

Mieloma múltiple

ESTUDIO INMUNOQUIMICO

Doctor: MIGUEL GUZMAN URREGO *

Señorita: ELIZABETH CASTANEDA **

Doctor: CESAR MENDOZA ***

MATERIALES Y METODOS

1. Sueros para Estudio:

Los sueros para estudio fueron obtenidos de pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple, muchos de ellos de evolución larga.

2. Suero Antihumano:

El suero antihumano utilizado en todos los análisis inmunoelectroforéticos de los sueros en estudio fue preparado en cabra según la técnica descrita por Proom¹.

3. Sueros Monoespecíficos:

Los sueros monoespecíficos contra las distintas clases de inmunglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE,) fueron obtenidos así: contra IgG se preparó en conejo según la técnica descrita por Guzmán y Barbosa², contra IgA se preparó en conejo según la técnica descrita por Schumacher³, y contra IgM se preparó en conejo según la técnica descrita por Fahey y McLaughlin⁴. Los sueros monoespecíficos contra IgE y IgD, fueron obtenidos del WHO Immunology Re-

* Laboratorio de Inmunología INPES.

** Laboratorio de Bioquímica INPES.

*** Laboratorio de Hematología — Hospital San Juan de Dios. Bogotá.

search and Training Centre Lausanna, por cortesía del doctor David S. Rowe.

4. Sueros Monoespecíficos Anti-cadena Liviana:

Los sueros Monoespecíficos anti-cadena liviana tipo Kappa y anti-cadena liviana tipo Lambda fueron obtenidos de la Wellcome Foundation (Londres) por cortesía del doctor Franco Privitera.

5. Inmunoelectroforesis- Electroforesis:

Los estudios inmunoelectroforéticos fueron hechos sobre Agarosa CALBIOCHEM, en tampón de veronal T/2=0.05 pH 8.6 y 0.01 M EDTA.

Los análisis electroforéticos fueron realizados en un sistema Beckman-Microzone en tampón de Tris-Borato. Algunos estudios electroforéticos para comparación en gel de Acrilamida se hicieron en un sistema de columna E.C. Apparatus.

6. Cuantificación de Inmunoglobulinas:

Los estudios de cuantificación de inmunoglobulinas se realizaron por el procedimiento inmunoquímico de inmunodifusión radial frente a sueros monoespecíficos en cajas de Agarosa preparadas según el procedimiento de Mancini, Carbonara y Haremans⁵, Fahey y McKelvey⁶.

Los sueros procedentes de casos clínicos comprobados o sospechosos de mieloma múltiple fueron recibi-

dos gradualmente, adicionados de mertiolate al 1:10.000 para prevenir la contaminación y guardados en refrigerador a 20°C. Cada suero fue codificado con un número y referido a él en todos los estudios realizados. A cada uno de los sueros se le practicó una determinación de proteínas totales y se le sometió a un estudio electroforético en papel de acetato de celulosa en el sistema Beckman-Microzona, sólo aquellos sueros que en el estudio electroforético mostraron una definida alteración del patrón electroforético normal, fueron seleccionados para continuar el estudio. Los sueros así seleccionados fueron sometidos a un estudio inmunoelectroforético según la clásica técnica de Williams y Grabar⁷, estudio que fue realizado usando como medio de soporte Agarosa en un tampón de veronal T/2 = 0.05, pH 8.6 adicionado EDTA como agente quelante, en concentración final correspondiente a una solución 0.01 M. Las muestras fueron corridas en un sistema LKB usando un tampón de veronal similar al anterior pero sin EDTA. La electroforesis se hizo a 6v/cm. por 90 minutos, tiempo usado rutinariamente en nuestro laboratorio para este tipo de estudio. Estas muestras siempre fueron corridas en tal forma que un suero patrón normal, formado por la mezcla de 10 sueros de personas normales, fuera corrido simultáneamente como control. Terminado el tiempo de separación electroforética se dispuso en el canal central un suero antihumano total obtenido en cabra y de potencia conocida, las placas

fueron guardadas en cámara húmeda por 18-24 horas para su observación. Aquellas que mostraron alteración en las bandas de inmuno-globulinas, fueron estudiadas en forma similar frente al suero monoespecífico correspondiente. Identificada de esta manera la inmunoglobulina normal, se sometió la muestra a un procedimiento de cuantificación de las inmunoglobulinas con sueros monoespecíficos, mediante inmunodifusión radial, una vez que los halos de precipitación fueron aparentes a las 24-48 horas, se procedió a fotografiarlos utilizando un rollo Panatomic-X (Kodax), usando un sistema de transiluminación (ACCU-LITE).

Después de obtener las ampliaciones, se procedió a medir el diámetro del halo de precipitación (Fig. 1), para cuantificación frente a un patrón de concentraciones conocidas. Los sueros que bajo los anteriores estudios mostraron una franca anomalía fueron estudiados frente a sueros monoespecíficos anti-cadena liviana, con el objeto de determinar a qué tipo podrían pertenecer, de acuerdo con el predominio de uno de los dos tipos conocidos. Estos estudios fueron efectuados utilizando la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony⁸, frente a un suero monoespecífico anti-Kappa o anti-Lambda.

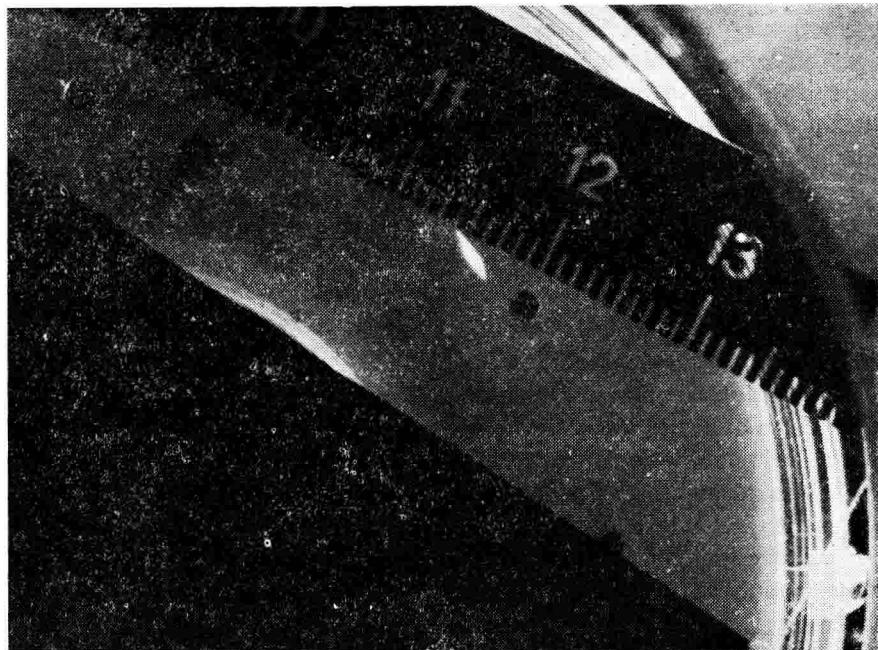


Figura 1

Fotografía que muestra una inmunodifusión radial para cuantificación de Ig. En la gráfica se trata de IgA.

La orina de algunos pacientes fue estudiada para investigación de eliminación de proteínas, particularmente de Bence-Jones, con este fin, la orina de 24 horas fue colectada en recipientes estériles y medida para saber la cantidad exacta excretada y poder determinar la eliminación de proteínas en las 24 horas. La proteína de Bence-Jones fue identificada según la técnica clásica del calentamiento, Davidsohn y Henry⁹, y por concentración 10.1 frente a una solución de Dextrán al 30%. Despues de obtener esta concentración, reducida 10 veces, fue analizada para cuantificar la proteína presente. Igualmente esta muestra fue utilizada para verificar estudios inmunoelectroforéticos similares a los realizados con suero, con el fin de conocer qué tipo de proteínas se estaban eliminando. Una vez conocida la eliminación de proteína de Bence-Jones, ésta fue clasificada frente a sueros monoespecíficos, anti-cadena liviana, en idéntica forma a la que se hizo con los sueros.

Con el objeto de establecer si los estudios electroforéticos en gel de Acrilamida, según técnica descrita por Raymond, Nakamichi y Laurell¹⁰, son de alguna utilidad o superiores a la inmunolectroforesis, unos pocos casos fueron estudiados, tanto en el suero como en la orina por este procedimiento, utilizando un sistema columnar.

RESULTADOS

De los sueros estudiados en el presente trabajo, solamente 10 mostraron en los estudios electroforéti-

cos un trazado anormal sugestivo de una anomalía clonal. En las Figs. 2 a 11 se puede apreciar claramente en qué consiste dicha alteración; se trata de una onda angosta y muy alta que desplaza en muchas ocasiones a la onda correspondiente a la albúmina, con una movilidad Gamma en los casos M-0001, M-0002, M-0004, M-0014 y M-0015, y una movilidad Beta en los casos M-0003, M-0006, M-0009, M-0010 y M-0012. En la misma Fig. 2 encontramos que el resultado de la proteinemia total sólo es anormalmente alto en los casos M-0010, M-0001, M-0003, M-0009, en los otros puede realmente ser considerado normal; sin embargo, la descomposición en los porcentajes relativos muestra un definitivo desplazamiento, en ocasiones cercano al 50% a favor de la proteína anormal, como en el caso: M-0002, con notoria disminución de las otras proteínas. Los estudios inmunoelectroforéticos con suero antihumano, frente a un suero patrón normal, permiten ver la anormalidad en una banda de la zona de las globulinas, tal como puede apreciarse en las mismas Fig. 2 a 11. Para poder observar claramente en qué consiste el defecto en estos casos, se presenta en la Fig. 3 a 12 una ampliación del estudio inmunoelectroforético del Caso M-0001, de un mieloma G. La banda de esta inmunoglobulina es definitivamente anormal si se compara con el patrón normal, y en la Fig. 4, 13 una ampliación del estudio inmunoelectroforético del Caso M-003, correspondiente a un mieloma A. Este tipo de estudio permi-

tió, en la serie presentada, clasificar estos mielomas en tipos G y A de acuerdo con la inmunoglobulina anormal. En este caso 5 (50%) fueron de tipo G y 5 (50%) de tipo A, dato que difiere del de otros autores: Osserman, Takatsuki¹¹, quienes dan un 75% para G y un 25% para A. Los estudios para determinar el tipo de cadenas livianas predominantes, realizado con sueros monoespecíficos anti-Kappa y anti-Lambda, arrojó 7 casos con predominio de Kappa (70%) y 3 con predominio de Lambda (30%), lo cual coincide con lo informado por Osserman y Takatsuki¹¹. En algunos casos, se ve en la zona de la banda gama, el desdoblamiento perfecto que corresponde al tipo de Cadena Liviana más abundante, tal como se señala con una flecha en los casos M-0012 y M-0015. (Figs. 2 a 11). Los estudios inmunoelectroforéticos con sueros monoespecíficos, para la inmunoglobulina anormal frente a un suero normal patrón, muestran claramente el defecto cuantitativo de la inmunoglobulina anormal, el cual es apreciable por la nitidez de la banda de precipitación. Este estudio aunque se realizó en todas las muestras, solamente se presenta en las Figs. Nos. 2 a 11 para los casos M-0014 y M-0015 de mielomas tipo G y los M-0003 y M-0006 de mielomas tipo A. La cuantificación de la inmunoglobulina anormal es quizás uno de los datos más importantes en el estudio, como lo demuestra el cuadro No. 1. Por comparación con los valores medios normales, se ve claramente la desviación

hacia la exagerada síntesis de una inmunoglobulina en particular, con desaparición o marcada disminución de las otras, hecho que está de acuerdo con lo informado por otros autores como McKelvey y Fahay¹². Con excepción del caso M-0006, correspondiente a un mieloma A, en el cual los valores de IgG son normales, los otros muestran disminución en las otras inmunoglobulinas. El M-0015 muestra valores cercanos a los normales en IgM e IgA, quizás porque este paciente presenta además del cuadro de mieloma, un severo cuadro de artritis reumatoidea, con título elevado para factor reumatoide y para anticuerpos anti-DNA, los cuales fueron determinados en este caso, por las técnicas de hemaglutinación pasiva según Roitt¹³, fijación de complemento de Robbins, Holman, Deither y Kunkel¹⁴, y por una técnica de contraelectroforesis similar a la de Culliford¹⁵. Los resultados del análisis de orina, que sólo fue posible realizar en tres casos (M-0003, M-0001 y M-0015), demostraron solamente en dos de ellos (M-0003 y M-0015), proteína de Bence-Jones, la cual estudiada inmunoelectroforéticamente muestra que solamente parte de la proteína eliminada es de este tipo tal como se señala con una flecha en las Figs. Nos. 2 a 11. En ambos casos dicha proteína resultó ser del tipo Kappa. Los estudios de electroforesis en gel de poliacrilamida según la técnica de Raymond, Nakamichi y Laurell¹⁰, se realizaron en el caso M-0003 tanto en suero como en orina y las Figs. 14-15 muestran este resultado.

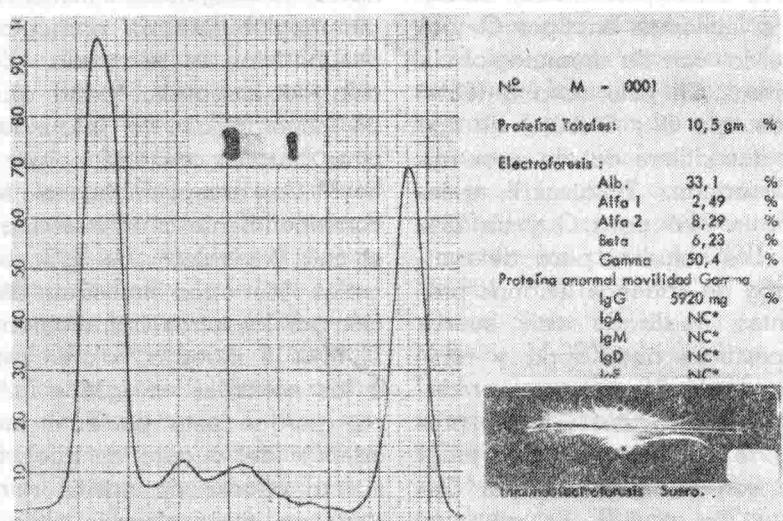


Figura 2

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Ig's.

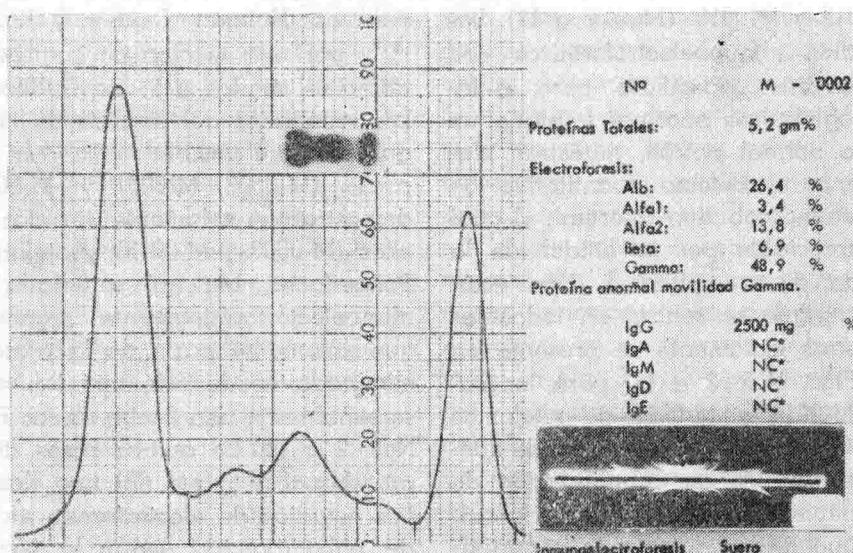


Figura 3

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Ig's.

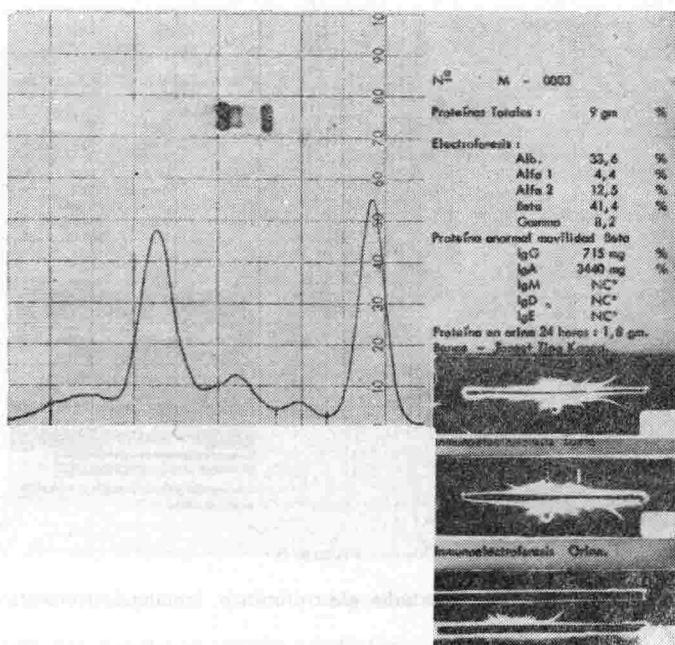


Figura 4

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Igs.

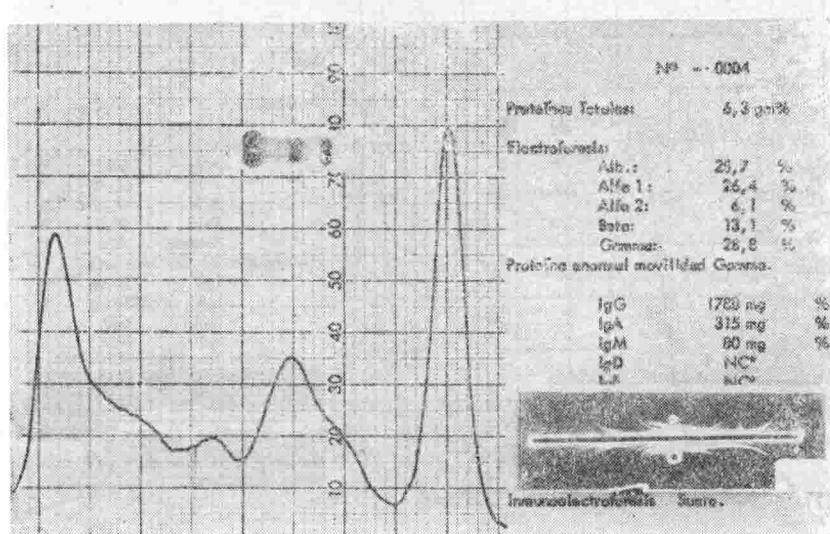


Figura 5

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Igs.

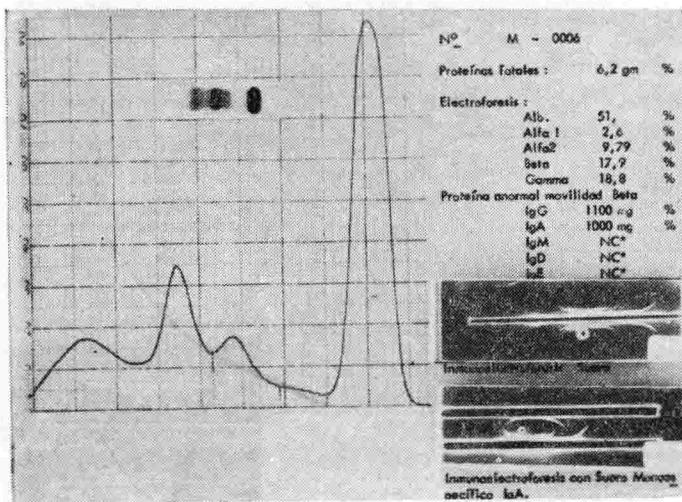


Figura 6

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Igs.

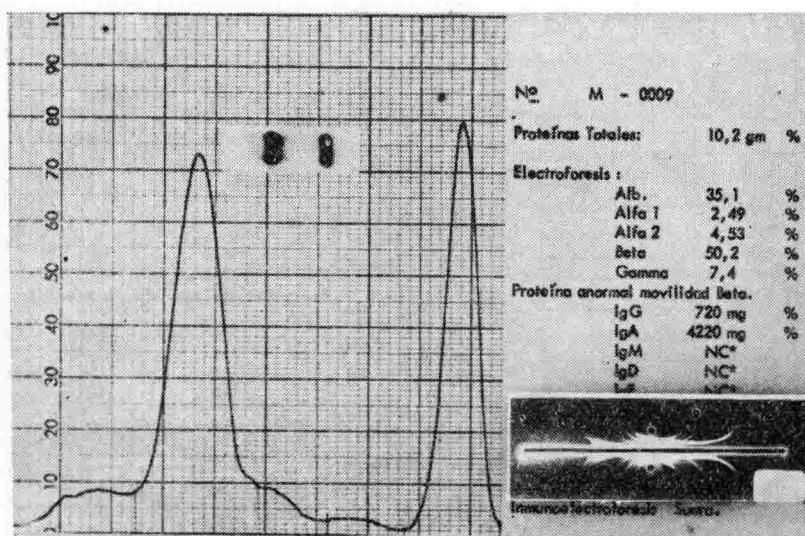


Figura 7

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Igs.

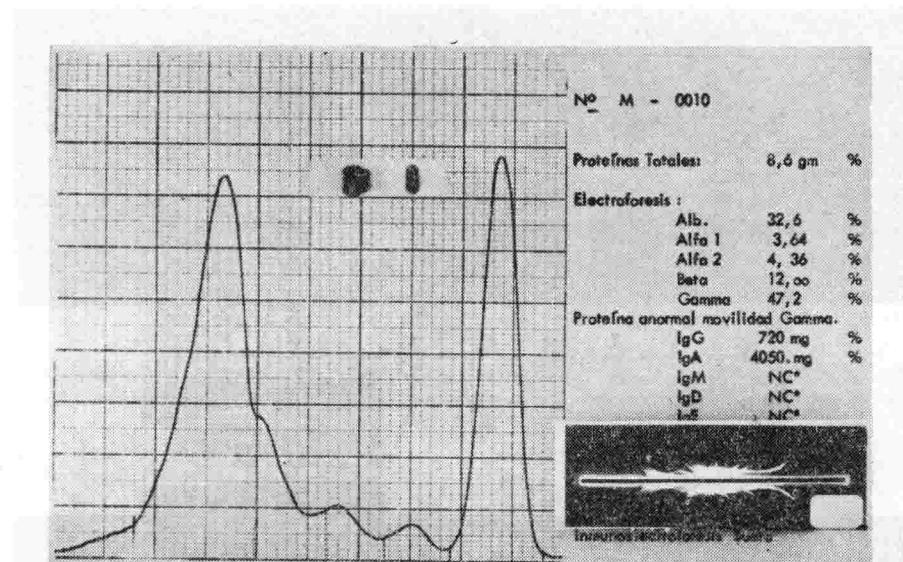


Figura 8

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Igs.

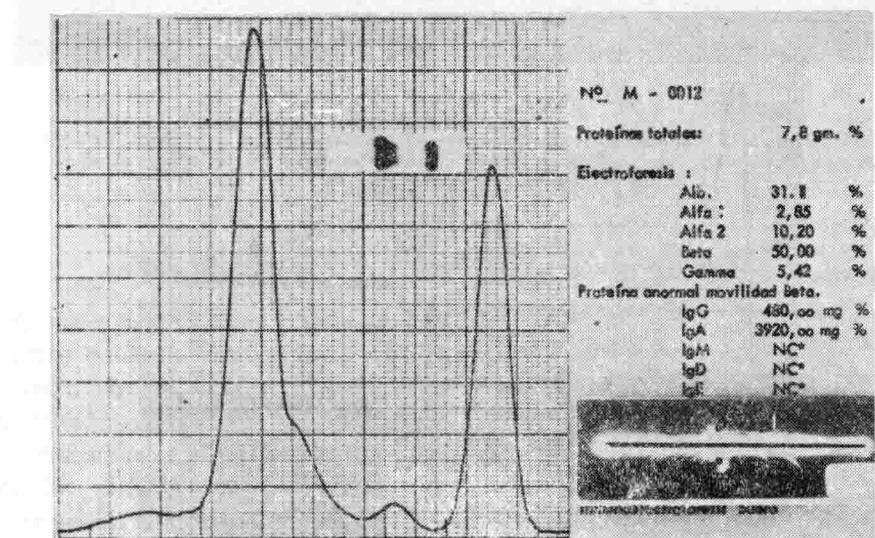


Figura 9

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Igs.

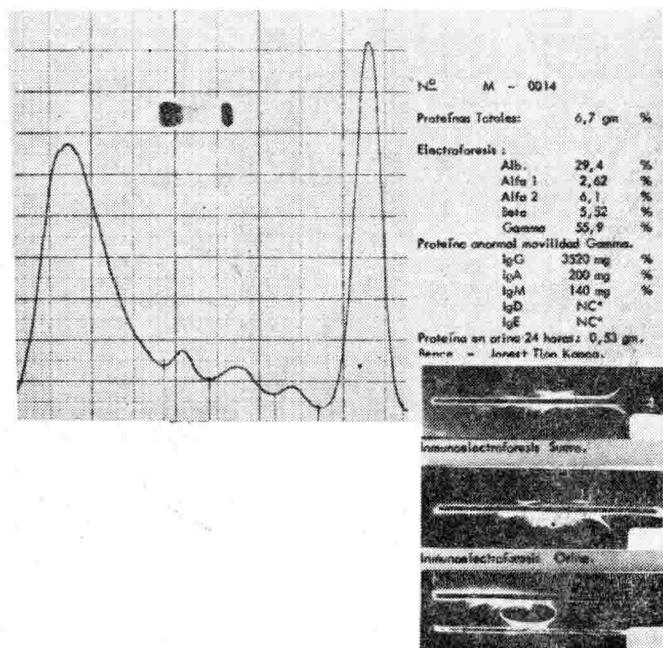


Figura 10

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Igs.

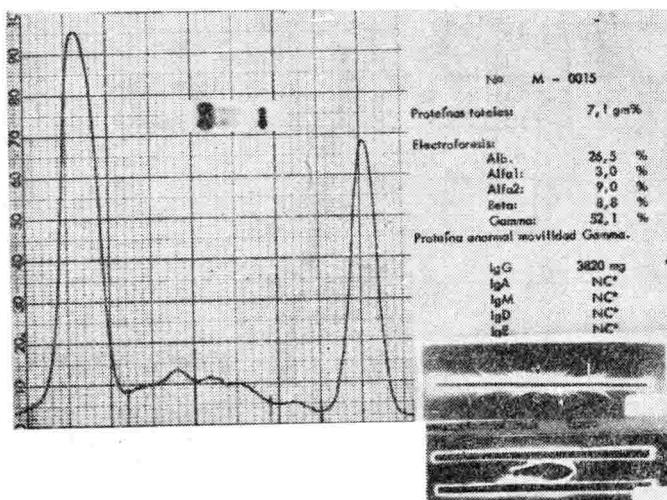


Figura 11

Composición que muestra el estudio electroforético, inmunoelectroforético y de Igs.

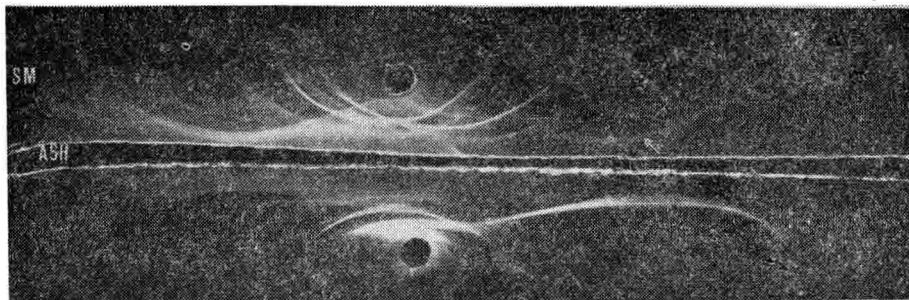


Figura 12

Gráfica correspondiente a la Inmunoelectroforesis del suero M-0001. La flecha señala una banda de precipitación correspondiente a IgG anormal. Compárese con el suero normal patrón inferior.

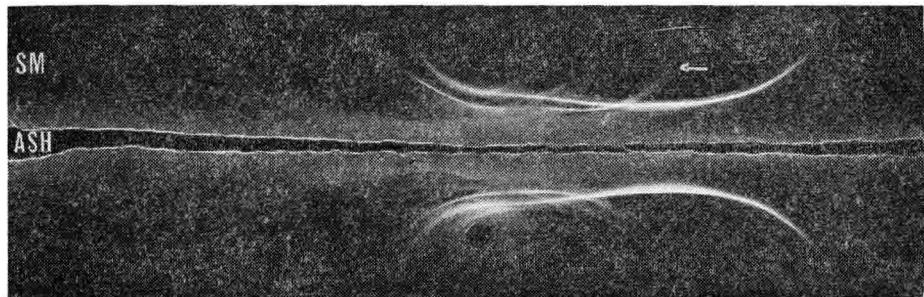


Figura 13

Gráfica correspondiente al estudio Inmunoelectroforético del suero M-0003. La flecha señala la banda de precipitación correspondiente a IgA anormal. Compárese con el suero normal patrón inferior.

DISCUSION

El mieloma múltiple puede considerarse como la entidad más caracterizada de las llamadas discrasias de células plasmáticas, con las cuales guarda estrechas relaciones (Cuadro No. 2). Se caracteriza por la hiperplasia maligna de un clono de células plasmáticas funcionalmente activo y productor de una determinada clase de inmunoglobulina, lo cual justifica plenamente la deno-

minación de entidades monoclonales dada por Waldenstrom¹⁶, constituyéndose de esta manera, en un excelente modelo natural para el complejo estudio de la síntesis de inmunoglobulina, ya que se sabe que en esta entidad sólo se produce una clase de inmunoglobulina, determinando una rigidez del sistema inmunitario. Se tendrá así mielomas de tipo G., cuando el defecto clonal produce exageradamente IgG,

que es el tipo más común de mieloma. En nuestra serie, un 50% son de este tipo. Los mielomas son de tipo A cuando IgA es la inmunoglobulina producida, siendo los segundos en frecuencia; en nuestro caso: 50%. Los de tipo D son mielomas poco frecuentes y en ellos hay hipoperproducción de IgD. Los E sólo llegan a 4 en el mundo y en ellos hay exagerada síntesis de IgE; Johanson y Bennich¹⁷, Ogawa, Kochwa, Smith, Ighizaka y McIntyre¹⁸. Cuando la inmunoglobulina anormalmente producida es IgM tenemos el cuadro de macroglobulinemia de Waldenstrom, Waldenstrom y Malmo¹⁹ y los mielomas tipo M, muy raros por cierto.

Es interesante destacar que en los últimos años se han descrito una serie de entidades relacionadas con el mieloma múltiple o asociadas a procesos malignos del sistema linfóide, en las cuales también una hipoplasia maligna clonal produce una cantidad anormal de la fracción pesada de la molécula de inmunoglobulina. En la actualidad se conocen estos procesos, como entidades de cadena pesada, habiendo sido la primera de ellas la de tipo G, descrita por Franklin, Meltzer, Guggenheim²⁰ y Franklin, Low, Enstein, Bigelow²¹; luego la tipo A descrita por Seligmann, Mihaesco, Hurez²², y posteriormente la tipo M, informada por Ballard, Hamilton, Marcus, illes²³.

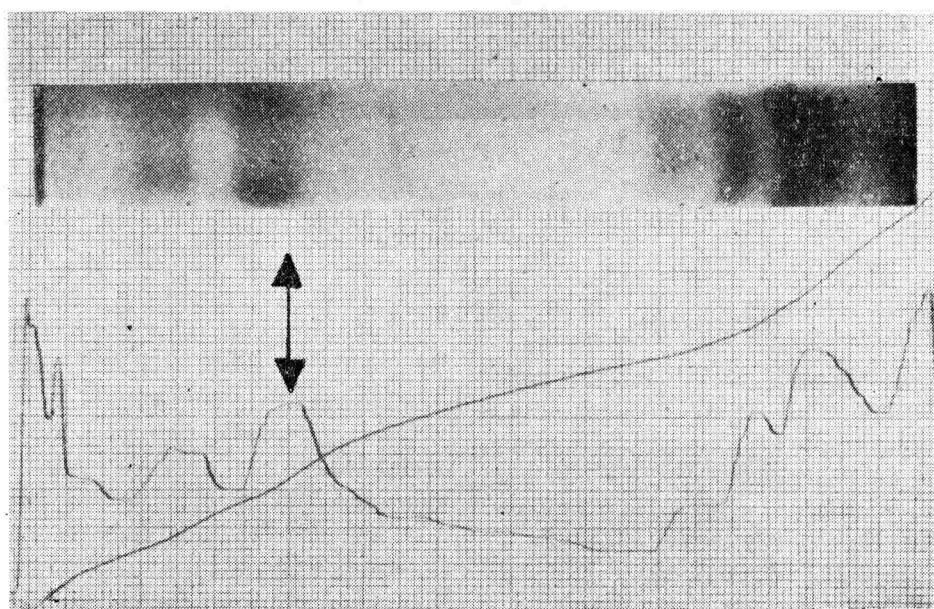


Figura 14

Electroforesis en gel de acrilamida de orina del caso M-0003. La flecha señala la banda correspondiente a proteína de Bence-Jones, tipo Kappa.

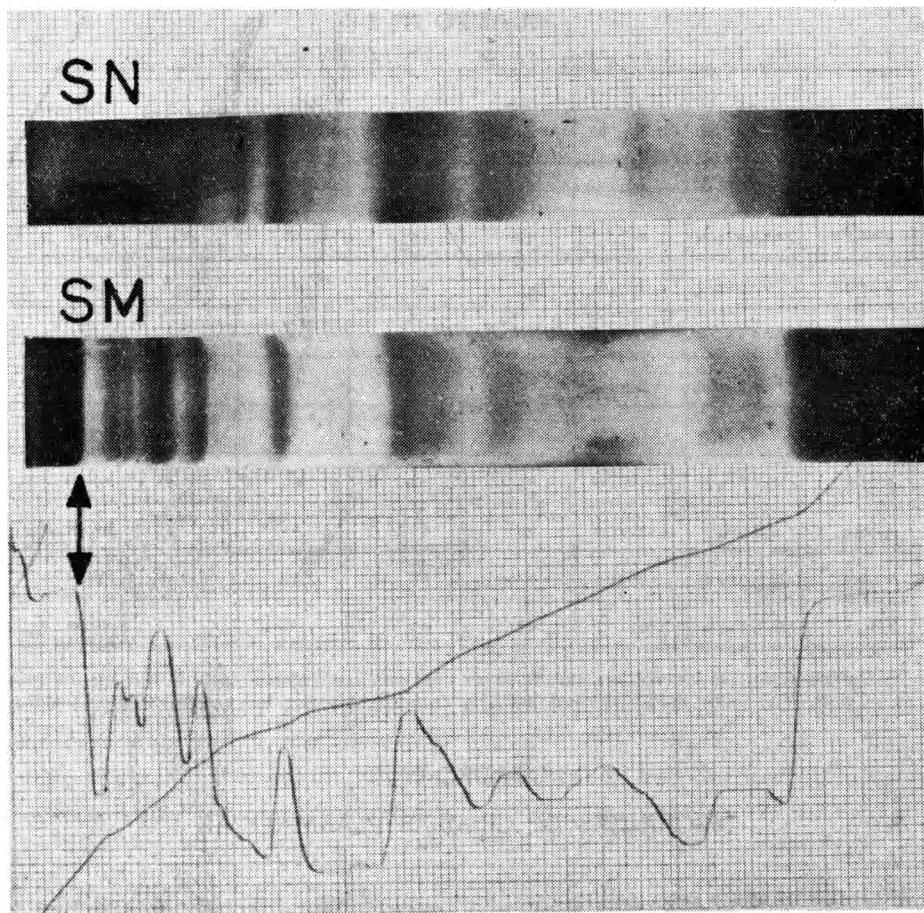


Figura 15

Electroforesis en el gel de acrilamida del suero M - 0003 correspondiente a un mieloma tipo A; la flecha señala la inmunoglobulina anormal. Compárese con el patrón normal superior corrido en las mismas condiciones.

Todas estas proteínas anormales pueden estudiarse en suero o en orina de los pacientes y claramente pueden ser clasificadas como componentes-M, designación inicialmente introducida por Riva, (citado por Janeway y col.²⁴) para indicar a las proteínas anormales encontradas en M-mieloma y en M-acroglobulinemia. Como en la actualidad se en-

cuentran en otras entidades diferentes, el hecho de estar esta denominación muy difundida en la literatura universal, hace que el término de componentes-M deba mantenerse. En el Cuadro No. 3, Guzmán²⁵, se presenta unificada, la clasificación de las entidades en que tales componentes-M se encuentran.

CUADRO N° 1

| CASO N° | IgG . VN:12mg/ml. | IgA VN: 3 mg/ml. | IgM VN: 2 mg/ml. | IgD VN:0.03mg/ml. | IgE VN:0.0005 mg | Bence-Jones | Entidad Clínica |
|---------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-------------|-----------------|
| M-0001 | 59, 20 mg/ml. | N C | N C | N C | N C | | Mieloma G |
| M-0002 | 25, 00 mg/ml. | N C | N C | N C | N C | | Mieloma G |
| M-0003 | 7, 15 mg/ml. | 34,40 mg/ml. | N C | N C | N C | + | Mieloma A |
| M-0004 | 17,80 mg/ml. | 3,15 mg/ml. | 0,8 mg/ml. | N C | N C | | Mieloma G |
| M-0006 | 11,00 mg/ml. | 10,00 mg/ml. | N C | N C | N C | | Mieloma A |
| M-0008 | 7,20 mg/ml. | 42,20 mg/ml. | N C | N C | N C | | Mieloma A |
| M-0010 | 7,20 mg/ml. | 40,50 mg/ml. | N C | N C | N C | | Mieloma A |
| M-0012 | 4,80 mg/ml. | 39,20 mg/ml. | N C | N C | N C | | Mieloma A |
| M-0014 | 32,20 mg/ml. | 2,00 mg/ml. | 1,4 mg/ml. | N C | N C | + | Mieloma G |
| M-0015 | 38,20 mg/ml. | N C | N C | N C | N C | | Mieloma G |

Comparación de los valores normales de Ig's. con los valores encontrados en los mielomas. VN: valor medio normal. NC: no cuantificable por los procedimientos usados.

CUADRO N° 2

DISCRACIAS DE CELULAS PLASMATICAS

1. — Mieloma Múltiple:

Plasmocitomas:

- a. — Solitario
- b. — Múltiple
- c. — Extramedular

2. — Macroglobulinemia de Waldenstrom

3. — Amiloidosis

4. — Enfermedad de cadena pesada G, A y M

5. — Discrasias de células plasmáticas de significancia desconocida.

6. — Discrasias de Células Plasmáticas:

A. — Asociada con infección crónica.

B. — Asociada con Neoplasmas no reticulares.

Cuadro 3
COMPONENTES - M En suero y orina

| Ig en suero clase | Ig en suero sub-clase | Ig en suero Aliotipo Gm | Ig en suero Cadena Liviana | Ig en suero Aliotipo IV solo en K. | Proteína de Ben- ce-Jones en ori- na únicamente. | Entidad Clínica |
|---|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|--|--|--|
| IgG | I - 2 - 3 - 4 | I - 2 - 3 - etc. | Kappa o Lambda | I - 2 - 3 | KoL | Mieloma G |
| IgA | I - 2 | No | Kappa o Lambda | I - 2 - 3 | KoL | Mieloma A |
| IgD | No | No | Kappa o Lambda | I - 2 - 3 | KoL | Mieloma D |
| IgE | No | No | Kappa o Lambda | I - 2 - 3 | KoL | Mieloma E |
| IgM | I - 2 | No | Kappa o Lambda | I - 2 - 3 | No | Macroglobulinemia de Waldenström. |
| Cadenas pasadas en en suero y orina G | I - 2 - 3 - 4 | I - 2 - 3 - etc. | No | No | No | Enfermedad de cadena pasada asociada a linfoma |
| A | I - 2 | No | No | No | No | |
| En suero cadena pasada M | I - 2 | No | No | | KoL | |

Componentes - M en suero y orina y entidades clínicas con las cuales se asocia.

El mieloma múltiple es por lo tanto una entidad de importancia clave en la Inmunología y el suero de estos pacientes constituye un material preciado para el estudio del inmunólogo. Ha sido el estudio inmu-noquímico de estos sueros lo que permitió determinar que, la llamada proteína de Bence-Jones²⁶, corresponde en realidad a las cadenas livianas de la molécula de inmunoglobulina; Korngold y Lipari²⁷, Edleman y Gally²⁸; su estudio en detalle permitió llegar a determinar la secuencia de aminoácidos que constituyen tanto la porción variable como la constante; Wu y Kabat²⁹. Igualmente fue el estudio inmu-noquímico de un mieloma, el que permitió que Rowe y Fahey^{30 31} descubrieran la existencia de la IgD, cuya actividad biológica normal está todavía por esclarecer, y fue también el estudio inmu-noquímico de un mieloma el

que llevó a Johanson y Bennich¹⁷ a descubrir la llamada entonces IgND, que resultó corresponder a la inmunoglobulina que Ishizaka e Ishizaka³² habían venido asociando en los fenómenos de hipersensibilidad y que hoy conocemos como IgE, cuya importancia biológica es grande; Stanworth³³. Es por lo tanto importante que, frente a un caso de mieloma múltiple, aparte de los estudios puramente médicos indispensables para establecer el diagnóstico y tratamiento así como la valoración posterior de éste, se hagan los estudios inmunológicos exhaustivos, porque el suero de un mieloma casi siempre revela aspectos que para el inmunólogo son muy importantes. En nuestro estudio, por ejemplo, nos fue posible establecer cuál es la frecuencia de los dos tipos comunes de mieloma, y cuál el predominio de cadena liviana tipo Kappa o lambda.

Se estableció que la búsqueda de la proteína de Bence-Jones en orina, es un procedimiento delicado, ya que las técnicas de rutina, Davidsohn y Henry⁹, sólo la captan cuando la eliminación diaria es elevada y que los procedimientos de concentración e inmunoelectroforesis son los más sensibles para la investigación. Es también interesante resaltar que nuestros hallazgos coinciden con los de Osserman y Takatsuki¹¹, que no todo mieloma elimina proteína de Bence-Jones y también es claro como se desprende de los estudios de Ballard y col.²³, que esta proteína no es patognomónica del mieloma, ya que también ocurre en la enfermedad de cadena pesada tipo M.

Es importante establecer que en el estudio inmunoquímico del mieloma, los estudios inmunoelectroforéticos en Agarosa son hasta ahora insustituibles; que los estudios en gel de poliacrilamida, si bien dan una excelente resolución, la interpretación, ubicación e identificación de las bandas, es bastante difícil, no siendo por lo tanto útiles en este tipo de estudio. Similar afirmación es dada por otros autores utilizando un sistema de resolución parecido, como es la electroforesis en almidón, según la técnica de Smithis¹⁴, pero que no ofrece ningu-

na ventaja frente a la inmunoelectroforesis, Engle y col.³⁵.

CONCLUSIONES

1. Todo mieloma múltiple debe ser exhaustivamente estudiado desde el punto de vista inmunoquímico.
2. Dicho estudio debe comprender:
 - a) Proteínas totales.
 - b) Electraforesis.
 - c) Inmunoelectroforesis con suero antihumano total.
 - d) Inmunoelectroforesis con suero monoespecífico.
 - e) Estudio inmunológico de cadenas livianas con suero monoespecífico.
 - f) Cuantificación de la Ig anormal.
 - g) Estudio inmunoquímico de la orina de 24 horas.
3. Como estos estudios no siempre son realizables en todos los Laboratorios dado el tiempo de procedimientos y reactivos necesarios, se sugiere que estos sueros podrían ser enviados a un laboratorio de referencia, tal como el Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional para Programas Especiales de Salud (INPES), en donde se realizan sin costo alguno.

RESUMEN

Se presenta el estudio inmunoquímico de sueros procedentes de pacientes afectados de mieloma múltiple. Se encuentra que 50% son del

tipo G y 50% del tipo A. La mayoría, 70%, con predominio del tipo Kappa de cadena liviana y un 30% del tipo Lambda. En sólo 3 casos fue

possible estudiar la orina, encontrándose que dos de ellos tenían eliminación de proteína de Bence-Jones.

Todos, con excepción de dos casos mostraron una disminución de las inmunoglobulinas normales.

SUMMARY

Immunochemical studies of 10 sera from patients suffering of myeloma multiple, are presented. 50% belong to type G and 50% to type A; 70% presented immunoglobulins light chains type. Kappa and 30% type Lambda. Only in 3 cases it was

possible to study the urine, 2 of those cases had Bence-Jones protein. With exception of two cases, the level of immunoglobulins was very low, apart of the abnormal immunoglobulin to which the myeloma, belonged.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento al doctor Bernardo Buitrago, Jefe del Grupo de Patología del INPES, por su valiosa cooperación y sugerencias en el trabajo fotográfico.

Igualmente al doctor Gabriel Cerón, Laboratorio de Biología Celular INPES, por su cooperación en los trabajos de electroforesis en Acrilamida y a la señorita Hilda Inés Sarmiento, por su cooperación en toda la parte técnica.

REFERENCIAS

1. Prom, H. *The preparation of precipitating sera for identification of animal species.* J. Path. Bact. 55: 419-426, 1943.
2. Guzmán, M., y Barbosa, E. *Obtención de suero-monespecífico anti-IgG preparado con antígeno purificados por electro-enfoque.* Aceptado para publicación. Rev. Fac. Med. Bogotá, 1972.
3. Schumacher, K. *Isolierung von Antikörpern vom IgA - Typus.* Z. Klin. Chem. U. Klin. Biochem. 7: 53-55, 1969.
4. Fahey, J. L., and McLaughlin, C. *Preparation of antisera specific for 6.6 S. Gamma-globulins, Beta 2-A-globulins, Gamma-1-macroglobulins and for type I and II Common Gamma-globulin determinants.* J. Immunol. 91: 484-497, 1963.
5. Mancini, G., Carbonara, A. O., and Heremans, J. I. *Immunochemical Quantitation of Antigens by single Radial Immunodiffusion.* Int. J. Immunochim. 2: 235-254, 1965.
6. Fahey, J. L., and McKelvey, E. M. *Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agarplates.* J. Immunol. 94: 84-94, 1965.
7. Grabar, P., and Williams, C. A. *Méthods permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunocheimiques d'un mélange de protéins. Application au sérum sanguin.* Riochim. Biophys. Act. (Amst) 10: 193-194, 1953.
8. Ouchterlony, O. *Diffusion in gel methods for immunological analysis.* Progr. Allergy 5: 1-78, 1958.

9. Davidson, I., and Henry, J. B. **Clinical Diagnosis by Laboratory Methods** 14th Ed. p. 49 W. B. Saunders Co., 1969.
10. Raymond, S., Nakamichi, M., and Laurell, B. **Acrylamide gel as an electrophoresis medium.** Nature 195: 697-698, 1962.
11. Osserman, E., and Takatsuki, K. **Plasma cell myeloma Gamma-globulin synthesis and structure: review of biochemical and clinical data, with description of newly recognized and related syndrome.** Medicine 42: 357-384, 1963.
12. McKelvey, E. M., and Fahey, J. L. **Immunoglobulines changes in disease: Quantitation on the basis of heavy polypeptide chains, IgG, IgA and IgM and of light polypeptide chains type K (I) and type L (II)** J. Clin. Invest. 44: 1778-1787, 1965.
13. Roit, I. M. **Tests for Rheumatoid Factors. Immunology techniques.** World Health Organization, 1967.
14. Robbins, W. C., Holman, H. R., Deicher, H., and Kunkel, H. G. **Complement fixation with cell nuclei and DNA in Lupus Erythematosus.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96: 575-579, 1957.
15. Culliford, B. J. **Precipitin reaction in forensic problems.** Nature 201: 1092, 1964.
16. Waldenström, J. **Studies on conditions associated with disturbed Gamma Globulin Formation (Gammapathies).** Harvey Lect. 56: 211-231, 1961.
17. Johanson, S. G. O., Bennich, H. **Immunological studies of an atypical (Myeloma) immunoglobulin.** Immunol. 13: 381-394, 1967.
18. Ogawa, M., Kochwa, S., Smith, Ch. Ishizaka, K., and McIntyre, O. R. **Clinical Aspects of IgE Myeloma.** New Eng. J. Med. 281: 1217-1220, 1969.
19. Waldenström, J. and Malmö, L. **Macroglobulinémie.** Triangle 3: 262-270, 1959.
20. Franklin, E. C., Meltzer, M. and Guggenheim, F. **An unusual microgamma-globulin in the serum and urine of a patient.** Feb. Proc. 22: 264, 1963.
21. Franklin, E. C., Lowenstein, J., and Bigelow. **Heavy Chain disease. A new disorder of serum Gamma-globulins: report of the first Case.** Amer. J. Med. 37: 332-350, 1964.
22. Seligman, M., Mihaesco, E., and Hurez, D. **Immunochemical Studies in four Cases of alpha Chain disease.** J. Clin. Invest. 48: 2374-2389, 1969.
23. Ballard, H. S., Hamilton, L. M., Marcus, A. J., and Illes, C. H. **A new variant of heavy-Chain disease (Mu-Chain disease).** New Eng. J. Med. 282: 1060-1062, 1970.
24. Jenaway, Ch. A., Rosen, F. S., Merler, E., and Alper, Ch. A. **The Gamma Globulins.** Little, Brow and Co. First Ed. Boston, 1967.
25. Guzmán, M. **Segundo Curso de Immunología Avanzada.** Instituto Nacional para Programas de Salud - INPES, 1970.
26. Jones, H.B. **Papers on chemical pathology.** Lecture III. Lancet 2: 88-92, 1847.
27. Korngold, L., and Lipari, R. **Multiple myeloma proteins. III Antigenic relationship of Bence-Jones proteins to normal Gamma-globulin and multiple myeloma serum protein.** Cancer 9: 262-272, 1956.
28. Edelman, G. M., and Gally, J. A. **Nature of Bence-Jones protein: Chemical similarities to polypeptide Chains of myeloma globulins and normal Gamma-globulins.** J. Exp. Med. 116: 207-227, 1962.
29. Wu, T. T. and Kabat, E. A. **An analysis of the sequences of the variable regions of Bence-Jones Proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementary.** J. Exp. Med. 132: 211-249, 1970.
30. Rowe, D. S., and Fahey, J. L. **A new class of human immunoglobulins II Normal Serum IgD.** J. Exp. Med. 121: 185-199, 1965.
32. Ishizaka, K., and Ishizaka, T. **Identification of Gamma-E antibodies as a carrier of reaginic activity.** J. Immunol. 99: 1187- 1198, 1967.
33. Stanworth, D. R. **Immunoglobulin-E (Reagin) and Allergy.** Nature 233: 310-316, 1971.
34. Smithies, O. **Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults.** Biochem. J. 61: 629-641, 1955.
35. Engle, R. L., Woods, K., Castillo, G., and Pert, J. H. **Clinical and Experimental starch gel Electrophoresis of serum proteins and urinary proteins from patients with multiple myeloma, macroglobulinemia, and others forms of dysproteinemia.** J. Lab. Clin. Med. 58: 1-22, 1961.