissociation of gammaglobulin. J. Am. Chem. Soc. 81: 3155.
- 121.- Edelman, G.M. y Poulik, D.M. (1961). Studies on Structural Units of The Gammaglobulins. J. Exp. Med. 113: 861.
- 122.- Putnam, F.W. (1969). Immunoglobulin Structure: Variability and Homology. Science 163: 623.
- 123.- Organización Mundial de la Salud (1964). Nomenclature for Human Immunoglobulins. Bull. World Health Organ 30: 447.
- 124.- Williams, C.A. y Chase, M.W., Ed. (1967). Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. I. Academic Press, N.Y.pp: 479.
- 125.- Cairns, J. (1967). Nomenclature of Immunoglobulins. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32: 619.
- 126.- Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Gall, P.D., Rutishauser, V. y Waxdal, M.J. (1969) The Covalent Structure of an Entire Gamma-Globulin Molecule. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 63: 78.
- 127.- Grey, H.M. y Kunkel, H.G. (1964). H Chain Subgroups of Myeloma Proteins and Normal 7S Gammaglobulin. J. Exp. Med. 120: 253.
- 128.- Terry, W.D. y Fahey, J.L. (1964). Subclasses of Human Gammaglobulin Based on Differences in the Heavy Polypeptide Chains. Science 146: 400.
- 129.- Kunkel, H.G. y Prendergast, R.A. (1966). Subgroups of Gamma A Immune Globulins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122: 910.
- 130.- Feinstein, D. y Franklin, E.C. (1966). Two Antigenically Distinguishable Subclasses of Human A Myeloma Proteins Differing in Their Heavy Chains. Nature 212: 1496.
- 131.- Vaerman, J.P. y Heremans, J.F. (1966). Subclasses of Human Immunoglobulin A Based on Differences in the Alpha Polypeptide Chains. Science 153: 647.
- 132.- Hilschmann, N. y Craig, L.C. (1965). Aminoacid Sequence Studies with Bence-Jones Proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53: 1403.
- 133.- Hood, L. y Prahl, J. (1971). The Immune System: A Model for Differentiation in Higher Organisms. Adv. Immunol. 14: 291.
- 134.- Miltein, G. (1967). Linked Groups of Residues in Immunoglobulin K Chains. Nature 216: 330.
- 135.- Solomon, A., Litwin, S.D. y Kunkel, H.G. (1965). Marked Antigenic and Other Differences Among Bence-Jones Proteins Containing Similar Genetic Factors. Fed. Proc. 24: 201.
- 136.- Tischendorf, F.W., Tischendorf, M.M. y Osserman, E.F. (1970). Subgroup-Specific Antigenic Marker on Immunoglobulin Lambda Chain: Identification of Three Subtypes of the Variable Region. J. of Immunol. 105: 1033.

- 137.- Köhler, H., Shimizu, A., Paul, C., Moore, V. y Putman, F.W. (1970). Three Variable-Gene Pools Common to IgM, IgG and IgA Immunoglobulins. *Nature* 227: 1318.
- 138.- Haber, E. (1968). *Immunochemistry. Ann. Rev. Biochem.* 37: 497.
- 139.- Palmer, J.L. y Nisonoff, A. (1964). Dissociation of Rabbit Gammaglobulin into Half-Molecules after Reduction of One Labile Disulphide Bond. *Biochemistry* 3: 863.
- 140.- Petermann, M.L. (1942). The Action of Papain on Beef Serum Pseudoglobulin and on Diphtheria Antitoxin. *J. Biol. Chem.* 144: 607.
- 141.- Gergely, J., Stanworth, D.R., Jefferis, R., Normansell, D.E. Henney, C.S. y Pardoe, G.I. (1967). Structural Studies of Immunoglobulins. I. The Role of Cysteine in Papain Hydrolysis. *Immunochem.* 4: 101.
- 142.- Porter, R.R. (1958). Separation and Isolation of Fractions of Rabbit Gamma-globulin Containing the Antibody and Antigenic Combining Site. *Nature* 182: 670.
- 143.- Porter, R.R. (1959). The Hydrolysis of Rabbit Gammaglobulin and Antibodies with Crystalline Papain. *Biochem. J.* 73: 119.
- 144.- Brambell, F.W.R., Hemmings, W.A., Oakley, C.L. y Porter, R.R. (1960). The Relative Transmission of the Fractions of Papain Hydrolyzed Homologous Gammaglobulin from the Uterine Cavity to the Foetal Circulation in the Rabbit. *Proc. Roy. Soc.* 151: 478.
- 145.- Taranta, A. y Franklin, E.C. (1961). Complement Fixation by Antibody Fragments. *Science* 134: 1981.
- 146.- Morris, I.G. (1963). Interference with the Uptake of Guinea-Pig Agglutinins in Mice due to Fractions of Papain Hydrolyzed Rabbit Gammaglobulin. *Proc. Roy. Soc.* 157: 160.
- 147.- Berken, A. y Benacerraf, B. (1966). Properties of Antibodies Cytophilic for Macrophages. *J. Exp. Med.* 123: 119.
- 148.- Moller, N.P.H. (1979). Fc-Mediated Immune Precipitation. I. A New Role of the Fc-Portion of IgG. *Immunology* 38: 631.
- 149.- Müller-Eberhard, H.J. y Kunkel, H.G. (1956). The Carbohydrate of Gammaglobulin and Myeloma Proteins. *J. Exp. Med.* 104: 253.
- 150.- Nolan, C. y Smith, E.L. (1962). Glycopeptides. II. Isolation and Properties of Glycopeptides from Rabbit Gammaglobulin. *J. Biol. Chem.* 237: 446.
- 151.- Howell, J.W., Hood, L. y Sanders. B.G. (1967). Comparative Analysis of the IgG Heavy Chain Carbohydrate Peptide. *J. Mol. Biol.* 30: 555.
- 152.- Smyth, D.S. y Utsumi, S. (1967). Structure at the Hinge Region in Rabbit Immunoglobulin G. *Nature* 216: 332.

- 153.- Moroz, C., Uhr, J.W. (1967). Secretion of IgG. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32: 255.
- 154.- Melchers, F. y Knopf, P.M. (1967). Role of the Oligosaccharides in the Secretion of IgG. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32: 255.
- 155.- Kern, M. y Swenson R.M. (1967). The Antibody. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32: 265.
- 156.- Gally, J.A. (1977). Structure of Immunoglobulins. En Antigenes. Vol. I. Sela, M. (Ed.) Academic Press, N.York.pp: 161.
- 157.- Edelman, G.M. (1970). The Covalent Structure of a Human Gamma-G-Immunoglobulin. XI. Functional Implications. Biochem. 9: 3197.
- 158.- Yount, W.J., Hong, R., Seligmann, M., Good, R. y Kunkel, H.G. (1970). Imbalances of Gamma Globulin Subgroups and Gene Defects in Patients with Primary Hypogammaglobulinemia. J. Clin. Invest. 49: 1957.
- 159.- Ballieux, R.E., Bernier, G.N., Tominaga, K. y Putnam, F.W. (1964). Gamma Globulin Antigenic Types Defined by Heavy Chain Determinants. Science 145: 168.
- 160.- Franklin, E.C. y Frangione, B. (1969). Immunoglobulins. Ann. Rev. Med. 20: 155.
- 161.- Hess, M., Hilschmann, N., Rivat, L., Rivat, C. y Ropartz, C. (1971). Isotypes in Human Lambda Chains. Nature 234: 58.
- 162.- Miltein, C. (1965). Interchain Disulphide Bridge in Bence-Jones Proteins and in Gamma globulin B Chains. Nature 205: 1171.
- 163.- Steiner, L.A. y Porter, R.R. (1967). The Interchain Disulphide Bonds of a Human Pathological Immunoglobulin. Biochemistry 6: 3957.
- 164.- Frangione, B. y Miltein, C. (1967). Disulphide Bridges of Immunoglobulin G 1 Heavy Chains. Nature 216: 939.
- 165.- Nisonoff, A., Hopper, J.E. y Spring, S.B. (1975). The Antibody Molecule. Dixon, F.J. y Kunkel, H.G. (Ed.) Academic Press.
- 166.- Milstein, C. y Pink J.R.L. (1970). Structure and Evolution of Immunoglobulins. Progr. Biophys. Mol. Biol. 21: 209.
- 167.- Gally, J.A. y Edelman, G.M. (1972). The Genetic Control of Immunoglobulin Synthesis. Ann. Rev. Genet. 6: 1.
- 168.- Frangione, B., Miltein, C. y Pink, J.R.L. (1969). Structural Studies of Immunoglobulin G. Nature 221: 145.
- 169.- O'Donnell, I.J., Frangione, B. y Porter, R.R. (1970). The Disulphide Bonds of The Heavy Chain of Rabbit Immunoglobulin G. Biochem. J. 116: 261.

- 170.- Dorrington, K.L. y Tanford, C. (1970). Molecular Size and Conformation of Immunoglobulins. *Adv. Immunol.* 12: 333.
- 171.- Frangione, B. y Milstein, C. (1968). Variations in the S-S Bridges of Immunoglobulins G. *J. Mol. Biol.* 33: 893.
- 172.- Pink, R., Wang, A.C. y Fudenberg, H.H. (1971). Antibody Variability. *Ann. Rev. Med.* 22: 145.
- 173.- Pink, J.R.L. y Mitein, C. (1967). Disulphide Bridges of a Human Immunoglobulin G Protein. *Nature* 216: 941.
- 174.- Milstein, C. y Frangione, B. (1971). Disulphide Bridges of the Heavy Chain of Human Immunoglobulin G2. *Biochem. J.* 121: 217.
- 175.- Michaelsen, T.E. (1973). Evidence of 15 S-S Bridges in the Hinge Region of Human IgG3. *Scand. J. Immunol.* 2: 523.
- 176.- Saluk, P.H. y Clem, L.W. (1971). The Unique Molecular Weigth of The Heavy Chain from Human IgG3. *J. Immunol.* 107: 298.
- 177.- Damacco, F., Michaelsen, T.E. y Natvig, J.B. (1972). The Hinge Region of IgG3, an Extended Part of the Molecule. *FEBS Lett.* 28:121.
- 178.- Hill, R.L., Delaney, R., Fellows, R.E. y Lebovitz, H.E. (1966). The Evolutionary Origins of the Immunoglobulins. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 56: 1762.
- 179.- Lebovitz, H.E., Delaney, R., Fellows, R.E. y Hill, R.L. (1968). The Aminoacid Sequence of the Fc Fragment of Rabbit Immunoglobulin G. I. Isolation and Aminoacid Composition of Tryptic Peptides. *J. Biol. Chem.* 243: 4197.
- 180.- Milstein, C. y Suasti, J. (1971). Progress in Immunology. Bernard Amos (Ed.) Vol. 5. Academic Press. pp: 35.
- 181.- Welscher, H.D. (1970). Nomenclature of Immunoglobulins. *Nature* 228: 1236.
- 182.- Edelman, G.M. y Gall, W.E. (1969). The Antibody Problem. *Ann. Rev. Biochem.* 38: 415.
- 183.- Pink, J.R., Buttery, S.H., de Vries, G.M. y Milstein, C. (1970) Human Immunoglobulin Subclasses. Partial Amino Acid Sequence of the Constant Region of a Gamma 4 Chain. *Biochem. J.* 117: 33.
- 184.- Rutishauser, U., Cunningham, B.A., Bennett, C., Konigsberg, W. H. y Edelman, G.M. (1970). The Covalent Structure of a Human Gamma G Immunoglobulin. *Biochemistry* 9: 3171.
- 185.- Wang, A.C., Gergely, J. y Fudenberg, H.H. (1973). Amino Acid Sequence at Constant and Variable Regions of Heavy Chains of Monotypic Immunoglobulin G and M of a Single Patient. *Biochemistry* 12: 528.
- 186.- Wang, A.C. y Fudenberg, H.H. (1972). Fc and Fab Fragments from IgG2 Human Immunoglobulins Characterized. *Nature New Biol.* 240: 24.

- 187.- Chuang, C.Y., Capra, J.D. y Kehoe, J.M. (1973). Evolutionary Relationship Between Carboxyterminal Region of a Human Alpha Chain and Other Immunoglobulin Heavy Chain Constant Region. *Nature New Biol.* 244: 158.
- 188.- Connell, G.E. y Porter, R.R. (1971). A New Enzymatic Fragment (Fab) of Rabbit Immunoglobulin G. *Biochem. J.* 124: 530.
- 189.- Kehoe, J.M. y Fougereau, M. (1969). Immunoglobulin Peptide with Complement Fixing Activity. *Nature* 224: 1212.
- 190.- Ellerson, J.R., Yasmeen, D., Painter, R.H. y Dorrington, K.J. (1972). A Fragment Corresponding to the CH2 Region of Immunoglobulin G (IgG) with Complement Fixing Activity. *FEBS Let.* 24: 318.
- 191.- Yasmeen, D., Ellerson, J.R., Dorrington, K.J. y Painter, R.H. (1973). Evidence for the Domain Hypothesis: Location of the Site of Cytophilic Activity. *J. Immunol.* 110: 1706.
- 192.- Spiegelberg, H.L. (1974). Biological Activities of Immunoglobulins of Different Classes and Subclasses. *Adv. Immunol.* 19: 259.
- 193.- Morell, A., Terry, W.D. y Waldmann, T.A. (1970). Metabolic Properties of IgG Subclasses in Man. *J. Clin. Invest.* 49: 673.
- 194.- Spiegelberg, H.L., Fishkin, B. G. y Grey, H.M. (1968). Catabolism of Human Gamma G Immunoglobulin of Different Heavy Chain Subclasses. *J. Clin. Invest.* 47: 2323.
- 195.- Capra, J.D. y Kunkel, H.G. (1970). Aggregation of IgG3 Proteins. Relevance to the Hyperviscosity Syndrome. *J. Clin. Invest.* 49: 610.
- 196.- Edelman, G.M., Heremans, J.F., Heremans, M.Th. y Kunkel H.G. (1960). Immunological Studies of Human Gamma-Globulin. *J. Exp. Med.* 112: 203.
- 197.- Hershgold, E.J., Cordoba, F., Charache, P. y Gitlin, D. (1963). A Crystalline Fragment from Human Gamma-Globulin. *Nature* 199: 284.
- 198.- Humphrey, R.L. (1967). Crystallographic Study of Human Myeloma Fc-Fragment. *J. Mol. Biol.* 29: 525.
- 199.- Virella, G. y Parkhouse, R.M.E. (1971). Papain Sensitivity of Heavy Chain Subclasses in Normal Human IgG and Localization of Antigenic Determinants for the Subclasses. *Immunochem.* 8: 243.
- 200.- Gergely, J., Medgyesi, G.A. y Stanworth, D.R. (1967). Structural Studies of Immunoglobulins. *Immunochemistry* 4: 369.
- 201.- Kunkel, H.G. y Grey, H.M. (1967). Heavy Chain Subclasses of Human Gamma G Globulin. *Biochemistry* 6: 2326.
- 202.- Turner, M.W., Bennich, H.H. y Natvig, J.B. (1970). Pepsin Digestion of Human G-Myeloma Proteins of Different Subclasses. *Clin. Exp. Immunol.* 7: 603.
- 203.- Jeffries, R., Weston, P.D., Stanworth, D.R. y Clamp, T.R. (1968) Relationship Between the Papain Sensitivity of Human Gamma G Immunoglobulin and Their Heavy Chain Subclass. *Nature* 219: 646.

- 204.- Gergely, J., Fudenberg, H.H. y Van Loghem, E. (1970). The Papain Susceptibility of IgG Myeloma Proteins of Different Heavy Chain Subclasses. *Immunochemistry* 7: 1.
- 205.- Turner, M.W., Bennich, H.H. y Natvig, J.B. (1970). Pepsin Digestion of Human G-Myeloma Proteins of Different Subclasses. *Clin. Exp. Immunol.* 7: 627.
- 206.- Michaelsen, Y.E. y Natvig, J.B. (1973). Characterization of Subclass-Related F(ab)<sub>2</sub>, Fab-c and Fch Fragments Obtained by Short Papain Digestion of Human IgG Myeloma Proteins. *Scand. J. Immunol.* 2: 299.
- 207.- Michaelsen, T.E. y Natvig, J.B. (1972). Three New Fragments F(ab)<sub>2</sub>, F(c)<sub>2</sub> and Fab/c, obtained by Papain Proteolysis of Normal IgG. *Scand. J. Immunol.* 1: 255.
- 208.- Nelson, C.A. (1964). Isolation of a New Intermediate in the Papain Cleavage of Rabbit Gammaglobulin. *J. Biol. Chem.* 239: 3727.
- 209.- Goodman, J.W. (1965). Heterogeneity of Rabbit Gamma-Globulin with Respect to Cleavage by Papain. *Biochemistry* 4: 2350.
- 210.- Givol, D. y DeLorenzo, F. (1968). The Position of Various Cleavages of Rabbit Immunoglobulin G. *J. Biol. Chem.* 243: 1886.
- 211.- Heimer, R., Schnoll, S.S. y Primack, A. (1967). Products of the peptic Digestion of Human Gamma-G-Immunoglobulin. *Biochem.* 6: 127.
- 212.- Turner, M.W. y Bennich, H.H. (1968). Subfragments from the Fc Fragment of Human Immunoglobulin G. *Biochem. J.* 107: 71.
- 213.- Turner, M.W., Komvopoulos, A., Bennich, H.H. y Natvig, J.B. (1972). Antigenic and Immunological Characteristics of Tryptic and Chymotryptic Subfragments from the C-Gamma-3 Homology Region of Human Immunoglobulin G. *Scand. J. Immunol.* 1: 53.
- 214.- Utsumi, S. y Karush, F. (1965). Peptic Fragmentation of Rabbit Gamma-G-Immunoglobulin. *Biochemistry* 4: 1766.
- 215.- Skvaril, F. (1960). Changes in Outdated Gamma-Globulin Preparations. *Nature* 185: 475.
- 216.- Hanson, L.A. y Johansson, B.G. (1960). Presence of Immunologically Active Fragments After Proteolytic Degradation of Human Gamma-Globulin. *Nature* 187: 599.
- 217.- Hanson, L.A. y Johansson, B.G. (1963). Isolation of Immunologically Active Fragments of Normal Human Gamma-Globulin After Tryptic Degradation. *Clin. Chim. Acta* 8: 66.
- 218.- Schrohenloher, R.E. (1963). The Degradation of Human Gamma-Globulin By Trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 101: 456.
- 219.- Edelman, G.M., Gall, W.E., Waxdal, K.J. y Konigsberg, W.H. (1966). The Covalent Structure of Human Gamma-G-Immunoglobulin. *Biochemistry* 7: 1950.

- 220.- Gall, W.E., Cunningham, B.A., Waxdal, M.J., Konigsberg, W.H. y Edelman, G.M. (1968). The Covalente Structure of a Human Gamma G Immunoglobulin. *Biochemistry* 7: 1973.
- 221.- Poulik, M.D. (1966). Fc' Fragment of Immunoglobulins. *Nature* 210: 133.
- 222.- Grey, H.M. y Abel, C.A. (1967). Structural Characteristics of the Fc' Fragment of Human Gamma-G-Globulin. *Immunochem.* 4: 315.
- 223.- Frangione, B., Milstein, C. y Franklin, E.C. (1968). Intrachain Disulphide Bridges in Immunoglobulin G Heavy Chains; The Fc Fragment. *Biochem. J.* 106: 15.
- 224.- Iramajiri, S., Franklin, E.C. y Frangione, B. (1968). Some Chemical and Biological Properties of the F'/c Fragment of Human Gamma-G-Globulins. *Immunochem.* 5: 383.
- 225.- Iramajiri, S., Franklin, E.C. y Woods, K.R. (1968). C-Terminal Sequence of the Fc' Fragment of Human Gamma G Globulin. *Nature* 220: 612.
- 226.- Natvig, J.B. y Turner, M.W. (1971). Localization of Gm Markers to Different Molecular Regions of the Fc Fragment. *Clin. Exp. Immunol.* 8: 685.
- 227.- Utsumi, S. (1969). Stepwise Cleavage of Rabbit Immunoglobulin G by Papain and Isolation of four Types of Biologically Active Fc Fragments. *Biochem. J.* 112: 343.
- 228.- Heide, K. y Schwick, H.G. (1973). Salt Fractionation of Immunoglobulins. En *Handbook of Experimental Immunology*. Weir, D.M. (Ed.). °da. edici³n. Blackweel Sci. Pub. England.pp:6.4.
- 229.- Fahey, J.L. y Horbett, A.P. (1959). Human Gamma-Globulin Fractionation on Anion Exchange Cellulosa Column. *J. Biol. Chem.* 234: 2645.
- 230.- Lakshmanan, T.K. y Lieberman, S. (1953). An improved Method of Gradient Elution Chromatography and Its Application to the Separation of Urinary Ketosteroids. *Arch. Biochem. Biophys.* 45: 235.
- 231.- Nisonoff, A., Wissler, F.C., Lipman, L.N. y Woernley, D.L. (1960) Separation of Univalent Fragment from the Bivalent Rabbit Antibody Molecule by Reduction of Disulphide Bonds. *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230.
- 232.- Hall, A.P., Mednis, A.D. y Bayles, T.B. (1958). The Latex Agglutination and Inhibition Reactions. Clinical Experience in the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *New England J. Med.* 258: 731.
- 233.- Nakamura, R.M. (1974). Immunopathology, Clinical Laboratory Concepts and Methods. Little, Brown and Co. Boston, USA. pp:418.
- 234.- Henney, C.S. Ishizaka, K. (1968). Heterogenity in Antibody Specific for Aggregated Human Gamma-G-Globulin. *J. Immunol.* 79: 91.

- 235.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol Chem* 193: 265.
- 236.- Franklin, E.C. y Kunkel, H.G. (1957). Immunologic Differences Between the 19S and 7S Components of Normal Human Gamma-Globulin. *J. Immunol.* 78: 11.
- 237.- Fahey, J.L. (1960). Separation of Serum Antibody Activities by Anion-Exchange Cellulose Chromatography. *Science* 131: 500.
- 238.- Sober, H.A., Gutter, F.J., Wyckoff, M.M. y Peterson, E.A. (1956). Chromography of Proteins. II. Fractionation of Serum Proteins on Anion-Exchange Cellulose. *J. Amer. Chem. Soc.* 78: 756.
- 239.- Stanworth, D.R. y Turner, M.W. (1973). Immunochemical Analysis of Immunoglobulins and Their Subunits. En *Handbook of Experimental Immunology*. Weir, D.M. (ed). 2da. Edición. Blackwell Sc. Pub. England. pp: 10.17.
- 240.- Johnson, P.M. y Faulk, W.P. (1976). Rheumatoid Factor: Its Nature, Specificity and Production in Rheumatoid Arthritis. *Clin. Immunol. Immunopath.* 6: 414.
- 241.- Abraham, G.N., Clark, R.A. y Vaughan, J.H. (1972). Characterization of an IgA-RF: Binding Properties and Reactivity with the Subclasses of Human Gamma-G-Globulin. *Immunochem.* 9: 301.
- 242.- Cohen, E., Nisonoff, A., Hermes, P., Norcross, B.M. y Lockie, L.M. (1961). Agglutination of Sensitized Alligator Erythrocytes by Rheumatoid Factors. *Nature London* 190: 552.
- 243.- Payne, R.B. (1969). The Controlling effect of Carbohydrate in Human, Rabbit and Bovine Immunoglobulin G on Proteolysis by Pa pain. *Biochem. J.* 111: 473.
- 244.- Henney, C.S., Jeffwris, R. y Stanworth, D.R. (1968). Studies on Low Molecular Weight Peptides Derived from Human Gamma-G-Globulin. Identification of Rheumatoid Factor Reactive Peptides in Proteolytic Digests. *Biochim. Biophys. Acta* 154: 295.