

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS DOCTORAL

**Evidencia de altos niveles de IgA polimérica en el suero de  
pacientes con GN mensaginal con depósitos de IgA  
(Enfermedad de Berger)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Margarita López Trascasa**

DIRECTOR:

**Jesús Egido de los Rios**

Madrid, 2015

T1 577.1

LOP

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS.



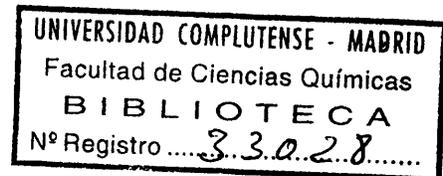
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322347762

"Evidencia de altos niveles de IgA polimérica en el suero de pacientes con GN mesangial con depósitos de IgA (Enfermedad de Berger)";

616521961



Memoria que, para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas, presenta:

Margarita López Trascasa.

Madrid, Mayo 1979.

Esta Tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid; quisiera agradecer la ayuda recibida de distintas personas durante la realización de este trabajo.

Al Dr. D. Jesús Egido de los Ríos, Director de esta Tesis. Su creatividad, apasionamiento y constante estímulo nos mueven continuamente en la búsqueda y resolución de nuevas hipótesis en el estudio de la patogenia de las glomerulonefritis experimentales y humanas.

Al Dr. D. Angel Martín Municio, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, ponente de esta Tesis. Sus orientaciones durante la realización de este trabajo y aportaciones en el enjuiciamiento de los resultados han sido de gran utilidad en la consolidación de esta Tesis.

Al Dr. D. Luis Hernando Avendaño, Jefe del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz. Su personalidad humana y científica estimula y consolida la labor de distintos grupos de trabajo interesados por un mejor conocimiento y tratamiento de la patología renal.

A Jaime Sancho López por su ayuda. Su interés y continuidad en esta línea de trabajo está aportando nuevos datos a la patogenia de esta glomerulonefritis.

Al Departamento de Inmunología, especialmente a los Dres: Fernando Ortiz Masllorens, Pilar Palomino Díaz, Emilio Gómez de la Concha y Angeles García Pardo, por su continua colaboración y aportaciones inestimables en aspectos inmunológicos tanto teóricos como prácticos.

A todos mis compañeros del laboratorio, por su colaboración, ayuda y estímulo en la realización de este trabajo.

A Isabel Navajos, Conchita San Martín y Raquel Ferreiro, por su labor mecanográfica.

## ABREVIATURAS MAS UTILIZADAS

GN	: Glomerulonefritis
Ig	: Inmunoglobulina
IC	: Inmunocomplejo
ASB	: Albúmina sérica bovina
ACF	: Adyuvante completo de Freund
BIS	: N-N´metilen bisacrilamida
TEMED	: N, N, N´N´- tetrametilendiamina
CS	: Componente secretorio
Tris	: Trishidroximetilaminometano
DH	: Difenilhidantoína
SDS	: N-Dodecil sulfato sódico
cpm	: cuentas por minuto
D.E.	: Desviación estandar
rpm.	: revoluciones por minuto
PMN	: Polimorfonucleares
EDTA	: Etilendiaminotetraacético
DTT	: Ditiotreitól
SSF	: Solución Salina Fisiológica
D.O	: Densidad óptica.

# I N D I C E

	<u>Pág</u>
INTRODUCCION	1
GLOMERULONEFRITIS: SU IMPLICACION INMUNOLOGICA	1
1. INMUNOGLOBULINAS	1
1.1 Introducci3n	1
1.2 Clases y subclases de Inmunoglobulinas	2
1.3 Funciones biol3gicas de las Inmunoglobulinas.	5
1.3.1 Funci3n primaria: Uni3n con el ant3geno.	5
1.3.2 Funciones secundarias	5
Activaci3n del sistema de complemento.	5
Uni3n de las inmunoglobulinas a c3lulas.	6
Transporte a trav3s de membranas	6
2. INMUNOGLOBULINA A	7
2.1 Introducci3n	7
2.2 Inmunoglobulina A humana	8
2.3 Aislamiento de la IgA	9
2.4 Formas moleculares de la IgA. Sus propiedades f3sico-qu3micas.	10

	<u>Pág.</u>
2.4.1 IgA monómero	10
2.4.2 IgA polimérica	11
2.4.3 La cadena J	12
2.4.4 La IgA secretora	14
2.4.5 Intervención de la cadena J en la unión al componente secretorio.	14
2.5 Origen, distribución y diferenciación de las células productoras de IgA	18
2.6 Catabolismo de la IgA	21
2.7 IgA como anticuerpo	22
2.8 IgA en distintas enfermedades	25
2.8.1 Aumento secundario o policlonal en la IgA.	25
2.8.2 Aumento monoclonal de IgA	26
Mieloma IgA	26
Enfermedad de las cadenas $\alpha$	27
2.8.3 Déficit de IgA	27
2.9 Cuantificación de IgA	28
Radioinmunoensayo	29
Técnica de doble anticuerpo	29
Esquema de la separación con doble anticuerpo	29
 3. GLOMERULONEFRITIS. DOS MODELOS PATOGENICOS DE DA ÑO GLOMERULAR.	 31
Lesiones glomerulares causadas por anticuerpos capaces de reaccionar con antígenos de la mem brana basal glomerular.	 31
Lesiones glomerulares causadas por complejos - antígeno anticuerpo.	 32

	<u>Pág.</u>
4. GLOMERULONEFRITIS MESANGIAL POR DEPOSITOS DE IgA (ENFERMEDAD DE BERGER).	34
4.1 Introducción	34
4.2 Características generales	36
4.3 Patogenia de la Glomerulonefritis Mesangial IgA.	39
4.3.1 Papel del mesangio en condiciones fi- siológicas y patológicas.	39
4.3.2 La Enfermedad de Berger como nefropa- tía por inmunocomplejos en la que la IgA sería el anticuerpo o el antígeno.	43
4.3.3 La presencia de una IgA anómala como responsable de la enfermedad de Berger	45
4.4 Otras glomerulonefritis con depósitos predo- minantes de IgA a nivel mesangial.	47
4.4.1 Glomerulonefritis mesangial IgA del - síndrome de Schönlein-Henoch	48
4.4.2 Glomerulonefritis de la cirrosis alco- holica	49
5. OBJETIVOS DEL TRABAJO	51
6. MATERIAL Y METODOS	54
6.1 Material	
6.1.1 Pacientes	54
6.1.2 Obtención de las muestras de suero	54
6.1.3 Reactivos y componentes especiales	55

	<u>Pág.</u>
6.1.4 Aparatos	56
6.1.5 Composición de tampones y soluciones más utilizadas	56
6.2 Métodos	57
6.2.1 Técnicas comunes más utilizadas	57
Aislamiento de IgA mediante electroforesis en almidón.	57
Aislamiento de IgM humana	58
Aislamiento de IgG de conejo	59
Inmunodifusión doble bidimensional	60
Inmunoelectroforesis	60
Obtención del suero de cobaya IgG de conejo.	61
Marcaje de proteínas con $^{125}\text{I}$	62
Electroforesis en gel de poliacrilamida urea.	64
Obtención de componente secretorio libre.	67
Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en SDS	69
6.2.2 Filtración en gel de Sephadex	73
6.2.3 Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa	74
6.2.4 Radioinmunoensayo de IgA	75
Obtención del antígeno	75
Marcaje de la IgA con $^{125}\text{I}$	76

Titulación del suero de cobaya ( $\alpha$ -IgG de conejo).	76
Valoración del primer anticuerpo	76
Verificación de la potencia de cada lote de suero $\alpha$ -IgG de conejo.	77
Realización del análisis	77
Análisis de variables	79
Aplicación de este radioinmunoensayo al estudio de la IgA sérica	79
6.2.3 Aislamiento de IgA	80
Aislamiento mediante electroforesis en almidón.	80
6.2.4 Reducción-Alquilación	81
6.2.5 Detección de la cadena J	82
6.2.6 Afinidad por el componente secretorio	82
Pruebas de afinidad del componente secretorio por la IgA polimérica	83
7. RESULTADOS	84
7.1 Filtración en gel de Sephadex	84
7.2 Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa	89
7.3 Radioinmunoensayo	93
7.3.1 Obtención de la IgA	93
7.3.2 Marcaje de la IgA	93
7.3.3 Titulación del suero de cobaya anti-IgG de conejo	96
7.3.4 Valoración del primer anticuerpo: suero de conejo ( $\alpha$ -IgA humana)	100

	<u>Pág.</u>
7.3.5 Controles	100
Recuperabilidad y efectos inespecíficos	100
Reproducibilidad inter-ensayo	103
Reproducibilidad intra-ensayo	103
Paralelismo entre diluciones	106
Análisis desensibilidad	108
7.3.6 Cálculo de la actividad específica de la IgA- <sup>125</sup> I	108
7.3.7 Estudio cualitativo de la IgA sérica.	110
7.3.8 Fiabilidad del método	120
7.4 Aislamiento de IgA	121
Electroforesis en almidón	121
7.5 Reducción alquilación	124
7.6 Presencia de cadena J	130
7.7 Estudios de afinidad al componente secretorio	131
Obtención del componente secretorio	131
Marcaje del componente secretorio	137
Ensayo de afinidad Cs- <sup>125</sup> I-IgA polimérica	137
7.8 Posible origen secretorio de la IgA polimérica	140
7.9 Resultado del tratamiento de estos pacientes con difenilhidantoína	140
8. DISCUSION	142
9. CONCLUSIONES	154
10. BIBLIOGRAFIA	159

## INTRODUCCION

## GLOMERULONEFRITIS (GN): SU IMPLICACION INMUNOLOGICA

En las dos últimas décadas la utilización de técnicas inmunológicas y de microscopía electrónica en el estudio de biopsias renales humanas y en glomerulonefritis experimentales en muchas especies, han sugerido, que la mayor parte de las glomerulonefritis humanas son de origen inmunológico. (Cochrane y Koffler, 1973).

Dado que el trabajo de esta Tesis ha estado centrado en el estudio bioquímico de ciertas características de la Inmunoglobulina A sérica de pacientes con glomerulonefritis mesangial IgA, vamos a hacer una introducción general a las inmunoglobulinas.

### 1. INMUNOGLOBULINAS

#### 1.1 Introducción

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas, presentes en el suero y otros líquidos orgánicos de todos los vertebrados, no habiendo sido identificadas en los invertebrados. En ellas reside la actividad anticuerpo.

Anticuerpo es un concepto funcional que designa a la proteína que se origina en respuesta a una estimulación antigénica adecuada y es capaz de combinarse específicamente con el mismo antígeno que dió lugar a su formación, o con sustancias de estructura muy similar. El concepto de inmunoglobulina es estructural y

comprende a todas las proteínas que poseen rasgos estructurales comunes característicos, posean o no actividad anticuerpo conocida. Ambos conceptos tienden a unificarse, puesto que todos los anticuerpos son inmunoglobulinas y cualquier inmunoglobulina podría funcionar como anticuerpo contra un posible antígeno, al menos en lo que se refiere a su capacidad de combinación específica. Ya que cada molécula de anticuerpo posee una especificidad dirigida contra un restringido número de antígenos se explica la tremenda heterogeneidad que tiene que existir dentro de estas proteínas a fin de que el mecanismo de defensa del organismo sea completo.

Esta diversidad ha llevado a establecer una clasificación en un pequeño número de clases y subclases sobre la base de diferencias estructurales o antigénicas. El número de clases y subclases varía de una especie a otra (Stanworth y Turner, 1978).

## 1.2 Clases y subclases de inmunoglobulinas

En general, todas las inmunoglobulinas están formadas por cuatro cadenas polipéptidas iguales dos a dos, que se mantienen unidas por puentes disulfuro e interacciones no covalentes. La cadena más larga se la llama cadena pesada H y tiene un peso molecular que varía desde 50.000 a 70.000 Dalton. La cadena corta o cadena ligera L, tiene un peso molecular de 23.000 Dalton. En el hombre existen cinco clases diferentes de moléculas de inmunoglobulinas que se denominan: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE y se

diferencian entre sí en la estructura química de la cadena pesada. Algunas de sus propiedades generales están contenidas en la Tabla de la página 4.

Para designar las diferentes clases de cadena pesada, se utiliza la letra griega correspondiente, es decir, cadena gamma ( $\gamma$ ), mu ( $\mu$ ), alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ) y epsilon ( $\epsilon$ ) para las respectivas moléculas. Asimismo, existen dos tipos diferentes de cadena ligera, que se conocen como lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Cada cadena pesada se puede combinar con cualquiera de las dos cadenas ligeras.

La clase predominante en el hombre es la IgG, que constituye aproximadamente el 80% de las inmunoglobulinas totales del suero. La IgA es la inmunoglobulina que predomina en las secreciones y puede estar presente en el suero como monómero o como polímero. La IgM se presenta generalmente en el suero en forma de pentámero, de un peso molecular de 900.000 Dalton, aunque hay en algún caso también monómeros (7S) (Metzger, 1970). Las inmunoglobulinas IgD e IgE, están en el suero como monómeros (Bennich y Johansson, 1971). Cada clase de inmunoglobulina a su vez se puede subdividir en subclases. Las diferencias entre una subclase y otra se designan con números a continuación de la letra que designa la clase. Se conocen hasta ahora cuatro subclases para la IgG, denominadas:  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ , dos subclases para la IgA:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y dos para la IgM:  $\mu 1$ ,  $\mu 2$ .

PROPIEDADES DE LAS INMUNOGLOBULINAS DEL SUERO HUMANO NORMAL

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Movilidad electroforetica	$\gamma \alpha_2$	$\gamma \alpha \beta$	$\gamma \alpha \gamma_2$	$\gamma \alpha \beta$	$\gamma \alpha \beta$
Coefficiente de sedimentación	6.7 S	7 - 15 S	19 S	7 S	8 S
Peso molecular	150.000	170.000-500000	900000	180000	200000
Porcentaje de carbohidratos	2.6	5 - 10	9.8	10 - 12	11
Vida media (dias)	23	5.8	5.1	2.8	2.3
Concentracion media en suero (mg/ml)	11.4	1.8	1.0	0.03	0.0003
Porcentaje del total de los inmunoglobulinas séricas	74	21	5	0.02	0.002
Porcentaje del pool intravascular catabolizado por dia	6.7	25	18	37	89
Sintesis por dia (mg/Kg de peso)	33	24	6.7	0.4	0.02
Fija el complemento	Si	Via alterna	Si	No	No
Atraviesa la placenta	Si	no	no	No	No

Tomado de (Kyle A.R. y Greipp P.R., Mayo Clin.Proc., 53,719, 1978)

### 1.3 Funciones biológicas de las inmunoglobulinas

Existen dos clases de funciones que son características de toda molécula de anticuerpo.

#### 1.3.1 Función primaria: unión con el antígeno

##### Características de la unión antígeno-anticuerpo

Las reacciones inmunes son altamente específicas, por lo que una población dada de moléculas de anticuerpo tendrá afinidades distintas por antígenos cuya estructura difiera sólo en el más insignificante detalle.

Las fuerzas intermoleculares que contribuyen a la estabilización del complejo antígeno-anticuerpo son las mismas que están implicadas en la estabilización de la configuración específica de proteínas y otras macromoléculas: Fuerzas de Coulomb, Puentes de Hidrógeno, Fuerzas Hidrofóbicas, Fuerzas de Van der Waals.

#### 1.3.2 Funciones secundarias

Participación de un número limitado de reacciones generales o efectoras. Ejemplos de estas funciones son: fijación del complemento, respuesta alérgica, etc.

- Activación del sistema de complemento: La capacidad de las inmunoglobulinas para fijar el complemento es muy variable. La IgG (IgG 1,-2,-3) pueden activar el complemento por la vía clásica. Para la activación del complemento por la vía alternativa se han descrito agregados de IgS (IgG-4, IgA, IgE) y ciertos activadores con inulina, zimosan, bacterias, lipopolisacáridos.

- Unión de las inmunoglobulinas a células: Las inmunoglobulinas poseen la propiedad de unirse a determinados tipos de células por la presencia en la superficie celular de receptores para ellos. Así, en el hombre, los monocitos tienen receptores para IgG-1, e IgG-3 (Huber y Funderber, 1968). Inmunoglobulinas de la clase IgE (Ishizaka, 1970) son capaces de unirse a basófilos y mastocitos. Todas las subclases de IgG y de IgA se pueden unir a neutrófilos, sin una especificidad conocida. Los linfocitos tienen receptores en su superficie para las Igs.

- Transporte a través de membranas: El transporte de inmunoglobulinas a través de membranas epiteliales sirve para proporcionar anticuerpos a las superficies externas del cuerpo. Además, al recién nacido le proporciona una adecuada cantidad de anticuerpos con actividades específicas frente a organismos que pueden serle perjudiciales.

## 2. Immunoqlobulina A

### 2.1 Introducción

Hasta 1956 se conocían dos clases de inmunoqlobulinas denominadas " $\gamma$ -globulinas 19 S" y " $\gamma$ -globulinas 7 S" diferenciadas en base al contenido en carbohidratos y en su peso molecular. La utilización de inmunolectroforesis sugirió que no todas las proteínas de suero de mieloma representaban la fracción  $\gamma$ . Slatter y col., 1955, refirieron que ciertas proteínas de mieloma eran antigénicamente distintas a la " $\gamma$  globulina normal" y postularon la existencia de una globulina  $\beta$  desconocida que tendría su verdadero significado en el suero normal. Partiendo de estos conocimientos, Heremans (1959) demostró que existía una proteína denominada " $\beta x$ " ó " $\beta 2A$ " - con una línea de precipitación definida en inmunolectroforesis; esta proteína era rica en carbohidratos y poseía su entidad física y serológica. Heremans y col., 1959, realizaron el primer fraccionamiento de IgA.

Tomasi y Zigelbaum, 1963, encontraron que la IgA es la inmunoglobulina predominante en las secreciones. La IgA ha sido difícil de definir en

algunas especies, por carecer de criterios para hacerlo. Lo más satisfactorio son la comparación de las secuencias de aminoácidos o de reacción inmunológica cruzada. Por este último criterio, se han identificado moléculas semejantes a la IgA en un gran número de especies de mamíferos y probablemente existe en todos (Fudenberg y col., 1972).

## 2.2 Inmunoglobulina A humana

Esta inmunoglobulina representa un sexto de las inmunoglobulinas séricas. Su concentración en el suero normal oscila entre 110-260 mg%. A diferencia de otras inmunoglobulinas, la IgA tiene una variedad de formas poliméricas con distintos coeficientes de sedimentación.

Las cantidades de esta inmunoglobulina que atraviesan la placenta son mínimas, por lo que en todas las especies estudiadas, incluyendo el hombre, el suero del recién nacido es deficiente en IgA.

La IgG en cambio puede atravesar la placenta y se ha visto que la concentración de IgG fetal alcanza o excede los niveles de IgG materna.

En el hombre la IgA sérica aumenta gradualmente con la edad al final del primer año de vida, ésta represen ta aproximadamente el 20% de la IgA sérica total del adulto. Este aumento progresivo persiste hasta aproximadamen te los 16 años en que la tasa de IgA sérica supone aproximadamente el 75% de la IgA de una persona adulta (Stiehmy y Fudenberg, 1966).

### 2.3 Aislamiento de la IgA

El aislamiento de la IgA, sérica o de exudados, está acompañado de muchas dificultades. Puesto que ninguno de los métodos es válido para preparar grandes cantidades y considerado que la IgA sérica tiene diferentes tamaños moleculares, el aislamiento de la IgA rara vez se realiza para propósitos químicos o inmunológicos. Para el estudio de la distribución de actividades anticuerpos entre las diferentes clases de inmunoglobulinas, se requiere ciertos requisitos con respecto a la representatividad y pureza de la muestra. Además, la IgA representa el 3-4% de contenido total de proteínas en el suero humano normal, por esta razón se prefiere tomar sueros de pacientes con mielomas IgA como fuente de la IgA sérica.

La IgA tiene una definida tendencia a formar complejos con otras proteínas (Heremans, 1960) y esto probablemente da cuenta de la baja recuperación de todos los procedimientos de preparación. Esta circunstancia añadida a la heterogeneidad físico-química de la IgA, hace difícil obtener una preparación verdaderamente representativa de toda la IgA sérica y también es la causa de que la mayoría de las preparaciones pueden ser contaminadas por IgG de movilidad rápida o por IgE. La IgG es fácilmente identificable, en cambio la baja concentración de la IgE la hace difícil de detectar por lo que se consideró en un principio a la IgA como un anticuerpo reaginico. (Heremans y Vaerman, 1962; Fireman y col, 1965; Ishizaka y col., 1963).

Los métodos existentes en la bibliografía sólo dan rendimientos entre 8-10% (Heremans, 1974a) y algunos llegan hasta 22% y 25% (Litman y Good, 1972).

La IgA de pacientes con mieloma es mucho más fácil de purificar que la IgA del suero normal, debido a sus altas concentraciones y relativa homogeneidad.

#### 4.4 Formas moleculares de la IgA. Sus propiedades físico químicas.

La ultracentrifugación de la primera preparación de IgA de suero mostró que esta proteína no era homogénea con respecto al tamaño (Heremans, 1959). Los polímeros de IgA no son artefactos puesto que el Sephadex G-200 también vela a una pequeña cantidad de IgA pesada en suero humano normal (Bennich y Johansson, 1967; Terr . . . y Bentz, 1964).

##### 2.4.1 IgA monómero

Su peso molecular es de 160.000 Dalton. Su contenido en carbohidratos es superior al de la IgG. Al igual que la IgG, carece de estructura helicoidal como lo indican las medidas de dispersión rotatoria óptica (Dorrington y Rockey, 1968). La micrografía electrónica indica que la IgA monómero tiene la forma de Y aplanada con las mismas medidas que la IgG. La IgA tiene una alta carga neta negativa comparada con la IgG, una movilidad electroforética más rápida, que la coloca en la zona de las  $\beta_2$ -globulinas

con extensiones en la zona  $\gamma$ , y  $\alpha_2$ . (Heremans, 1960; Perelmutter y Goodfriend, 1967). Esta alta carga negativa - es debida a la composición en aminoácidos de sus cadenas pesadas y al alto contenido en ácido sialico. La composición en aminoácidos de la IgA 7 S no difiere significativamente de la IgG humana, excepto en su bajo contenido en lisina y alto contenido en cisteína. Estas diferencias, cuando existen, son en las cadenas pesadas puesto que las cadenas ligeras son las mismas en ambas proteínas. El coeficiente de extinción, 1,34 es practicamente el mismo que en la IgG. Es más soluble en H<sub>2</sub>O que la IgG, se comporta como una pseudoglobulina. La IgA sérica humana es precipitada con sulfato amónico a una molaridad entre 1,2-1,8 M a pH 7 (1% de proteína) como la IgG (Schultze y Heremans, 1966). Esta precipitación es reversible sin desnaturalización, pero pueden formarse agregados de IgA. El monómero de IgA posee nueve determinantes antigénicos.

#### 2.4.2 IgA polimérica

Aunque el monómero de IgA representa aproximadamente el 80% de la IgA sérica circulante, existen dímeros y trímeros de IgA con coeficientes de sedimentación entre (9-13) S y formas de tamaño molecular mayor.

La micrografía electrónica muestra que los dímeros tienen estructura de doble Y consistente en dos moléculas de monómero unidas por la región Fc (Munn, 1971). En polímeros mayores las subunidades se agrupan de forma circular alrededor de un centro de forma similar a la IgM.

La polimerización de la IgA ocurre a través de en

laces disulfuro entre grupos -SH de las moléculas de monómero. La regulación de este proceso no está clara. (Heremans, 1974b). En la casi totalidad de polímeros de IgA estudiados se han encontrado la presencia de un polipéptido adicional.

### 2.4.3 La cadena J

La Cadena J (P.M. 15000), es también sintetizada por las células productoras de IgA y probablemente esta cadena contribuya a la estabilización de los polímeros pero no parece requerirse para su formación. La IgM - también contiene esta cadena. Ambas son por muchos criterios, esencialmente idénticas (Imman, 1974). En el dímero de IgA la cadena J está unida por puentes disulfuro y ocupa una posición oculta (Fotografía 1) (Heremans, 1974b)

Su incorporación ocurre concomitante con la polimerización (Raam e Imman, 1973). Este proceso parece ser el resultado de una enzima que reagrupa puentes disulfuro y cuya actividad podría ser el factor regulador de la polimerización.

Experiencias de reducción-alquilación en formas poliméricas de IgA superiores al dímero mostraron (Hauptman y Tomasi, 1975) que la cadena J estaba unida por puentes disulfuro sólo a dos subunidades de la IgA polimérica mientras que las demás están unidas sólo por puentes disulfuro sin interaccionar con la cadena J. Se ha propuesto que la cadena J es sintetizada en los linfocitos y es unida a monómeros para iniciar la polimerización. La polimerización podría ocurrir antes de la secreción de

la proteína por la célula y se ha sugerido que el nivel intracelular de cadena J determina el grado en que el mo número es polimerizado (Parkhouse y Corte, 1973).

Algunos autores (Wilde y Koshland, 1972) sugieren que la cadena J es requerida para la polimerización "in vi tre" de las subunidades de IgM; otros señalan (Kownatski, 1973) que la polimerización de IgM puede ocurrir en ausen cia de cadena J, aunque es más raro, habiendo formación - de polímeros con coeficientes de sedimentación mayores de 19 S. Eskeland, 1974, ha mostrado que aunque la cadena J no es requerida para la polimerización de IgM, puede influir en el modo de reasociación de subunidades y así, en la con formación de la IgM.

La cadena J en la IgA además de dar multivalencia a la molécula, podría conferir un centro básico de estabi lidad frente a agentes reductores que se encuentran a me- nudo en el medio hostil de los fluidos del organismo. Tam- bién puesto que la unión al componente secretorio es rela- tivamente específica para el dímero de IgA, parece que la presencia de cadena J es crítica para la interacción con el componente secretorio y para el transporte posterior y función de los anticuerpos IgA en las secreciones externas. Esto podría explicar la conservación filogenética de la ca dena J por millones de años (Vaerman, 1973) y el hecho de que en muchos animales la mayor parte de la IgA en las se creciones y el suero sea IgA 10 S (Tomasi y Grey, 1972).

La presencia de cadena J en los polímeros de IgA se ha puesto de manifiesto en prácticamente la totalidad de los sueros humanos estudiados. Sólo hay descritas al-

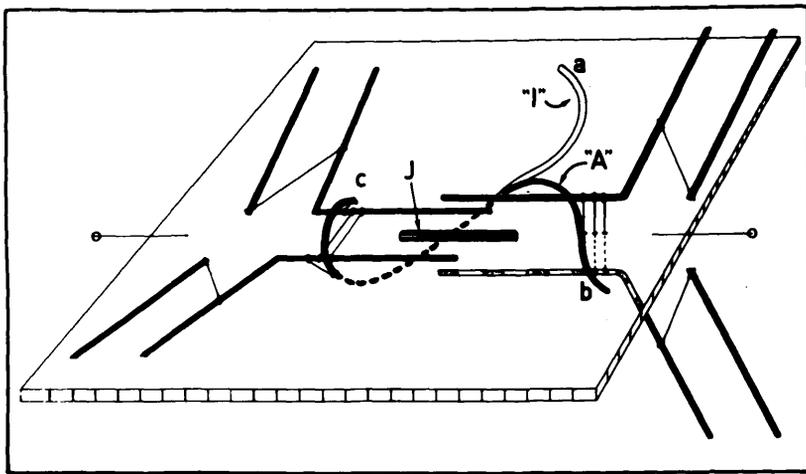
gún mieloma IgA sin este polipéptido. (Tomasi y Czerwinski, 1976; Brandtzaeg y Eskeland, 1976).

#### 2.4.4 La IgA secretora

Consta de dos monómeros de IgA unidos por cadena J, así como de un componente adicional llamado componente secretorio (CS) (Fotog. 1). Esta pieza está enrrollada alrededor de la superficie de la doble hélice Fc, - extendiéndose desde la región gozne de un monómero hacia la región gozne de otro. Tiene un peso molecular de 385.000 Dalton. Es la principal inmunoglobulina presente en algunos fluidos externos, particularmente en las lágrimas, saliva y secreciones de los tractos gastrointestinal y respiratorio.

#### 2.4.5 Intervención de la cadena J en la unión al componente secretorio.

La cadena J parece jugar un papel esencial en el sistema secretorio. (Brandtzaeg, 1978). Su síntesis es iniciada en las células B, después de estimulación antigénica. Los blastos tienden a salir de la circulación hacia las mucosas, su diferenciación favorece la síntesis de IgM pentamérica y especialmente dímeros de IgA que son liberados al líquido intersticial. La nueva configuración de cadenas J unidas a estos polímeros de Igs, o a partes estrechamente asociadas a las subunidades de Igs, constituye un sitio de unión específico para el "componente secretorio" epitelial. Los polímeros de Igs extracelulares podrían unirse espontáneamente a las membranas de las cé-



Fotografía 1: Modelo de IgA dimerica propuesto por Heremans 1974 b.

J - cadena J.

"A" - representa el componente secretorio enrollado alrededor de las 2 subunidades monoméricas de IgA.

lulas conteniendo componente secretorio, por fuerzas no covalentes. Los complejos inmunoglobulina-componente secretorio alcanzan el epitelio secretorio del citoplasma de la célula por pinocitosis y son finalmente excretados a la luz de la glándula en una forma estabilizada. De esta forma, el componente secretorio y la cadena J probablemente representan la "llave y la cerradura" en el transporte de IgA e IgM a través de los epitelios glandulares.

La capacidad de componente secretorio para combinarse espontáneamente y selectivamente con las cadenas J de la IgA e IgM por interacciones no covalentes "in vitro" es ciertamente compatible con su función receptora propuesta "in vivo". Las cadenas J libres muestran sólo una pequeña afinidad por el componente secretorio (Brandtzaeg, 1976b) pero los resultados sugieren que el sitio de unión al componente secretorio en los polímeros se forma por la nueva conformación adquirida con la presencia de la cadena J. Sin embargo se necesitan experiencias adicionales para distinguir claramente ésto y la posibilidad de que la configuración responsable sea inducida en regiones próximas de las cadenas pesadas. Eskeland y Brandtzaeg, 1974, demuestran que la incorporación de cadenas J es necesaria para una unión específica no covalente al componente secretorio. Tomasi y Czerwinski, 1976, mostraron que dos polímeros de IgA deficientes en cadena J formaban complejos con el componente secretorio "in vitro" aunque no en la misma extensión que los polímeros con cadena J. El componente secretorio usado en este caso era bovino y fue utilizado en mayor proporción relativa con relación a la IgA, a lo uti-

lizado por Brandtzaeg, 1976a, los complejos obtenidos en este caso eran de naturaleza covalente. Eskeland y Brandtzaeg, 1974 refirieron que la cadena J determina la afinidad de la IgM por el componente secretorio. Ellos describen una IgM polimérica a la que falta cadena J que no se une al componente secretorio. Brandtzaeg, 1978 ha propuesto que el CS puede actuar como un receptor epitelial para IgA polimérica e IgM y que la cadena J determina la estructura necesaria para unirse al componente secretorio, e indirectamente al transporte en las secreciones. Tomasi y Czerwinski, 1976, sugieren que la cadena J no es requerimiento para la unión de componente secretorio a la IgA. - Algunas IgA e IgM podrían en ausencia de cadena J, tener una estructura que permita la formación de complejos, aunque en menor grado que si está la cadena J. Otra posibilidad no excluye que la unión del componente secretorio a IgA sin cadena J ocurra en un sitio distinto de la molécula que en las IgA con cadena J.

Eskeland y Christensen, 1975, encontraron que una IgM monoclonal sin cadena J contenía hexámeros, teniendo pruebas de que es un producto celular verdadero. La presencia intracelular de cadena J facilita probablemente la formación de especies poliméricas determinadas, pentámeros - en el caso de la IgM y dímeros en el caso de la IgA.

Estos polímeros de IgA sin cadena J eran polímeros verdaderos en el sentido de que estaban covalentemente estabilizados. No es posible en cambio saber si su heterogeneidad refleja polimerización intracelular en ausencia de cantidad suficiente de cadena J o es un artefacto "in vivo" o "in vitro". Estos polímeros no se unían al componente

secretorio. Se ha especulado sobre la posibilidad de que el componente secretorio facilitaría la entrada de IgA extracelular a las células epiteliales glandulares. Un prerequisito para este mecanismo de transporte sería una afinidad específica no covalente.

## 2.5 Origen, distribución y diferenciación de las células productoras de IgA.

Un amplio número de datos experimentales han aparecido para intentar esclarecer la ontogenia de las células productoras de IgA. La información obtenida sugiere que el desarrollo y la distribución de los linfocitos conteniendo IgA es relativamente timo y antígeno independiente. Las células productoras de IgA parece que pertenecen al sistema de inmunocitos B. Aproximadamente el 2% de los linfocitos periféricos en el hombre contienen IgA en su superficie (Citado por Heremans, 1974a).

En cuanto al origen anatómico de la IgA humana se han sugerido dos modelos distintos:

1) Hijmans y col., 1971, han mostrado que la médula ósea por contener un gran número de células que contienen IgA, puede ser mirada como la mayor fuente de la IgA circulante. En sus experimentos usaron 3 marcadores que reconocen específicamente polímeros de IgA: un antisuero que reconoce sólo determinantes poliméricos de IgA, un antisuero frente a cadena J y la capacidad del polímero IgA para unir el componente secretorio (CS) "in vitro".

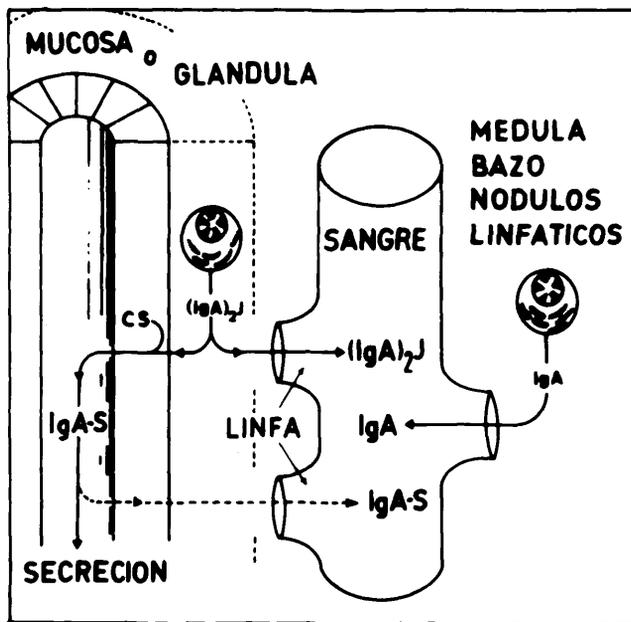
Con estas tres técnicas las investigaciones realizadas en un grupo de mielomas indican que el número de cé

lulas en la médula ósea que fueron positivas para IgA polimérica refleja el nivel de paraproteína IgA polimérica en suero. De modo similar en individuos normales y pacientes no mielomatosos la médula ósea contenía células positivas para marcadores de IgA polimérica en número proporcional con la cantidad de IgA polimérica presente en suero. Estas experiencias de Hijmans y col., 1971; Radl y col., 1974, contribuyen a la idea de que, en el hombre las formas monomérica y polimérica de IgA presente en la circulación, tienen su origen en la médula ósea.

2) Heremans, 1974b, propone que las tres formas de IgA: monomérica, polimérica e IgA secretora (Fotografía 2) tienen un origen distinto.

La IgA monomérica se originará preferentemente en la médula ósea, bazo y nódulos linfáticos. Esto es sugerido por el hecho de que las células conteniendo IgA en estos sitios son numerosas en el hombre pero raras en animales en los que la IgA sérica es ampliamente dimérica (por ejemplo: el gato), mientras que las células mucosas conteniendo IgA son igualmente numerosas en todas las especies. También las células extramucosas conteniendo IgA en contraste con las células conteniendo IgA asociada al epitelio no fijan componente secretorio en secciones de tejido, propiedad que se cree indicativa de la naturaleza monomérica de su producto (Brandtzeq, 1973).

Polímeros de IgA: se originarán preferente en mucosas y sitios glandulares, particularmente en las paredes del intestino, que esta IgA es dimérica es atestiguado por el hecho de que las dos mitades de la molécula de IgA-S -



Fotografía 2: Origen múltiple de la IgA sérica.

(Modelo propuesto por Heremans 1974 b).

son idénticas con respecto al tipo de cadena ligera y al alotipo de la cadena pesada y por tanto no pueden haber sido asociadas al azar o partir de los monómeros IgA del suero, además, en secciones de tejidos el componente secretorio es fijado por las células subepiteliales que contienen IgA. Consideraciones anatómicas exigen que la IgA de las mucosas y sitios glandulares sea conducida a la sangre por la vía de la linfa. Esto ha sido verificado en el perro por experimentos, mostrando que el contenido de IgA de la linfa mesentérica era alrededor de 20 veces mayor que la IgA sérica circulante. En el hombre, la contribución de la IgA intestinal a la IgA sérica es probablemente tan importante como en los animales, pero no se pone de manifiesto este contenido de IgA en la linfa del conducto torácico por causa de una mayor cantidad de IgA monomérica de fuentes extramucosas.

## 2.6 Catabolismo de la IgA

La vida media de la IgA en plasma en el hombre de 5-6 días. El proceso catabólico de la IgA no está influido por la concentración de IgA en suero, permaneciendo normal en pacientes con mieloma y niveles altos de IgA (Drivsholm, 1964).

El catabolismo de la IgA parece realizarse por pinocitosis de forma constante con destrucción endocelular de la IgA (Waldmann y Strober, 1969).

Hopf y col., 1978, observaron que la IgA está unida "in vivo" a la membrana de los hepatocitos del hígado humano normal y en pacientes con varias enfermedades hepáticas.

ticas. Estudios recientes en animales favorecen la hipótesis de que el hígado normal es capaz de concentrar la IgA sérica y transportarla con la bilis al intestino, esta función de transporte puede ser impedida por el daño hepático.

Orlans y col., 1978, observaron una desaparición de IgA sérica polimérica inyectada en ratas; esta IgA es transportada hacia la bilis donde está asociada con el componente secretorio. En ratas en las que se ha ligado el colédoco hay una acumulación de IgA secretoria en sangre (Vaerman y col., 1978) y después del daño de las células hepáticas en ratas o conejos hay un aumento de los niveles de IgA polimérica (Kaatinen, 1978).

El mecanismo de la unión de IgA al hepatocito es desconocido. Pudiera existir un receptor en la membrana que no es específico de especie puesto que hay unión de igual intensidad "in vitro" con células humanas, de conejo y rata. La existencia de dímeros o formas poliméricas de IgA puede ser un prerequisite para la reacción.

## 2.7 IgA como anticuerpo

Los datos sobre la valencia y afinidad de la IgA como anticuerpo, son escasos. Algunas técnicas establecen que los monómeros de IgA son divalentes y los dímeros y la IgA secretoria son tetravalentes, al menos frente a pequeños haptenos que no poseen problemas de impedimento estérico. Esto ha sido comprobado en el hombre - (Terry y col., 1970) y en el conejo (Eisen y col., 1968; Green y col., 1971).

Hay más datos experimentales sobre la función de la IgA secretora que de la IgA sérica. La IgA secretora interviene de manera inespecífica impidiendo que antígenos dañinos pasen al organismo formando complejos estables no absorbibles que se eliminarían de las mucosas por el "cinturón-transportador" representado por el mucus, que actúa como impulsado por la acción ciliar (Sadé y col., 1970).

Tres hechos aparecen como resultado de aparición de reacciones incluyendo anticuerpos IgA: 1. Hay una tendencia general de anticuerpos IgA monómero para ser pobres precipitantes y pobres aglutinadores; 2. El polímero y formas secretorias de IgA realizan mucho mejor estas funciones; 3. Los polímeros pierden sus cualidades precipitantes y aglutinantes cuando se reducen a monómeros. La superioridad de la IgA dimérica como anticuerpo precipitante y aglutinante, es debido en parte a efectos cooperativos entre múltiples sitios de unión.

Se han descrito algunos autoanticuerpos IgA para precipitar o aglutinar en frío (Angevine y col., 1966). Se han visto crioglobulinas IgA-IgG que es posible se comportan como inmunocomplejos (Wager y col., 1968) y ciertos mielomas IgA con actividades diversas: anti-lipoproteína (citado por Heremans, 1974a).

En algunos pacientes con dermatitis herpetiformis se han detectado anticuerpos anti-membrana basal, que eran de la clase IgA (Yaoita y Katz, 1977). En un paciente con mieloma se ha visto que una IgA monoclonal con actividad anti-músculo liso y especificidad para la actina (Toh y col., 1977).

## IgA EN DISTINTAS ENFERMEDADES

### 1) AUMENTO DE LA BIOSINTESIS DE IgA :

Gammapatia policlonal :

Cirrosis hepáticas

Hepatitis aguda

Infecciones agudas o crónicas de mucosas

Gammapatia monoclonal :

Mieloma IgA

Enfermedad de las cadenas  $\alpha$

### 2) DISMINUCION DE LA SINTESIS DE IgA

## 2.8 IgA en distintas enfermedades

Aunque hemos centrado nuestro interés en la implicación de la IgA en la GN mesangial con depósitos de IgA, ésta inmunoglobulina está implicada en muchos trastornos inmunológicos. En algunas de estas anomalías puede haber una producción anormal ya sea por un aumento o por defecto en su síntesis.

### 2.8.1 Aumento secundario o policlonal en la IgA

En la hiperproducción policlonal de inmunoglobulinas típicas de desórdenes asociadas con estimulación antigénica conocida o no, la IgA participa al igual que otras Igs. Hay enfermedades en las que se tiende a favorecer la sobreproducción de IgA sérica como son ciertas condiciones inflamatorias de las superficies mucosas, e infecciones urinarias agudas (Heremans y Masson, 1973), cólera asiático (Waldman y col., 1971) o infecciones branquiales de varios orígenes (Falk y col., 1970; Lewis y col., 1970). En todas estas condiciones la fuente de IgA sérica elevada parece ser la mucosa estimulada. Esto es lo más probable puesto que los aumentos de IgA secretorâ en el suero han sido referidos en el mismo tipo de desórdenes.

A pesar de que la IgA sérica se eleva de forma no significativa en la hepatitis aguda (Tomasi y Tisdale, 1964) esta inmunoglobulina se eleva cuatro veces por encima de su valor normal y se altera su proporción respecto a IgG o IgM en la mayoría de las formas de enfermedades crónicas

hepáticas, especialmente en la cirrosis alcohólica (Feizi, 1968; Tomasi y Tisdale, 1964). Algunos hechos relevantes son: 1) una alta proporción de esta IgA es polimérica (Tomasi y Grey, 1972); 2) la concentración de IgA del conducto torácico linfóide es extremadamente alta, a menudo excede a la concentración en suero (Schumacher y col., 1972) y 3) una importante población de células con IgA se ha visto en los tejidos portal peritubular y conectivo septal (Hadziyannis y col., 1969). En algún caso se ha visto la elevación selectiva de los niveles de IgA sérica en artritis reumatoide (Claman y Merrit, 1966); (Marcolongo y col. 1967).

#### 2.8.2 Aumento monoclonal de IgA

Los dos descritos son mieloma IgA y enfermedad de cadenas  $\alpha$

Mieloma IgA. El mieloma IgA contribuyó al mejor conocimiento de esta inmunoglobulina. En los mielomas IgA hay un aumento del nivel de esta inmunoglobulina que puede ser hasta 10-20 veces superior que en sujetos normales. Además de esta sobreproducción de IgA hay una alteración en la relación de las formas monómero-polímero con respecto al suero humano normal. Con frecuencia una alta proporción de la IgA sérica es polimérica. El contenido de polímeros en los distintos mielomas es diferente. En las formas poliméricas de IgA de pacientes con mieloma se han descrito una serie de funciones biológicas que están ausentes en el monómero (Gavrilova y col., 1977): 1) Transporte a través de barreras epiteliales como resultado de la capacidad de interac

ción con el componente secretorio. 2) Formación de complejos con algunas proteínas séricas ( $\alpha_1$ -antitripsina y albúmina); 3) Interacción con neutrófilos acompañados por liberación de enzimas lisosomales y citoplasmáticas; 4) La afinidad del antígeno por formas oligomeras de IgA es significativamente mayor que por los monómeros (Newcomb e Ishizaka, 1967).

Enfermedades de las cadenas  $\alpha$  La enfermedad de las cadenas  $\alpha$ , la más importante de las enfermedades de las cadenas pesadas, es un desorden proliferativo de células B incluyendo primeramente el intestino delgado y nódulos mesentéricos. La caracterización de esta inmunoglobulina, presenta algunas dificultades y se caracteriza por la presencia de cadenas  $\alpha$ , sin la presencia de cadenas ligeras. La ausencia es debida a un fallo en la síntesis. Fue descrita por primera vez por Seligman y col., 1968. Una característica de estas proteínas es su alta tendencia a polimerizar, en tamaños diversos. Estos polímeros contienen cadena J. Esta enfermedad ha sido descrita sobre todo en grupos étnicos del área mediterránea por lo cual se ha pensado en la existencia de una estimulación antigénica determinada (quizás por microorganismos intestinales) más que en causas genéticas.

### 2.8.3 Déficit de IgA

El déficit de IgA es un hecho bastante común. Una de cada 500 personas presenta esta deficiencia. Puede ocurrir desde el nacimiento o darse más tarde. Aunque algunos individuos afectados son normales, este déficit lle

va asociado frecuentemente desórdenes intestinales y pulmonares, lo cual indica probablemente un déficit de IgA secretoria.

En los déficit de IgA, puede haber un aumento local de IgM e IgG (Brandtzaeg y col., 1968) (Savilakti, 1973). Esta posibilidad de sustitución de la IgA por IgM ó IgG (Ogra y col., 1974) puede dar cuenta de la ausencia de enfermedad aparente en algunos individuos deficientes en IgA.

## 2.9 Cuantificación de IgA

La determinación cuantitativa del contenido de IgA en una mezcla de proteínas se realiza necesariamente con métodos inmunológicos. La técnica más utilizada es la inmunodifusión radial (Mancini y col., 1965). Está basada en la relación cuantitativa que existe entre la cantidad de antígeno colocada en un pocillo hecho en agar - conteniendo antisuero específico y el área del círculo - del precipitado. Cuando en la muestra desconocida existen diferentes grados de polimerización o agregación existe una subestimación de la cantidad de inmunoglobulina (Wasworth, 1976), debido a la formación de precipitados menores con respecto al monómero utilizado como estandar ya que los agregados, inmunocomplejos o polímeros reaccionan con los anticuerpos en el gel como un antígeno multivalente y existe además menor difusión a través del agar.

El radioinmunoensayo, obvia estos inconvenientes y es utilizable para cuantificar IgA de alto peso molecular.

### Radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo o radioinmunoanálisis pertenece a un grupo de técnicas conocidas con el nombre de análisis por saturación (Ekins, revisión, 1974). Las diferencias fundamentales entre radioinmunoensayos radican fundamentalmente en la separación del antígeno marcado libre del unido, el método utilizado por nosotros para cuantificar la IgA fue el de doble anticuerpo.

### Técnica de doble anticuerpo

Consiste en usar un segundo anticuerpo para precipitar el primitivo complejo antígeno-anticuerpo. Las ventajas del método son que puede ser usado prácticamente en todo radioinmunoensayo. La separación es completa, y se puede usar con volúmenes grandes de incubación.

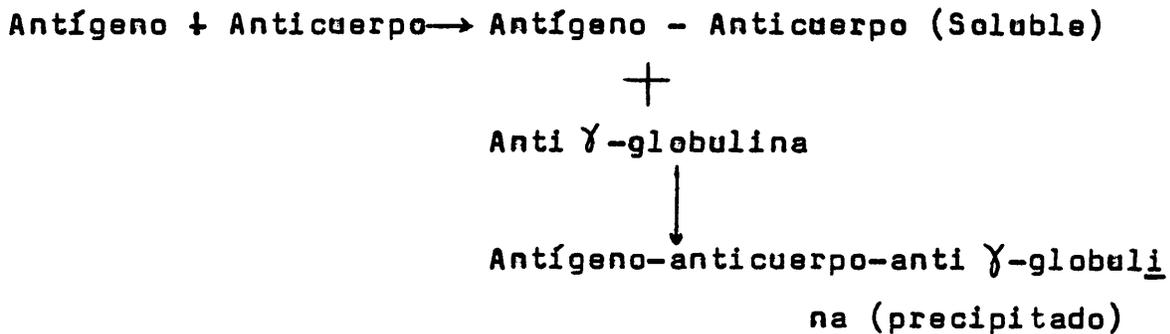
Las aproximaciones a este método incluyen la "post" y "pre-precipitación". En la post-precipitación el segundo anticuerpo, precipita los complejos "antígeno-anticuerpo" mientras que en la "pre-precipitación" el material antigénico interacciona con el primer anticuerpo insolubilizado por precipitación previa con el segundo anticuerpo.

Las condiciones para el método de "post-precipitación" se han establecido en detalle (Midgley, 1967). Para acelerar el proceso de precipitación, se puede utilizar agentes quelantes o calor (por ejemplo: EDTA) para inactivar los componentes del complemento.

### Esquema de la separación con doble anticuerpo

Los anticuerpos dirigidos frente a  $\gamma$ -globulina,

son anticuerpos específicos y los complejos antígeno-anticuerpo no precipitantes, forman agregados mayores que precipitan de acuerdo con el siguiente esquema:



Este es el método más aplicado. La anti  $\gamma$ -globulina se añade al final del período de incubación, como en los demás métodos de separación. El complejo conteniendo el anticuerpo unido a la proteína marcada es separado por centrifugación o microfiltración.

Cuando se usa la centrifugación, es importante que la mezcla de incubación contenga una concentración de  $\gamma$ -globulina suficiente para aumentar la masa antigénica, para que el precipitado permanezca en el fondo del tubo mientras se decanta. Esto se consigue por adición de  $\gamma$ -globulina del animal de la misma especie que el primer anticuerpo como propuso Quabbe (1969) o más sencillo, añadiendo suero normal de la misma especie. Otra posibilidad es añadir 1 ml de solución de almidón al 0.5% antes de centrifugar.

### 3. GLOMERULONEFRITIS. DOS MODELOS PATOGENICOS DE DAÑO GLOMERULAR.

Los resultados de las GN experimentales descritas por Masugi (1933, 1934) y enfermedad aguda del suero, descritas por Schick (1907), Dixon y col., (1958), han proporcionado el conocimiento de los dos tipos patogénicos - por los que el glomérulo puede ser dañado.

#### 1) Lesiones glomerulares causadas por anticuerpos capaces de reaccionar con antígenos de la membrana basal glomerular.

Este mecanismo está basado en la producción de anticuerpos capaces de reaccionar con antígenos localizados en la membrana basal glomerular. La localización de estos anticuerpos es determinada por su especificidad inmunológica. El daño glomerular es mediado por el complemento (Unanue y Dixon, 1964).

Anticuerpos y complemento pueden ser demostrados por inmunofluorescencia en la membrana basal glomerular como un depósito lineal y probablemente atraen a los leucocitos polimorfonucleares (PMN). La degranulación de éstos conduce a la degradación enzimática de la membrana basal glomerular.

Los factores que inician la formación de anticuerpos antimembrana basal son todavía desconocidos.

2) Lesiones glomerulares causadas por complejos antígeno-anticuerpo.

Esta nefritis es causada por el depósito de inmuno complejos circulantes en el mesangio y/o en la pared del capilar glomerular. En todos los casos de enfermedad por inmunocomplejos, tanto en fase temprana como tardía hay de pósitos de componentes del complemento junto con inmunoglo bulinas, fundamentalmente IgG (Dixon y Wilson, 1976).

El depósito de los inmunocomplejos en la pared vas cular durante la enfermedad aguda del suero experimental prototipo de enfermedad por inmunocomplejos, se realiza - gracias a un aumento de la permeabilidad vascular inducida por la liberación de aminas vasoactivas de las plaquetas. La depleción del complemento no inhibe el depósito de los inmunocomplejos, lo que sugiere un mecanismo dependiente de los leucocitos que es responsable de la liberación de las aminas vasoactivas de las plaquetas.

En este sentido se ha demostrado que: 1º, el anti cuerpo responsable de ese mecanismo era de la clase IgE; 2º, el leucocito implicado era el basófilo y 3º, que tras la adición del antígeno específico, los basófilos sensibi lizados por la IgE específica degranulaban y liberaban histamina y un factor agregante de las plaquetas (P.A.F) las cuales a su vez liberan histamina.

Una vez depositados los inmunocomplejos, la activa ción local del complemento, conduce a la atracción y reten ción de polimorfonucleares en el sitio del depósito de los ICs.

Algunas glomerulonefritis humanas pueden englobarse dentro de los dos mecanismos patogénicos descritos.

Así, el lupus eritematoso sistémico, la glomerulonefritis aguda postestreptocócica, son consideradas glomerulonefritis por inmunocomplejos.

En pacientes con síndrome de Goodpasture y en algunas glomerulonefritis crónicas se han detectado anticuerpos antimembrana basal.

La patogenia de muchas formas de GN es todavía desconocida. Aunque la GN mesangial con depósitos de inmunoglobulina A (IgA) fue considerada inicialmente una nefropatía por inmunocomplejos, el origen patogénico de esta glomerulonefritis es desconocido.

#### 4. GLOMERULONEFRITIS MESANGIAL POR DEPOSITOS DE IgA (EN ENFERMEDAD DE BERGER).

##### 4.1 Introducción

Berger describió en 1969 una nefropatía glomerular caracterizada por el depósito de IgA fundamentalmente a nivel mesangial, acompañada a veces de la IgG, por lo que fue denominada nefropatía con depósitos mesangiales de IgA-IgG (Berger y Hinglais), 1968). Posteriormente ha sido llamada con diversos nombres: "GN asociada con inmunoglobulina A" (Lowance y col, 1973), "GN mesangial IgA-IgG focal proliferativa" (Burkholder, 1977), "Enfermedad de Berger" (Levy, 1973).

El mérito de Berger ha sido el contribuir a despejar la confusión reinante en las glomerulonefritis focales. Cualquiera que sea el nombre utilizado, la personalidad propia de la nefropatía con depósitos mesangiales de IgA ha sido reconocida por la mayoría de los autores.

El hallazgo de la IgA a nivel del mesangio glomerular constituye el dato más importante para el diagnóstico. Aparece distribuida de una manera difusa incluso aunque la lesión histológica más notoria sea la focal. Los depósitos de IgA sólo ocasionalmente se localizan a lo largo de la pared capilar.

La IgA puede ser la única inmunoglobulina que se deposite, como ocurrió en 8 de nuestros 45 casos (Perez García y col, 1977), lo que ha centrado la atención sobre esta inmunoglobulina como factor importante en la patogenia de esta nefropatía. No es infre

cuenta que se asocien sin embargo otras inmunoglobulinas como la IgG o la IgM. Pero en los últimos años, el empleo de antisueros realmente monoespecíficos ha hecho que sea cada día más frecuente el hallar la IgA como única inmunoglobulina. La IgE y la IgD sólo se encuentra de manera excepcional.

El fibrinógeno se encuentra positivo en aproximadamente el 50% de los pacientes estudiados (Berger, 1969; McCoy y col., 1974). La distribución es similar a la de las inmunoglobulinas, aunque su frecuencia suele ser más alta en la nefropatía de Schönlein-Henoch (alcanza hasta el 80% de las biopsias), en un paciente determinado no es un dato que permita diferenciarlas.

La fracción C3 del complemento suele hallarse en aproximadamente el 80% de los pacientes con nefropatía de Berger con un patrón mesangial similar al de las inmunoglobulinas. Se ha intentado inferir la vía de activación del complemento a través de las distintas fracciones halladas en la biopsia pero los resultados son conflictivos aunque sugieren que aquella se realiza más frecuentemente por la vía alterna. Varios autores (Sissons y col., 1975; McCoy y col., 1974) han mostrado la presencia de properdina a nivel glomerular mientras que la presencia de C4 ó Clq se considera excepcional.

No existen estudios sobre la clase de IgA depositada a nivel mesangial, y los intentos de demostrar la pieza secretora han sido infructuosos. Igualmente, no existen datos sobre si la IgA depositada contiene cadena J, hecho que hablaría a favor de una IgA polimérica.

Es importante notar que a pesar de que la demostración de IgA a nivel mesangial es imprescindible para el diagnóstico, su presencia no es específica puesto que puede encontrarse en la púrpura anafilactoide (Levy y col. 1976), lupus eritematoso diseminado (Berger, 1969), cirrosis hepática (Manigand y col, 1970) y hepatitis aguda viral (Eknoyan y col, 1972). Los síntomas y signos extrarenales darán, a veces, la clave diagnóstica en estos casos, que sobre todo en la púrpura pueden ser histológicamente indistinguibles de la enfermedad de Berger. Por el contrario, en ausencia de un estudio con inmunofluorescencia, el diagnóstico de enfermedad de Berger es imposible de hacer aunque puede sospecharse por la historia clínica.

#### 4.2 Características generales

Esta nefropatía puede aparecer en cualquier edad, pero suele ser más común en los jóvenes entre los 20-30 años. Es en esa década cuando aparece el primer síntoma, generalmente hematuria macroscópica, o se descubre fortuitamente la nefropatía en un examen de salud. El 85 % de los casos debutó antes de los 35 años en la serie del Hospital Necker (Droz, 1976). El sexo masculino predomina en la mayoría de las series, también en la nuestra (55,5 %) (Perez García y col, 1977).

La frecuencia de esta nefropatía varía de unas regiones a otras del globo. Por razones aún no claras, predomina en al área mediterránea (España, Francia, Italia) de tal forma que en nuestro hospital, esta entidad representó el 26 % de los pacientes biopsiados en 1976.

Por el contrario en los países anglosajones desciende la frecuencia hasta el 4% (Sissons, 1975). Una razón para explicar esta diferencia podría residir en la distinta política en la práctica de la biopsia renal; puesto que en el estudio de la incidencia de proteinuria asintomática en los jóvenes sanos al realizar el Servicio Militar en Singapur, la enfermedad de Berger representó el 34,3% de las nefropatías encontradas (Sinniah, 1976). Por otro lado, aunque la presencia de depósitos de IgA mesangial es muy frecuente en pacientes con hepatopatía alcohólica, como han mostrado estudios realizados por Berger, 1977 es hoy día hipotético relacionar la mayor frecuencia de esta nefropatía en el área mediterránea con la mayor ingesta de alcohol en esta zona geográfica.

La enfermedad no es en principio ni familiar ni hereditaria, aunque la existencia de casos familiares con hematuria benigna recurrente es conocida desde antiguo, no existen estudios de inmunofluorescencia. Gutenberger y col. publicaron en 1970 una familia con trombocitopenia, niveles de IgA sérica elevados y enfermedad renal, pero las descripciones de las biopsias de esos tres pacientes no son típicas de nefropatía IgA.

Otros casos de nefropatía en familiares de estos sujetos han sido citados recientemente (De Werra y col., 1973) pero no existen documentos histológicos que prueben se trate de una mesangial IgA.

Sabatier y col., 1978, han estudiado dos miembros de una familia que eran portadores de esta nefropatía y compartían además el antígeno HLA-Bw35

cuya frecuencia está significativamente aumentada en este grupo de pacientes respecto a un grupo testigo (Noël y col. 1978, Berthoux y col. 1978). Este hallazgo sugeriría una predisposición genéticamente controlada por el sistema mayor de histocompatibilidad. La determinación de los antígenos del Locus D ó DR del complejo HLA, equivalente al Locus Ir del ratón, ayudará a comprender la existencia de una determinada respuesta inmune frente a diversos antígenos.

Desde las primeras descripciones de esta entidad se tenía la idea de que la insuficiencia renal era rara y que por lo tanto, se trataba de una glomerulonefritis benigna. Hoy, con más experiencia en esta entidad y un mayor seguimiento de los pacientes, la aparición de insuficiencia renal se cifra alrededor del 20% al cabo de 20-30 años de evolución, es decir, es una enfermedad lentamente progresiva hacia la insuficiencia renal en una o varias décadas.

La frecuente demostración de IgA a nivel de las arteriolas renales y cutáneas (Baart de la Faille, 1976) sugieren la posibilidad de que en estos pacientes exista una alteración vascular generalizada, probablemente por el depósito de una IgA anómala a nivel de los vasos, y que se expresaría por la frecuencia de hipertensión y el desarrollo progresivo de la insuficiencia renal.

La experiencia de trasplantes renales en pacientes con nefropatía mesangial IgA primitiva no es muy grande. La serie más amplia ha sido publicada por Berger y col (1975). En 9 de los 16 pacientes en los que se realizó el trasplante se observó una recidiva de la enfermedad de

3 meses a 3 años después del aloinjerto.

Hasta la actualidad, dada la escasa experiencia existente, no ha sido posible delimitar los factores que facilitan o promueven la recidiva. La duración de la enfermedad original, el tiempo, de permanencia en hemodiálisis y la realización o no de nefrectomía previa al trasplante no parecen tener ningún papel. Sólo las concentraciones de IgA sérica después del trasplante parece que son más bajas en los sujetos en los que no recidiva la enfermedad que en los que sí lo hace.

#### 4.3 PATOGENIA DE LA GLOMERULONEFRITIS MESANGIAL IgA

##### 4.3.1 Papel del mesangio en condiciones fisiológicas y patológicas.

El conocimiento y la importancia del mesangio ha aumentado considerablemente a lo largo de los últimos años. Ya no se piensa que su papel es meramente de soporte sino que su intervención en el manejo de macromoléculas y en la fisiología glomerular es cada día más importante. (Vernier, 1971), (Maer y col. 1971, 1974) han estudiado recientemente la cinética de la función fagocitaria de las células mesangiales en diversas experiencias en animales. Estos autores han mostrado que la inyección a ratas de macromoléculas, tales como la IgG agregada por el calor, se sigue rápidamente de su localización a nivel mesangial. Al cabo de unas 72 horas las proteínas han desaparecido sugiriendo que el mesangio compete (o forma parte) del sistema retículo endotelial en la eliminación de proteínas extrañas. En ratas con síndrome nefrótico expe-

rimental y nefritis por suero nefrotóxico existió una ma -  
yor captación de las IgG agregadas sugiriendo que alteracio  
nes, incluso pequeñas, de la membrana basal, pueden alterar  
la función mesangial. También se ha visto que con la edad  
el mesangio se altera, siendo en las ratas jóvenes mucho -  
más eficiente en la captación y eliminación del material  
inyectado que en las más viejas.

La relación que existe entre el sistema reticulo -  
endotelial y el mesangio ha sido demostrada en ratas trata  
das con hidrocortisona, que como se sabe, suprimen la acti  
vidad del sistema reticuloendotelial. En estos animales,  
la captación mesangial de IgG agregada estuvo notablemente  
aumentada a las 1, 2 y 24 horas después de la administra  
ción de la IgG agregada. Estos estudios confirman observa  
ciones anteriores de que inmunocomplejos de gran tamaño -  
persisten en la circulación de animales tratados con este  
roides, y que este fenómeno se asocia con el aumento de  
depósito mesangial de dichos complejos.

Otros autores (Mauer y col. 1974) han observado que  
es posible disminuir o aumentar la capacidad mesangial en  
el manejo de agregados inmunes. La sobrecarga del mesangio  
con polisacáridos inertes parece causar "fatiga" del sistema  
de limpieza del mesangio perpetuando el daño glomerular de  
la nefritis nefrotóxica sobre impuesta.

Hoy en día existe una considerable evidencia de que  
las glomerulonefritis focales representan la respuesta del  
sistema mesangial a una amplia variedad de estímulos (Ger  
muth y Rodriguez, 1973). La presencia de depósitos granula

res distribuidos difusamente por el mesangio en la mayoría de las antes llamadas nefritis focales ha hecho pensar, recordando a las nefritis experimentales, que se trate de enfermedades por inmunocomplejos. Desde hace ya unos años se conoce que la cantidad y calidad del anticuerpo determina el tamaño de los inmunocomplejos y de la localización tisular. Así, en el modelo de enfermedad del suero, crónica en el conejo, los animales productores de un bajo nivel de anticuerpos forman complejos de tamaño pequeño (menos de un millón de peso molecular) que se depositan en la pared capilar glomerular resultando una glomerulonefritis proliferativa difusa o membranosa; complejos de mayor tamaño (un millón o más) se localizan predominantemente en el área mesangial y se originan en animales productores de anticuerpos en cantidad intermedia (Germuth y Rodríguez, 1973)

Además de la cantidad, la calidad de los anticuerpos también se ha estudiado en el modelo crónico de la enfermedad del suero. Los anticuerpos no precipitantes de baja avidéz se depositan preferentemente en la pared capilar, mientras que los anticuerpos precipitantes de alta avidéz lo hacen a nivel mesangial (Kuriyama, 1973). Por tanto, parece que los animales capaces de producir complejos de gran tamaño, constituidos por anticuerpos de alta afinidad, tienden a depositarse a nivel mesangial. Estos complejos de gran tamaño fijan bien el complemento, lo que explicaría la frecuencia en la que el C3 se fija a nivel del mesangio.

Recientemente Mañer y col. (1973) han demostrado, en unos elegantes experimentos otro modelo de lesión me-

sangial. Estos autores inyectaron inmunoglobulina humana, agregada por el calor, a conejos; 10 horas más tarde, cuando los agregados ya estaban en el mesangio glomerular, los riñones se transplantaron a conejos normales. Posteriormente, a estos animales se les inyectó intravenosamente anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulina humana observándose una caída del complemento sérico, una infiltración de polimorfonucleares y una proliferación de las células mesangiales con aumento de la matriz mesangial dando el cuadro de una glomerulonefritis focal típica. Estos experimentos demostraron claramente que un antígeno depositado en el mesangio es accesible y capaz de reaccionar con anticuerpos circulantes y activar el complemento produciendo lesión glomerular.

Si se acepta que la función de las células mesangiales en el hombre es similar a las de los animales de laboratorio, varias son las posibilidades para explicar la patogenia de la glomerulonefritis mesangial. Teóricamente cualquier macromolécula circulante (antígenos, inmunocomplejos, agregados de proteínas, etc) podría depositarse a nivel mesangial y activar la cascada de la inflamación. Incluso el acúmulo continuo de material no antigénico o con nula capacidad de activar la inflamación, podría neutralizar la actividad eliminadora del mesangio dando lugar a una sobrecarga del mismo con el consiguiente incremento de la matriz mesangial.

La presencia de la IgA a nivel mesangial como inmunoglobulina predominante en la enfermedad de Berger ha hecho centrar la atención en esta proteína.

4.3.2 La enfermedad de Berger como nefropatía por inmuno complejos en la que la IgA sería el anticuerpo o el antígeno.

La IgA es conocida como la principal inmunoglobulina del sistema de defensa dirigida contra antígenos virales y bacterianos en las secreciones exocrinas. A pesar de la frecuente aparición de brotes hematúricos asociados a infecciones del tracto respiratorio superior y gastrointestinal, no existe evidencia epidemiológica que implique un determinado antígeno bacteriano o viral como agente causal de estas nefropatías. Lowance y col. 1973, no han conseguido demostrar que la IgA de estos pacientes tuviera capacidad de anticuerpo. La elución de la IgA de las biopsias renales seguidas de la aplicación de suero marcado con fluoresceína contra el antígeno Australia o el antígeno tubular renal fue en su experiencia sistemáticamente negativa. Otra posibilidad es que la IgA tuviera capacidad de anticuerpo contra diversas estructuras mesangiales. Lowance eluyó IgA de muestras de nefrectomía y en 1 de 3 casos pudo demostrar una débil fijación mesangial de este anticuerpo sobre un riñón normal. La posibilidad de que la IgA sirviera de antígeno frente a autoanticuerpos de la clase IgG o IgM parece improbable puesto que no se han hallado anticuerpos de la clase anti-IgA en pacientes con esta enfermedad con una técnica de hemaglutinación pasiva incluso después de la nefrectomía (Lowance y col. 1973). Del mismo modo la IgA se encuentra frecuentemente aislada en el mesangio sin otras inmunoglobulinas. En es

te sentido, en pacientes con deficiencia selectiva de IgA se encuentran frecuentemente anticuerpos Anti-IgA, sin embargo no se han descrito casos de enfermedad renal en ese grupo de sujetos.

Richet y col., (1974) encontraron crioglobulinas séricas en 4 de 44 pacientes con nefropatía mesangial con IgA-IgG. En dos casos se detectó IgA. Lowance sólo ha encontrado crioglobulinas en 1 entre 22 pacientes. Por el contrario, el crioprecipitado pequeño en cantidad, contenía únicamente IgA.

La frecuencia de detección de posibles inmunocomplejos en el suero de dichos pacientes ha variado de un 0% por la técnica del Clq y las células Raji (Tung y col. 1978) a un 26% por la técnica del polietilenglicol y 58% por la inhibición de la formación de rosetas linfocitarias dependiente del complemento (Gluckman y col., 1978). Sin embargo, con estas últimas técnicas en sujetos controles fueron hallados en alrededor del 15%. La interpretación sigue siendo difícil puesto que del mismo modo se han encontrado en alrededor del 37% de los pacientes con síndrome nefrótico y lesiones mínimas, no considerada como modelo de enfermedad por inmunocomplejos.

El complemento se encuentra muy frecuentemente asociado a la IgA a nivel mesangial. Asimismo se sabe que la IgA agregada es capaz de activar la vía alterna del complemento (Gotze y Muller-Eberhard, 1971). La presencia de

Properdina, un componente necesario de la vía alterna ha sido encontrado en más del 50% de estos pacientes (Sissons y col. 1975) así como por otros autores (Zimmerman y Burkholder, 1975), y la ausencia habitual de C4 (que estaría presente si la vía clásica estuviera afectada), es sugestiva de una intervención de la vía alterna del complemento. Por el contrario, el C3 sérico se ha encontrado sistemáticamente normal en la mayoría de las series. También se ha encontrado normal el Clq, C4 y C3PA lo que junto a la incapacidad del suero de los pacientes de degradar el C3 del suero normal al incubado in vitro (Zimmerman y Burkholder, 1975) va en contra de una activación sistémica del C3 por alguna de las dos vías. Uff y Evans (1978), han mostrado recientemente que en casos de mesangial IgA (de la misma forma que en la enfermedad de Schönlein-Henoch) la fijación in vitro del complemento de cobaya ocurre por la vía alterna únicamente. Puede ser que la acumulación mesangial de la IgA sea necesaria para activar el C3 o que la activación del C3 se realice a nivel local glomerular.

#### 4.3.3 La presencia de una IgA anómala como responsable de la enfermedad de Berger

La IgA sérica medida por la técnica de inmunodifusión radial de Mancini se encuentra aumentada en el 50 al 70% de los pacientes (Laguer y col, 1974; Perez García y col, 1977).

Estos datos han sido encontrados fundamentalmente por autores del área mediterránea, mientras que en USA e

Inglaterra los porcentajes son mucho más bajos (Sissons y col. 1975). La explicación de este hecho no está aclarada. Una situación similar a la mesangial IgA ocurre en pacientes con el síndrome de Schönlein-Henoch en los que de manera intermitente, sobre todo coincidiendo con las agudizaciones, se encuentran niveles de IgA elevados. Todo esto ha conducido, junto con la frecuente asociación de cuadros de hematuria en ambas cantidades con una afectación nasofaríngea, a pensar que algún estímulo para la síntesis de IgA pudiera estar operando. Sin embargo diversos autores no han podido demostrar la presencia de pieza secretoria en los glomérulos de pacientes con la enfermedad de Berger o en la nefropatía de Schönlein-Henoch (De Werra y col, 1973) (Dobrin y col, 1975). Tampoco Withworth y col. pudieron demostrar la pieza secretoria en el suero de 20 pacientes con esta nefropatía. Estos mismos autores han hallado niveles elevados de IgA salivar en algunos pacientes. Por el momento, sin embargo, no hay evidencia de la intervención de la IgA secretora en el depósito de la IgA a nivel mesangial glomerular. Para algunos autores, como Lagrue y col., (1974) la presencia de una IgA elevada, podría tener un valor diagnóstico puesto que no se encontró en otras glomerulonefritis primitivas. En nuestras manos un valor muy alto de IgA con una historia de hematurias recidivantes hacen muy sugestivo el diagnóstico de enfermedad de Berger, pero valores moderadamente altos y medios son también a veces encontrados en otras nefropatías como el lupus eritematoso o la glomerulonefritis postestreptocócica (Withworth, 1976).

La recidiva de la glomerulonefritis mesangial IgA en riñones transplantados (Berger y col., 1975) y la desaparición de la IgA mesangial de un riñón injertado que - inadvertidamente presentaba una enfermedad de Berger (Berger, 1979) sugirieron una anomalía sistémica de la IgA - que se depositaría a nivel mesangial.

#### 4.4 Otras glomerulonefritis con depósitos predominantes de IgA a nivel mesangial

Hasta la demostración por Berger de la presencia de IgA a nivel mesangial, este tipo de nefritis ha sido previamente catalogada fundamentalmente como glomerulonefritis focal. Esta entidad podría diferenciarse a dos niveles; por un lado con glomerulonefritis mesangiales - con o sin lesión focal pero con distintos hallazgos de inmunofluorescencia, y por otro con aquellas nefropatías en que la IgA se localiza igualmente en el glomérulo. Entre estas entidades tenemos citada anteriormente la púrpura de Schönlein-Henoch, lupus eritematoso diseminado, y la hepatopatía alcohólica.

En general los hallazgos clínicos e inmunológicos permiten el diagnóstico fácil del lupus sistémico. Además el depósito de IgA en los riñones de estos pacientes suele ser menos intenso y extenso que el de IgG. Aunque Schoenfeld y col., (1978) ha observado un aumento de la IgA sérica en lupus con largos años de evolución, ésta fue siempre normal en el momento del diagnóstico y otros investigadores la han encontrado sistemáticamente normal e inclu

so baja (Alarcón, Segovia y Fishbein, 1972).

#### 4.4.1 Glomerulonefritis mesangial IgA del síndrome de Schönlein-Henoch.

Más compleja es la relación entre la enfermedad de Berger y el síndrome de Schönlein-Henoch. En esta entidad la nefropatía puede variar de mesangial - con cambios mínimos, lesiones focales, a una proliferación mesangial difusa. La inmunofluorescencia es prácticamente idéntica a la de la enfermedad de Berger, con depósitos de IgA, IgG y C3 mesangial y con extensión a las paredes capilares en algunos casos. La mayor frecuencia del hallazgo de fibrinógeno en el mesangio no tiene valor, como es lógico, en un enfermo particular. El diagnóstico diferencial suele hacerse clínicamente cuando junto a los síntomas y signos urinarios se asocian las manifestaciones generales de rash, púrpura, dolores articulares (o artritis) y síntomas gastrointestinales. La edad, aunque no definitiva, puede ser también un elemento a considerar pues alrededor del 50% de los pacientes con este síndrome tienen menos de 5 años. De todas formas la presentación renal sin manifestaciones generales hacen imposible la diferenciación entre ambas entidades. Para algunos autores, sin embargo, no existirían grandes diferencias siendo el síndrome de Schönlein-Henoch una mesangial IgA con manifestaciones generales. Clínicamente comparten muchos aspectos (Levy y - col, 1976) y además existe evidencia del depósito sistémico de IgA a nivel de los vasos de la dermis en ambos ca--

sos (Baart de la Faille, 1976) y del mesangio, junto a la presencia de properdina; la IgA sérica ha sido encontrada también elevada en el Schönlein-Henoch (si bien suele normalizarse fuera de los brotes) y ambos recidivan en el riñón transplantado. Esto ha sugerido que similares mecanismos patogénicos pueden estar implicados con diferencia en edad y naturaleza del agente etiológico modificando quizás la expresión clínica.

#### 4.4.2 Glomerulonefritis de la cirrosis alcoholica.

La relación de la enfermedad de Berger con las lesiones glomerulares de la hepatopatía alcoholica ofrece muchos aspectos de interés. Recientemente se ha demostrado que hasta un 60% de estos pacientes presentan en la autopsia una nefropatía mesangial con depósito de IgA indistinguible de la enfermedad de Berger primitiva (Berger, 1977). Lesiones idénticas se encuentran igualmente - en pacientes con moderado compromiso hepático (esteatosis y/o fibrosis). En la casuística de Callard (1975) la función hepática estaba notablemente normal siendo importante, por el contrario, la hipertensión portal primitiva, y otro asociado a una fibrosis hepatoquística, que eran portadores de glomerulopatía mesangial asintomática. Esto plantea el posible papel de la hipertensión portal en la patogenia de esta nefropatía. La tasa de IgA sérica está también elevada en pacientes con hepatopatía alcohólica e incluso un aumento del componente secretorio y de la IgA dimerica ha sido demostrado (André y André, 1976 a y b).

Se han encontrado anticuerpos circulantes dirigidos contra bacterias procedentes del aparato digestivo (Wright, 1977). Kater y col (1977) han demostrado la presencia de IgA en los sinusoides hepáticos, en las paredes de los capilares superficiales de la piel, en el intestino y en el mesangio renal en pacientes con hepatopatía alcohólica de manera similar a los hallados en la púrpura anafilatoide o la enfermedad de Berger. Para estos autores la IgA agregada o en forma de inmunocomplejos circulantes sería el nexo común de las tres enfermedades.

## OBJETIVOS DEL TRABAJO

## 5. OBJETIVOS DEL TRABAJO

La enfermedad de Berger constituye una de las nefropatías más frecuentes en nuestro medio. Aproximadamente el 26% de las biopsias con GN primitiva en nuestro Centro, en 1976, presentan esta nefropatía.

La patogenia de esta nefritis es desconocida. Inicialmente fue considerada como una GN por inmunocomplejos dado el aspecto granular de los depósitos en las biopsias, en cambio la detección de inmunocomplejos por diversas técnicas se da en pocos casos y en aquellos en que son positivos el porcentaje es bajo.

Algunas características de esta nefropatía son:

- Elevación de la tasa de IgA sérica.
- Presencia de IgA como inmunoglobulina única o dominante en el mesangio glomerular de estos pacientes.
- Recidiva tras el trasplante renal de la enfermedad primitiva en un 56% de los pacientes transplantados.
- La desaparición de la IgA de un riñón transplantado accidentalmente con esta GN a las 6 semanas del trasplante.

Estos hechos han llevado a diversos autores a implicar a la IgA en un papel patogénico y a sentar la hipótesis sobre una posible alteración cualitativa de esta IgA.

No hay en la literatura ningún estudio cualitativo realizado en la IgA sérica de estos pacientes. Conocer más a fondo algunas de las características bioquímicas de la IgA sérica de estos pacientes ha sido el objetivo de nuestro estudio.

El primer abordaje al problema fue realizado mediante filtración en gel de Sephadex de sueros de estos pacientes y la localización de la IgA en los distintos picos por inmunodifusión doble.

Un estudio más detallado de los porcentajes de IgA con distintos coeficientes de sedimentación fue realizado mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Para ello fue necesario utilizar un radioinmunoensayo para poder cuantificar IgA de distintos tamaños moleculares sin errores de difusión. Dado el interés que tenían para nosotros los datos obtenidos con esta técnica, previamente, establecimos su fiabilidad mediante los parámetros siguientes:

- a) Reproducibilidad inter e intra-análisis.
- b) Pruebas de recuperabilidad y efectos inespecíficos.
- c) Paralelismo entre diluciones.
- d) Sensibilidad.

La caracterización de las formas de IgA pesada en estos pacientes fue realizada más profundamente de la siguiente forma:

- Comportamiento frente a reactivos reductores.
- Presencia de cadena J.
- Afinidad por el componente secretorio.

En el Servicio de Nefrología existe un protocolo de tratamiento de estos pacientes con difenilhidantoína, droga que disminuye selectivamente la IgA. Independientemente de seguir la evolución clínica de estos pacientes, se ha realizado un estudio cualitativo de su IgA sérica: pre-tratamiento y a los 3 y 6 meses de estar tomando la droga.

- En 12 de estos enfermos ha sido realizado el tipaje de antígenos del sistema HLA.

MATERIAL Y METODOS

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Pacientes

Se han estudiado 15 pacientes que presentaban GN mesangial con depósitos de IgA establecida por microscopía óptica e inmunofluorescencia. Asimismo se han estudiado pacientes con otras patologías que presentaban IgA sérica elevada y que no tenían nefropatía mesangial IgA, mieloma IgA, ni cirrosis alcoholica, situaciones en las que puede existir una IgA polimérica. Los controles fueron donantes de sangre de la Fundación Jiménez Díaz.

#### 6.1.2 Obtención de las muestras de suero

Las muestras de suero se obtuvieron de los pacientes cuando éstos acudían al Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz por revisiones periódicas.

La sangre extraída sin anticoagulantes se centrifugó durante una hora a 37<sup>o</sup>C para facilitar la retracción del coágulo y a continuación se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. Al suero obtenido se le añadió azida sódica al 1:20000 y se congeló a -20<sup>o</sup>C en alícuotas de 1 ml. Los sueros se analizaron en el plazo de una semana después de su obtención.

### 6.1.3 Reactivos y componentes especiales

Para la realización del trabajo experimental expuesto en esta Tesis se han utilizado, entre otros, los siguientes reactivos y compuestos especiales:

- Sephadex G-25, G-200 superfino (Pharmacia)
- Antisueros comerciales específicos anti-IgA, Anti-IgG, anti-IgM humanos, antisuero humano total, obtenidos en conejo (Operon, Soria-Melguizo).
- $^{125}\text{I}$  para la iodación de proteínas (Amersham)
- Albúmina sérica bovina (Sigma)
- Adyuvante de Freund completo (Difco y Behring)
- Sepharosa 4 B activada con bromuro de cianógeno (Sepharosa-BrCN, Pharmacia)
- Suero de asno anti-proteínas totales de conejo (Behring)
- Ditiotreitól (Sigma)
- Iodoacetamida (BDH)
- Ultrogel AcA34 (LKB)
- Acrilamida (Merck)
- N - metilénbissacrilamida (BDH)
- Azul de Comassie (Merck)
- Dietil amino etil celulosa (DE-AE, Whatman)
- Agar noble (Difco)
- Placas para cuantificar inmunoglobulinas (Kallestad Landerlan)

#### 6.1.4 Aparatos

Han sido utilizados, entre otros, los siguientes:

- Contador de radiaciones, modelo 300 nuclear, Chicago.
- Colector de fracciones, modelo Ultrorac 7000 (LKB)
- Espectrofotómetro ultravioleta, modelo SP1800, Unicam.
- Columnas para cromatografía (Pharmacia)
- Ultracentrífuga Spinco L-2 (Beckman)
- Centrífuga termo-regulable PR-6000
- Calculadora programable, modelo 3000, Olivetti.

#### 6.1.5 Composición de tampones y soluciones más utilizadas

##### Solución salina fisiológica 0.15M (S.S.F.O. 15m)

pH 7.3

Cloruro sódico..... 8,77 g.  
Tampón fosfato disódico/fosfato monopotásico 0.5M..20 ml.  
Azida sódica al 5%..... 10 ml  
Agua hasta 1000 ml.

##### Solución salina fisiológica 0.5M (S.S.F.O. 5M) pH 7.3

Cloruro sódico ..... 29,22 g.  
Tampón fosfato disódico/fosfato monopotásico 0.5M..20 ml.  
Azida sódica al 5%..... 10 ml  
Agua hasta 1000 ml.

##### Tampón borato salino al 0.9% pH 8

Cloruro sódico..... 180 g.  
Acido bórico..... 6,1 g.  
Hidróxido sódico 1N..... 9,75 ml.

Agua destilada hasta 1000 ml.

Ajustar a pH 8

Para su utilización diluir 20 veces.

Tampón veronal/veronal sódico. M: 0.03, pH: 8

Acido 5.5 dietilbarbitúrico (veronal) ..... 2 g.

5.5 dietilbarbiturato sódico (veronal sódico)..... 10g.

Azida sódica al 5%..... 10 ml.

Agua destilada hasta..... 1000 ml.

## 6.2 Métodos

### 6.2.1 Técnicas comunes más utilizadas

#### Aislamiento de IgA mediante electroforesis en almidón.

Ochocientos gramos de fécula de patata se lavaron 3 veces con agua y otras 3 con tampón veronal/veronal sódico pH 8.6.

Después de los lavados, el almidón se depositó en una cubeta de 9 x 50 cm. y se dejó reposar 24 horas, secándose bien el bloque con papel de filtro.

A una distancia de 18 cm. del ánodo se realizó una trinchera transversal de 1 cm. de ancho aproximadamente en la que se depositó el suero. El suero se embebió con el mismo almidón. Los dos extremos del bloque que se conectaron a 2 tanques conteniendo el tampón veronal/veronal sódico, pH 8.6, mediante dos tiras de papel Whatman nº 3 de

la misma dimensión.

La electroforesis se realizó durante 26 horas a 4°C, a un voltaje constante de 400 voltios. Terminada la electroforesis el bloque se secó y cortó en fragmentos - de 1 cm. de ancho. A cada una de estos fragmentos se añadieron aproximadamente 5 ml. de S.S.F.O. 5M, pH 7.3, agitando en un agitador circular lentamente durante 1 hora a 4°C. Las proteínas presentes en el sobrenadante se extrajeron del almidón mediante centrifugación a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. En estos sobrenadantes se analizó la presencia de IgA mediante inmunodifusión doble. Las fracciones ricas en IgA se pasaron por Sephadex G-200 superfino, para purificar de algún contaminante.

En las fracciones conteniendo IgA se realizaron extracciones sucesivas, para obtener la mayor cantidad posible.

La cantidad de IgA total obtenida se cuantificó por inmunodifusión radial en placas comerciales.

Las fracciones con IgA se concentraron por ultrafiltración frente a presión negativa, y se conservó a -20°C. en alícuotas.

#### Aislamiento de IgM humana

La IgM fué obtenida a partir de un suero de paciente con macroglobulinemia de Waldstrom, mediante precipitación con  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$  al 45%, pH 7. El precipitado se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos, y se realizaron 2 lavados en este medio. El precipitado se redisolvió en S.S.F.O. 15M dializándose en este medio hasta eliminar com-

pletamente el  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ .

El dializado se aplicó a una columna de Ultrogel Ac A 34 eluyéndose en condiciones habituales.

Las fracciones conteniendo IgM se concentraron y cuantificaron para su utilización.

#### Aislamiento de IgG de conejo

Se realizó por una modificación del método de Peterson y Sober (1962). 25-30 ml. de suero de conejo se dializaron en membrana Visking 22/32 (tamaño del poro - 2.4 nm) a  $4^\circ\text{C}$ , en tampón fosfato sódico 0.01M, pH 7.6. El suero dializado se centrifugó a 4000 r.p.m. durante - 15 minutos para eliminar sustancias precipitables en este tampón.

El sobrenadante se aplicó a una columna de vidrio (5 x 40) conteniendo una resina de cambio iónico de DEAE Celulosa (DE-11) equilibrada con el mismo tampón fosfato. La elución se verificó en este medio recolectándose fracciones de aproximadamente (5-8) ml. Las fracciones se leyeron por espectrofotometría ultravioleta a 280 nm.

Aquellas fracciones que tenían una  $\text{D.O} > 0.1$  se concentraron por ultrafiltración a presión negativa. La pureza de esta IgG se comprobó por inmunodifusión doble utilizando un antisuero frente a proteínas totales del suero del conejo y con antisuero frente a IgG de conejo.

La concentración de IgG se determinó por espectrofotometría de absorción molecular utilizando un coeficiente de extinción de 1.4.

Esta IgG se utilizó como marcador y como antígeno

para inmunizar cobayas.

### Inmunodifusión doble bidimensional

Se realizó según el método de Ouchterlony (1949). 2 g. de agar se disolvieron calentando al baño maría en 2 l ClNa 0.9% conteniendo azida sódica al 0.05%. Cuando el agar ha fundido se coloca en tubos en alícuotas de aproximadamente 15 ml., conservándose a 4°C. En el momento de utilización es preciso volver a fundirlo, calentando al baño maría. Se depositó la cantidad adecuada de agar en placas petri de plástico sobre una superficie horizontal manteniéndose 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas se guardan en cámara húmeda hasta el momento de ser utilizadas en un plazo de 1 ó 2 días después de formadas:

En cada placa se perforaron varios grupos de 6 pocillos dispuestos en círculo alrededor de uno central utilizando una plantilla como modelo. En el pocillo central se aplicó el antisuero correspondiente y alrededor de él las muestras correspondientes a analizar. Las placas se colocaron en una cámara húmeda, observándose la formación de bandas a las 24 y 48 horas después de la aplicación.

### Inmunolectroforesis

Se realizó según una modificación del método de Sheridegger, 1955.

Se llevo a cabo en placas de 75 x 40 x 2 mm. de gel de agar al 1.25% en tampón veronal/veronal sódico, pH 8.6, 0.03M.

Las muestras se introdujeron en orificios de 1 mm.

de diámetro, practicados en el gel mediante una pipeta Pasteur calibrada, equidistantes del eje longitudinal de la placa de 6 mm y la electroforesis se llevó a cabo en el tampón mencionado, aplicando una caída de tensión de 5 voltios/cm. durante 70 minutos. Tras la electroforesis se practicó en el eje longitudinal de la placa una trinchera de 2 mm. de ancho, se rellenó con el antisuero específico según el análisis y se dejó en reposo en cámara húmeda, observándose el desarrollo de las bandas de precipitación a las 24 y 48 horas.

#### Obtención del suero de cobaya $\alpha$ -IgG de conejo

A cada cobaya se le inyectaron 166  $\mu$ g. de IgG de conejo (1 mg/ml) agregada, mediante calor a 69.5°C, 1 hora. Esta IgG se diluyó al 1:3 en adyuvante completo de Freund (ACF) y se inyectó (1 ml) intramuscularmente en las dos patas traseras, 1 mes después se repite la inyección en las dos patas delanteras. 10 ó 12 días después de la 2ª inyección, se les extrae sangre del corazón, para ver por inmunodifusión si están bien inmunizados. Si la prueba es positiva se les sangra por decapitación.

El suero se almacena a -20°C hasta su utilización. La especificidad del antisuero se comprobó mediante inmunodifusión doble frente a IgG de conejo y suero de conejo normal.

### Marcaje de proteínas con $^{125}\text{I}$

Se realizó utilizando el método de Hunter y Greenwood, 1962, empleando la cloramina T como oxidante débil.

#### Esquema de la reacción:

- 1) 25  $\mu\text{l}$  de la solución de proteína (40-100)  $\mu\text{g}$  en tampón fosfato 0.5M, pH 7.5
- 2) 1mCi de  $^{125}\text{I}$  en 25  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 0.5M, pH 7.5
- 3) 25  $\mu\text{l}$  de cloramina T (1 mg/ml)
- 4) agitar durante un minuto
- 5) 25  $\mu\text{l}$  de metabisulfito sódico (1 mg/ml)
- 6) agitar suavemente 3 ó 4 minutos
- 7) completar hasta un volumen de 2 ml. con albúmina sérica bovina (ASB) al 0.2% en tampón borato salino al 0.9%, pH:8

### Purificación de la proteína unida al $^{125}\text{I}$ del $^{125}\text{I}$ libre

La mayor parte de las veces se realizó mediante diálisis prolongadas en tubo Visking 8/32 (diámetro 2.4 nm) a 4°C.

En el líquido de diálisis se midieron las c.p.m. así como las c.p.m. dentro de la bolsa. A partir de estos datos se determinó el porcentaje de incorporación de  $^{125}\text{I}$  a la proteína.

El porcentaje de  $^{125}\text{I}$  libre en la preparación después de las diálisis, se determinó por precipitación con ácido tricloroacético al 20%.

Esquema de la precipitación:

10  $\mu$ l de proteína -  $^{125}$ I + 0.5 ml de S.S.F.O. 15M + 2mg de ASB

+

0.5 ml de ácido tricloroacético al 20%

↓

centrifugación 20 minutos a 2300 r.p.m.

↓

Medida de cpm  
en sobrenadante

↓

Medida de cpm  
en el precipitado

La proteína marcada con  $^{125}$ I se pasó por una columna de Sephadex G-200 superfino para examinar la posible fragmentación o agregación por el marcaje. La elución se verificó con S.S.F.O. 5M, pH: 7.3.

Electroforesis en gel de poliacrilamida - urea

Se realizó según el método de Reisfeld y Small, 1966.

Reactivos

Gel inferior

<u>Nº de volúmenes</u>	<u>Componentes por 100 ml</u>		<u>pH</u>
	<u>Sustancia</u>	<u>Cantidad</u>	
1	Acrilamida	16 g.	
	BIS	0.8 g.	5.9
	Urea 10 M	hasta 100 ml	
1	Tris	18.15 g.	
	ClH 1 N	24 ml.	
	TEMED	0.24 ml	9.4
	Urea 10 M	hasta 100 ml	
2	Persulfato amónico	0.14 g	
	Urea 10 M	hasta 100 ml	

Gel superior

1	Acrilamida	10 g.	
	BIS	0.8 g.	
	Urea 10 M	hasta 100 ml	
1	Tris	2.23 g	
	PO <sub>4</sub> H <sub>3</sub> 1 M	12.8 ml.	
	TEMED	0.1 ml.	
	Urea 10 M	hasta 100 ml	
2	Rivoflavina	1 mg.	
	Persulfato amónico	0.04 g.	
	Urea 10 M	hasta 100 cm <sup>3</sup>	

Tampón de reservorio superior (pH: 8.91 sin urea)

5.16 g. de Tris

3.48 g. de Glicina

700 ml. de urea 10 M

Agua desionizada hasta 1000 ml.

Tampón del reservorio inferior (pH: 8.07 sin urea)

14.5 g. de Tris

600 ml. de ClH 1 N

Agua desionizada hasta 1000 ml.

Método

Formación del gel inferior (gel de resolución)

Se pone una cantidad constante del gel inferior 2 cm<sup>3</sup> en cada uno de los tubos en los que se va a realizar la electroforesis y antes de que empiece la polimerización, se añade a cada tubo una gota de urea 7 M para evitar la formación de menisco. Se deja polimerizar 30 minutos a temperatura ambiente y se elimina la urea del menisco superior.

Formación del gel superior (gel de concentración)

Se añaden 0.2 ml. de gel superior a cada tubo y se recubren con urea 7M, se polimeriza con luz fluorescente durante 15 minutos y se elimina la urea 7M.

Aplicación de las muestras

Las muestras se aplican en un volumen inferior a 100 µl, añadiendo una gota de azul de bromofenol como marcador. Los tubos con las muestras se llenan totalmente de tampón superior.

Se pone en cada uno de los reservorios la cantidad adecuada de los tampones respectivos (alrededor de 200 ml) y se comienza la electroforesis a una intensidad constante (2.5 ma/tubo). Cuando las muestras han atravesado el gel superior, que observamos por la aparición de una banda infinitamente estrecha en el gel inferior, subimos el amperaje hasta 3.5 ma/tubo. La electroforesis se continúa hasta que el marcador está aproximadamente a 0.5 cm. del extremo anódico.

Terminada la electroforesis se procede a sacar los geles de los tubos ahuecándolos con inyección de agua destilada.

#### Fijación de las bandas de proteínas en los geles

Los geles se fijan en una solución al 5% en ácido tricloroacético y al 5% en ácido sulfosalicílico, con agitación durante 30 minutos.

#### Tinción de los geles

Se realiza en una solución (1:20 en ácido tricloroacético al 5% y sulfosalicílico al 5% de una solución acuosa de azul de Coomassie al 1%, durante una noche.

#### Desteñido

Los geles se destiñen en una solución acuosa de ácido acético al 5% (V/V).

### Obtención del componente secretorio libre

Se realizó según el método de Underdown y col., 1977. Brevemente, este método consistió en lo siguiente:

#### a) Obtención de las proteínas de la leche

La leche humana se obtuvo 3 ó 4 días después del parto y se conservó con azida sódica a  $\approx 20^{\circ}\text{C}$ . Las proteínas se separaron de la parte grasa por centrifugación a 48000 g durante 1 hora.

#### b) Acoplamiento de la Sepharosa BrCN a la IgM de mieloma.

6 g. de Sepharosa-BrCN se lavaron con ClH 0.001 M (3 veces) y posteriormente con tampón carbonato/bicarbonato 0.01 M, pH: 8. A esta Sepharosa BrCN se le añadieron IgM, obtenida según el método descrito, a una concentración de 35 mg/ml de sepharosa. La mezcla se incubó 2 horas a temperatura ambiente y 16 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La proteína no pegada a la Sepharosa se eliminó por sucesivos lavados con tampón carbonato/bicarbonato 0.01 M, pH: 8 y con tampón acético/acetato 0.1 M, pH: 4 - hasta que la densidad óptica del líquido de lavado sea inferior a 0.02.

A la Sepharosa lavada se le añade etanolamina 1 M a pH: 7 para bloquear los grupos activos que le pudieran quedar a la Sepharosa.

Esta Sepharosa se lava para eliminar la etanolamina con tampón fosfato potásico 0.01 M. KSCN 1 M, pH: 7 y con S.S. 0.15 M, pH: 7.3.

c) Separación del componente secretorio libre del suero

A 50 ml de suero se le añaden 450 ml de tampón fosfato/citrato 0.01 M, pH: 6.8, conteniendo 125 mg de sulfato amónico ferroso.

El suero diluido se agitó 2 horas a 4°C y a continuación 200 ml de este suero diluido se incubaron con la Sepharosa-IgM durante 3 horas a 4°C.

La mezcla Sepharosa-IgM y suero se colocó en una columna de vidrio (1 x 20 cm) y se empaquetó la Sepharosa. Después se lavó exhaustivamente la Sepharosa con S.S.F.O. 0.15 M, pH: 7.3 hasta que la absorbancia era < 0.02. La proteína absorbida se eluyó con tampón fosfato potásico 0.01 M conteniendo KSCN 1 M, pH: 7.

La proteína eluida se dializó frente a SS 0.15 M, pH: 7.3. Se concentró y aplicó a una columna de Sephadex G-200 superfino.

La pureza de la preparación del componente secretorio obtenidos se chequeó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y mediante un antisuero (anti-componente secretorio libre).

e) Marcaje del componente secretorio libre

1 mg. de componente secretorio libre se marcó con 1 mCi de <sup>125</sup>I según el método habitual de Hunter y Greenwood, purificándose del <sup>125</sup>I mediante filtración en Sephadex G-25.

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en SDS

Se realizó en placas según una modificación del método de Weber y Orborn, 1975.

Reactivos

Soluciones madre

Acilamida: 30 %

Bisacrilamida: 0.8%

Tampón de Tris

Tris-ClH 1 M, pH: 8.8

Tris-ClH 1 M, pH: 6.8

Tampón para la muestra

	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
SDS al 20%	0.5 ml	2%
Glicerol	0.5 ml	10%
Tris-ClH 1 M, pH: 6.8	0.4 ml	0.08 M
Azul de bromofenol 0.2%	25 $\mu$ l	
Agua	3.1 ml	

Tampón para correr la electroforesis

Para 1 l Concentración final

Tris 30.3 g 0.25 M

Glicina 144.2 g 1.92 M

SDS 10 g 1%

Ajustar a pH: 8.3 si es necesario.

Para usar diluir 10 veces.

Gel inferior

Solución madre de acrilamida	10 ml
Tris 1 M, pH: 8.8	11,2 ml
SDS 20%	0.15 ml
Agua destilada	8.7 ml

Gel superior

Solución madre de acrilamida	1.67 ml
Tris-ClH 1M, pH: 6.8	1.25 ml
SDS 20%	0.05 ml
Agua destilada	7.03 ml

Solución de teñido

Agua	520 ml
Metanol	473 ml
Acido acético	57 ml
Azul de Coomassie	500 mg

Solución de desteñido

Agua	520 ml
Metanol	473 ml
Acido acético	57 ml

El líquido de desteñido puede ser reciclado a través de carbón activo.

### Realización de la electroforesis

- Se colocaron dos vidrios con tiras de plástico en el fondo y a los lados para formar el hueco en el que depositar el gel.
- Aplicar agar al 1% en los bordes exteriores y en la parte inferior para que no pueda haber pérdidas del gel.
- Mezclar los reactivos y añadir 100  $\mu$ l de persulfato amónico al 10% así como 20  $\mu$ l de TEMED.
- Los reactivos se agitan rápidamente y se colocan entre los dos vidrios hasta 2 cm aproximadamente del extremo superior.
- Se añade con cuidado agua destilada ó SDS al 2% en el extremo del gel y se deja polimerizar al menos 30 minutos.
- Después de polimerizado, quitar el agua.
- Mezclar los reactivos del gel superior y añadir 50  $\mu$ l de persulfato amónico al 10% y 5  $\mu$ l de TEMED. Agitar y depositarlo encima del gel inferior.
- Introducir el peine utilizado como molde para hacer las ranuras de aplicación de las muestras y dejar polimerizar.
- Después de polimerizado eliminar el peine bajo corriente de H<sub>2</sub>O.
- Quitar las tiras de plástico.

- Aplicar las muestras. Estas deben ser previamente lioflizadas. Para la aplicación se les debe añadir 20  $\mu$ l - del tampón de la muestra.
- Se rellenan las placas con el tampón de la electrofore-  
sis.
- La electroforesis se comienza a 50 V durante una hora o hasta que el azul de bromofenol alcance el gel inferior.
- Aumentar hasta 100 V y realizar la electroforesis hasta que el marcador (azul de bromofenol) esté casi al final del gel. Quitar las tiras de plástico y sacar el gel.
- El teñido del gel se realiza en la solución adecuada durante una noche.
- Desteñir el gel hasta que se aprecien las bandas con suficiente nitidez.

## 6.2.2 Filtración en gel de Sephadex

### Pacientes

Se han estudiado sueros de 16 pacientes con GN mesangial con depósitos de IgA, (14 con IgA sérica alta y 2 con IgA sérica normal). Se analizaron 5 sueros de pacientes normales como control.

El estudio se llevó a cabo según el método de Andrews, 1969, en una columna de Pharmacia 2.6 x 40 cm. equilibrada con SSF 0.5 M, pH: 7.3.

### Preparación de las muestras

Se utilizó 1 ml de suero diluido al 1:2, a este se le añadió sacarosa al 10%, después de disuelta la sacarosa se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar los posibles restos insolubles que pudieran contener las muestras. El sobrenadante se aplicó a la columna y se eluyó con SSF 0.5 M, pH: 7.3. El flujo se mantuvo constante entre 6.5 - 8 ml/hora mediante un frasco de Mariotte utilizado como reservorio del eluyente.

Se recogieron fracciones de aproximadamente 1.5-2 ml. mediante un colector de fracciones, cada una de las fracciones se leyó por espectrofotometría ultravioleta a 280 nm., en cubeta de cuarzo de 0.5 cm. de paso óptico. En cada una de ellas se procedió a la localización de inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgG) por inmunodifusión doble, utilizando antisueros comerciales hechos específicos para las cadenas pesadas ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\gamma$  respectivamente) (Operon, Soria y Melguizo).

### 6.2.3 Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

Se preparan gradientes de sacarosa (5-40%) en tubos de nitrato de celulosa mediante un formador con 2.25 ml. de cada una de las soluciones. La sacarosa estaba disuelta en tampón Tris-ClH 0.15 M, pH: 7.4 y en Gll-ClH 0.15 M, pH: 2.8.

Los gradientes se utilizaron en el día, manteniéndose a 4°C hasta el momento de utilización. Se aplicaron 50 µl de suero diluidos al 1/10 en el tampón en que iba la sacarosa en cada caso.

La centrifugación se realizó en una ultracentrífuga Spinco SL-2, durante 16 horas a 4°C con un rotor SW-50 I. Acabada la centrifugación, los tubos se mantuvieron a 4°C iniciándose la recolección de fracciones desde el fondo, mediante una aguja, conectado al colector de fracciones por un tubo de goma. Se recogieron fracciones de aproximadamente 200 µl. A cada una de las fracciones se añadió 1.5 ml de tampón borato salino al 0.9%, pH:8. Leyéndose en cada una de ellas la densidad óptica a 280 nm. Cada fracción se diluyó adecuadamente para cuantificar la IgA. Las fracciones ácidas se neutralizaron previamente con 30 µl de Tris 0,2 M.

#### Marcadores

Se han utilizado como proteínas marcadoras:

	Coeficiente de sedimentación	
Albúmina sérica bovina (Sigma)	4,5	S
IgG de conejo	7	S
IgM humana	19	S

Se han utilizado 2 mg de estas proteínas disueltas en 0.50 ml de tampón en que se disolvió la sacarosa. Estos marcadores se ultracentrifugaron paralelamente a las muestras en tubos independientes. La recolección de fracciones se hizo de modo análogo leyéndose por espectrofotometría U.V. a 280 nm. Se construyó una recta que relacionaba peso molecular con el número de fracción, estableciéndose a qué fracción correspondería cada coeficiente de sedimentación. La linealidad del gradiente se chequeó por refractometría.

#### Refractometría

Un tubo en el que se había realizado el gradiente lineal del 5-40% se añadieron 500  $\mu$ l de tampón Tris-ClH 0.15 M, pH: 7.4 y se centrifugó en análogas condiciones al resto de las muestras. Después de la centrifugación se recolectaron fracciones en las mismas condiciones que las muestras. El porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones se determinó por refractometría utilizando bro monaftaleno como estandar. Se representó en una gráfica el porcentaje de sacarosa en función del número de fracción.

#### 6.2.4 Radioinmunoensayo de IgA

##### Obtención del antígeno (IgA)

La IgA se obtuvo de un paciente con mieloma IgA (concentración de IgA sérica 30,80 mg/ml). El aislamiento se realizó mediante electroforesis en almidón.

### Marcaje de la IgA con $^{125}\text{I}$

Se realizó según el método descrito, utilizando - cantidades de IgA entre 40-100  $\mu\text{g}$ . Una alícuota de IgA- $^{125}\text{I}$  purificada de  $^{125}\text{I}$  se pasó por Sephadex G-200 superfino para observar un posible fragmentación o agregación de la proteína con el marcaje.

### Titulación del suero de cobaya ( $\alpha$ -IgG de conejo)

Se realiza haciendo una curva de valoración con distintas diluciones de SCN (1/10 hasta 1/400) en presencia de suero de cobaya ( $\alpha$ -IgG de conejo) diluido al 1/2. El volumen final fue de 0.4 ml. La incubación se realizó durante 16 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se redisolvió en NaOH 0.1 N leyéndose la densidad óptica a 280 nm. Se estableció una curva de valoración tomando como punto de equivalencia aquel que estaba justo antes del máximo de precipitación.

### Valoración del primer anticuerpo

El antisuero utilizado era comercial, específico para cadenas  $\alpha$  (Operon, Soria y Melguizo). La titulación de este anticuerpo se llevó a cabo utilizando diluciones crecientes desde 1/100 hasta 1/204800. Las concentraciones de SCN y del suero de cobaya ( $\alpha$ -IgG de conejo) fueron las fijadas por la titulación anterior. El sistema llevaba IgA- $^{125}\text{I}$  en la cantidad necesaria para el ensayo, ( $\approx$  20000 cpm).

Se representó en papel semilogarítmico el porcentaje de IgA- $^{125}\text{I}$  unida y en función de la dilución del  $\alpha$ -IgA, se seleccionó como dilución idónea aquella que li

gara entre el 50-60% de la IgA-<sup>125</sup>I puesta y tuviera una buena sensibilidad (zona de máxima pendiente de la curva). El anticuerpo titulado se conservó en alícuotas a -20°C.

Verificación de la potencia de cada lote de suero anti-IgG de conejo

Se realizó por adición de diluciones crecientes del SCN y del suero de cobaya ( $\alpha$ -IgG de conejo) a una mezcla de incubación conteniendo antisuero específico ( $\alpha$ -IgG específico para cadenas  $\alpha$ ) a la dilución seleccionada con la valoración anterior. También se puso la misma cantidad de IgA-<sup>125</sup>I, no había antígeno frío.

Con esta prueba se determinó una dilución de suero  $\alpha$ -IgG de conejo capaz de precipitarnos el porcentaje de radiactividad del sistema de partida y nos permitió utilizar menor cantidad de suero de cobaya.

Con las condiciones así establecidas, se procedió a realizar el análisis según el esquema. (Pág. 78)

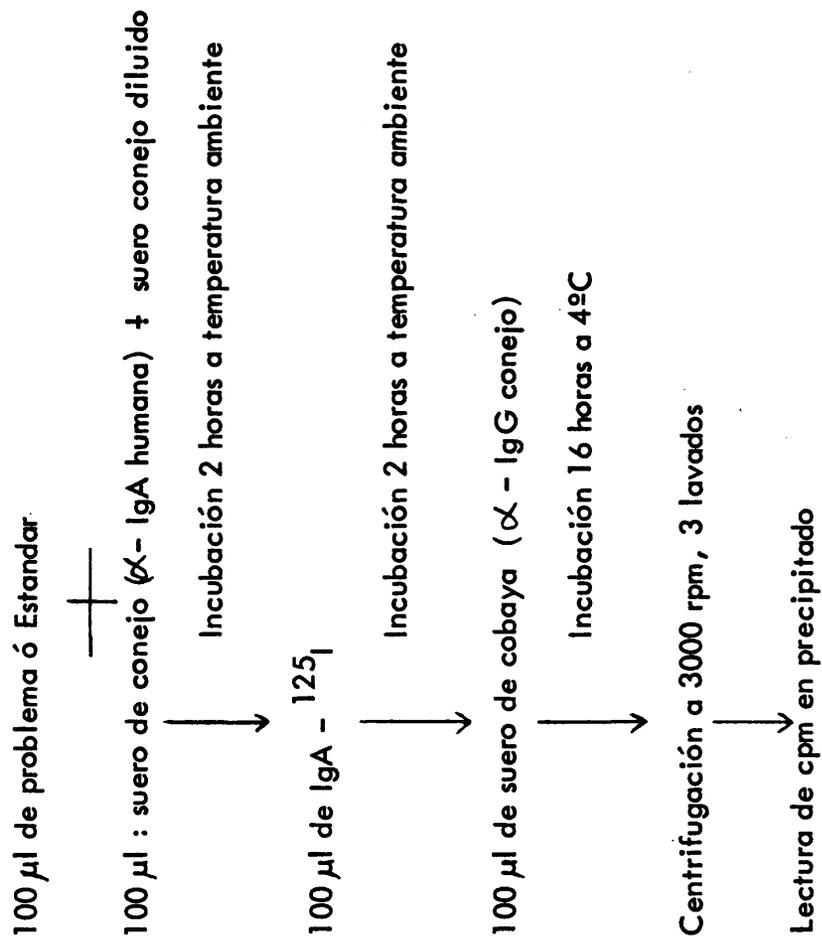
Realización del análisis

Como estandar frío se utilizó un suero humano normal con una concentración de IgA conocida (establecida por inmunodifusión radial). Las concentraciones de IgA fría fueron de (2.5-10000)  $\mu$ g/ml.

Todas las diluciones tanto de las muestras como de los antisueros se hicieron en tampón borato salino al 0.9% conteniendo ASB al 0.2%.

La curva estandar se construyó en papel semilogarítmico, a partir del porcentaje de unión (respecto a las cpm totales puestas) para cada concentración de IgA fría. Las mues-

## RADIOINMUNOENSAYO DE IgA



tras problema estaban a diluciones entre 1:1 y 1:500.

#### Análisis de variables

El análisis de las variables se realizó de la siguiente forma:

- 1) Reproducibilidad inter-ensayo a partir de varias curvas estándar provenientes de análisis distintos.
- 2) Reproducibilidad intra-análisis para una muestra analizada el mismo día por sextuplicado.
- 3) Controles: recuperabilidad y efectos específicos.
- 4) Paralelismo entre diluciones.
- 5) Análisis de sensibilidad.

Los parámetros estadísticos calculados han sido media, desviación estándar, error estándar y coeficiente de variación. La comparación entre grupos se hizo por el test Student (calculando  $t$  y  $p$ ), considerándose significativas las diferencias con  $p < 0.05$ .

#### Aplicación de este radioinmunoensayo al estudio cualitativo de la IgA sérica.

La cantidad de IgA sérica presente en cada fracción después de la centrifugación en el gradiente de sacarosa se cuantificó según el radioinmunoensayo descrito.

Con los resultados obtenidos, se construyó una gráfica representando los ng/ml correspondientes a cada fracción. Mediante cálculo de áreas se establecieron los porcentajes de IgA entre zonas con distintos coeficientes

de sedimentación.

El análisis de significación de las variables se realizó por medio del test de Student.

### 6.2.3 Aislamiento de IgA

El aislamiento se realizó inicialmente por el método de Litman y Good, 1971.

Este método se hacía fundamentalmente en dos pasos:

1. Separación de la IgA de las restantes inmunoglobulinas por cromatografía en DEAE celulosa (DE-23 celulosa, Whatmann) en tampón fosfato sódico 0.02 M, pH: 6.3
2. Separación de la IgA de otras proteínas no inmunoglobulinas mediante cromatografía de afinidad, en Sepharosa activada con BrCN a la que se había acoplado IgG de conejo anti cadenas  $\lambda$  y  $\kappa$  humanas.

La pureza de las preparaciones obtenidas se chequeó por inmunoelectroforesis, frente a suero anti-proteínas humanas totales.

El rendimiento se verificó por inmunodifusión radial.

### Aislamiento mediante electroforesis en almidón

Dado el bajo rendimiento obtenido con el método anterior, se decidió aislar la IgA del suero de estos pacientes por electroforesis en almidón, según el método descrito.

Se utilizaron muestras de 14 ml de suero de estos pacientes. El peso molecular de la IgA obtenida de las partes anódica y catódica se caracterizó por filtración en gel de Sephadex G-200 superfino.

La pureza de las preparaciones se chequeó por inmunodifusión doble dimensional e inmunolectroforesis. El rendimiento obtenido se determinó por inmunodifusión radial en placas comerciales.

#### 6.2.4 Reducción-Alquilación

100 µg de la IgA de la parte anódica de la electroforesis de paciente (IRD) se marcaron con  $^{125}\text{I}$  por el método de la cloramina T descrito.

Una alícuota de esta IgA- $^{125}\text{I}$ , después de purificada por diálisis, se pasó por una columna de Sephadex G-200 superfino, para examinar la posible fragmentación o agregación de las proteínas con el marcaje.

La proporción de IgA- $^{125}\text{I}$  de la preparación se determinó por precipitación inmunoreactiva, de modo análogo a como se hace en el radioinmunoensayo.

Esta IgA- $^{125}\text{I}$  se sometió a reducción en tampón - Tris-ClH 0.01 M, conteniendo ClNa 0.15 M EDTA 0.002 M, - pH: 8, mediante ditiotreitól 0.04 M y alquilación con iodoacetamida 3.3 veces en exceso con respecto al reductor. Los resultados de la reducción se analizaron por filtración en gel de Sephadex G-200 superfino en tampón Tris-ClH 0.01 M conteniendo ClNa 0.5 M y EDTA 0.002 M, pH: 8.

### 6.2.5 Detección de la cadena J

La presencia de cadena J en estas formas poliméricas de IgA se analizó por electroforesis alcalina en geles de acrilamida al 4% en medio alcalino, conteniendo urea según el método descrito de Reisfeld y Small (1966).

#### Preparación de las muestras

Muestras de IgA (200-300) µg conteniendo IgA polimérica de la parte anódica del almidón (u obtenidas por filtración en ultrogel Aca 34 que no contiene IgM) se sometieron a reducción en urea 10 M conteniendo mercaptoetanol - durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo. Paralelamente, se redujeron IgM de un paciente con enfermedad de Waldenström (paraproteína IgM), así como IgA de un paciente con mieloma IgA.

Para descartar la posibilidad de que las bandas consideradas como cadenas J fuesen cadena ligera proveniente de la molécula de inmunoglobulina, reducida, se aplicaron en tubos aparte muestras conteniendo cadenas ligeras y se observó su movilidad en este medio.

### 6.2.6 Afinidad por el componente secretorio

Uno de los criterios de "verdaderos polímeros" para la IgA de alto peso molecular lo constituye, junto con la presencia de cadena J, la afinidad por el componente secretorio libre. Hemos estudiado la afinidad por el componente secretorio en estas formas de IgA de alto peso molecular en 4 pacientes.

Pruebas de afinidad del componente secretorio por la IgA polimérica

Se realizó según el método de Brandtzaeg, 1974. Muestras de IgA de alto peso molecular se incubaron a 37°C con el componente secretorio marcado con  $^{125}\text{I}$  (CS- $^{125}\text{I}$ ) en una relación molar SC: IgA 1:7.5. Como controles se utilizaron IgM e IgA monomérica, las cuales se incubaron con el CS- $^{125}\text{I}$  en análogas condiciones a la IgA polimérica. Después de la incubación las muestras se centrifugaron en gradiente de sacarosa 5-40% según la forma descrita.

Las fracciones se recolectaron desde el fondo y en cada una se midieron las cpm. En las distintas fracciones se localizó la presencia de IgA por inmunodifusión doble.

## RESULTADOS

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Filtración en gel de Sephadex

La filtración de un suero humano normal en una columna de Sephadex G-200 superfino dá lugar fundamentalmente a la aparición de tres picos (Figura 1).

En el primer pico se encuentran la IgM,  $\alpha_2$ -macroglobulina y otras proteínas de peso molecular superior a 200.000 Dalton.

En el segundo pico, hay sobre todo IgG y proteínas con peso molecular alrededor de 150.000 Dalton. El tercer pico contiene albúmina y otras proteínas con peso molecular inferior a 100.000 Dalton.

La IgA es heterogénea en tamaño, pudiendo aparecer con las proteínas del primer pico de la filtración y en la región entre los dos primeros picos.

La IgD eluye antes de la IgA. La IgE eluye en la misma región que la IgD.

Se han estudiado sueros de 14 pacientes con GN mesangial IgA (12 de ellos con IgA sérica alta y 2 con IgA normal, por debajo de 250 mg%).

En todos los pacientes estudiados se observó la aparición de IgA en el primer pico del Sephadex, tanto con IgA sérica alta como en niveles normales (Figuras 2 y 3). Este hecho nos indicaba la presencia de una mayor cantidad de IgA sérica con alto peso molecular en el suero de estos pacientes con relación al suero humano normal, pues en este caso la presencia de IgA en el primer pico del Sephadex

es un hecho poco común debido a que la fracción polimérica de la IgA de un suero humano normal no suele detectarse - por inmunodifusión doble después de la filtración de un suero en las condiciones utilizadas por la sensibilidad - del método.

o umna 6 40. e a ex - 00 su er ino

D.O. 280 nm.

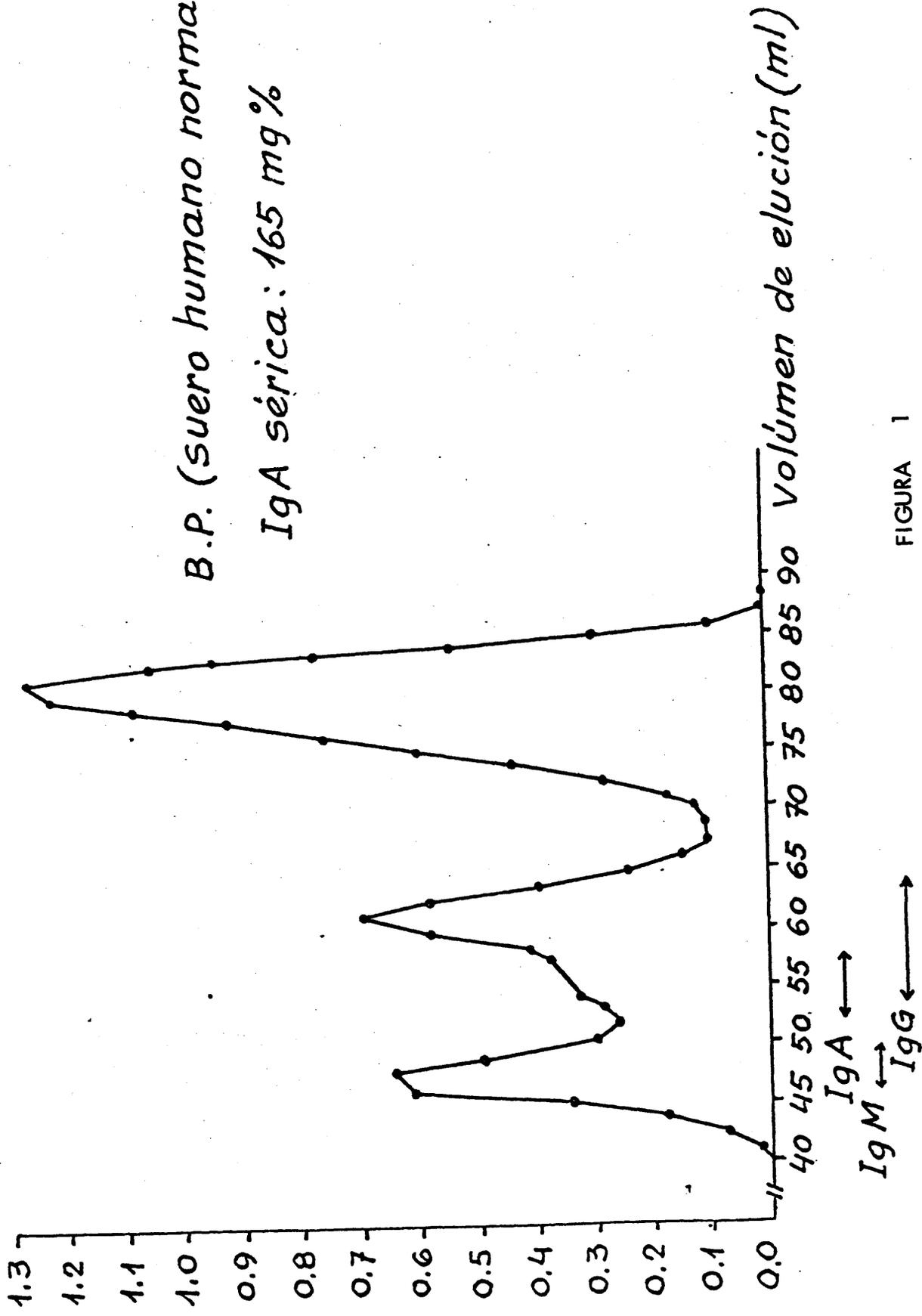


FIGURA 1

# Columna K 26/40 · Sephadex G-200 superfino

D.O. 280nm

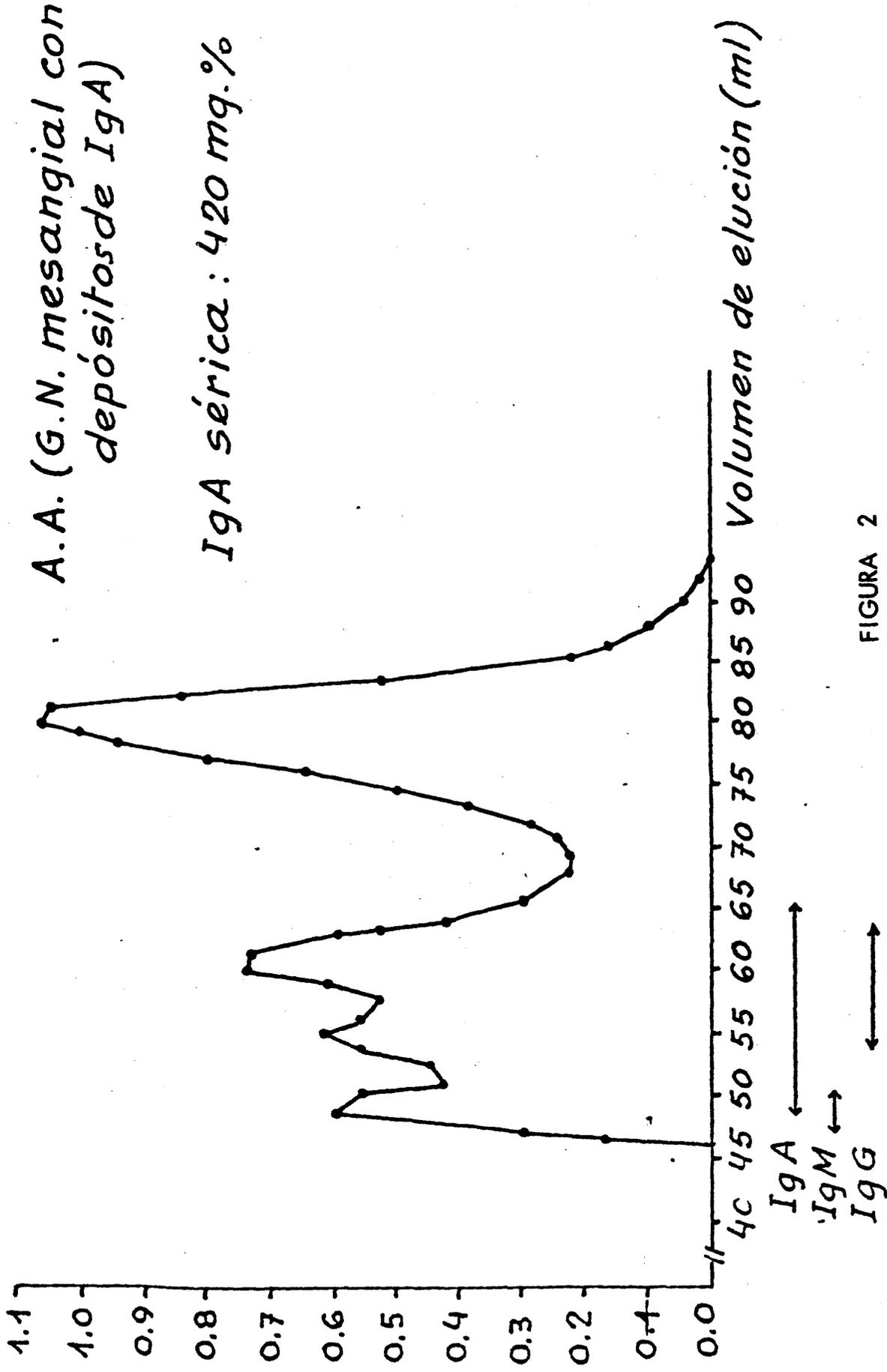


FIGURA 2

Columna K 26/40. Sephadex.G-200 superfino

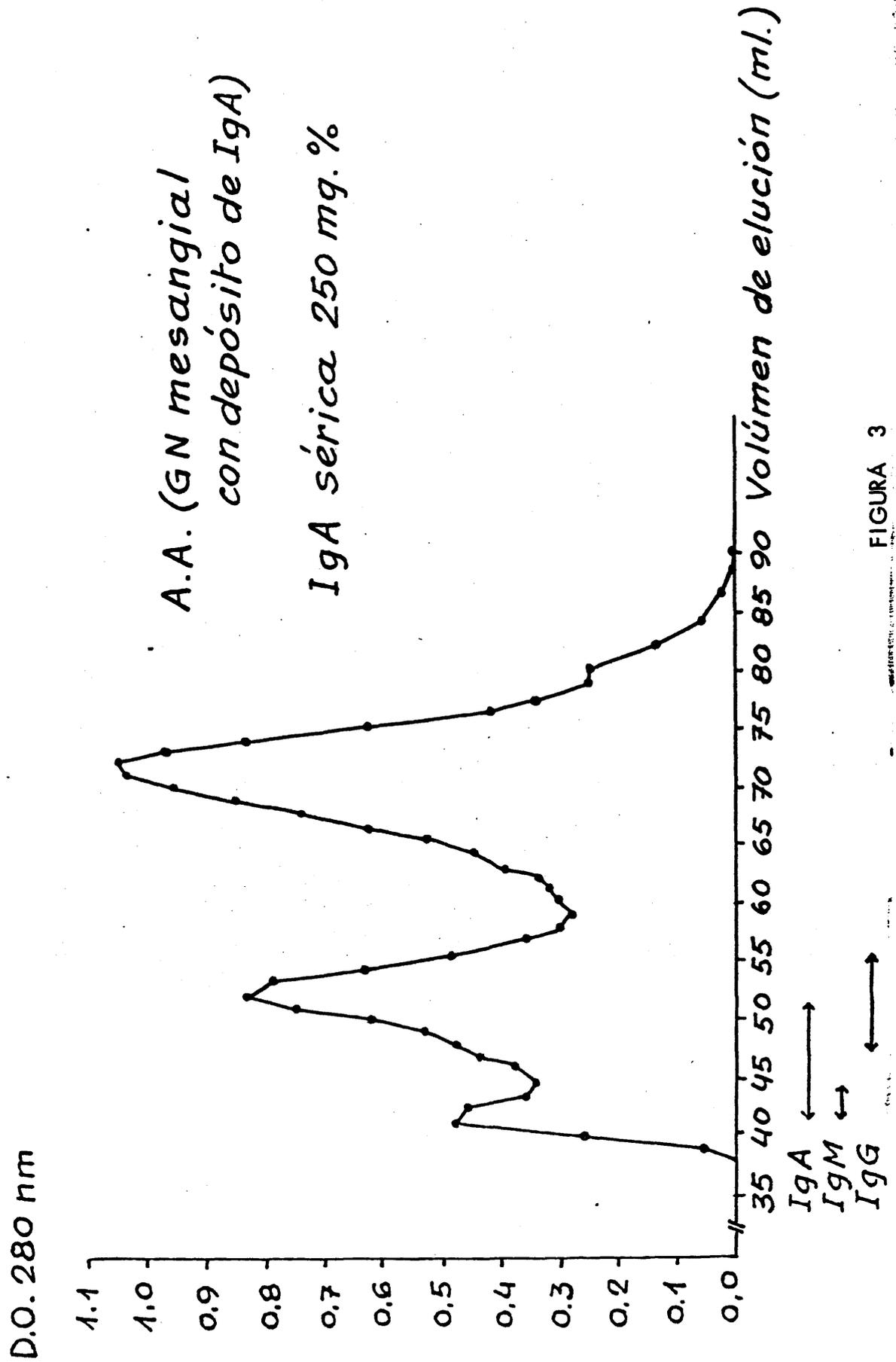


FIGURA 3

## 7.2 Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

La Figura 4 recoge el perfil de los marcadores en densidades ópticas después de la centrifugación en el gradiente de sacarosa.

En la gráfica 5 están representadas las posiciones de las proteínas marcadoras con diferentes coeficientes de sedimentación y la fracción a la que corresponden los máximos en densidades ópticas. Aparece una buena correlación entre ambos parámetros ( $r:0.9966$ ). La linealidad del gradiente de sacarosa establecida por refractometría era también buena ( $r:0.9984$ ), Gráfica 6.

PERFIL DE LOS MARCADORES EN D.O. DESPUES  
DE LA ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTE  
DE DENSIDAD DE SACAROSA A pH 7.4 (un experimento)

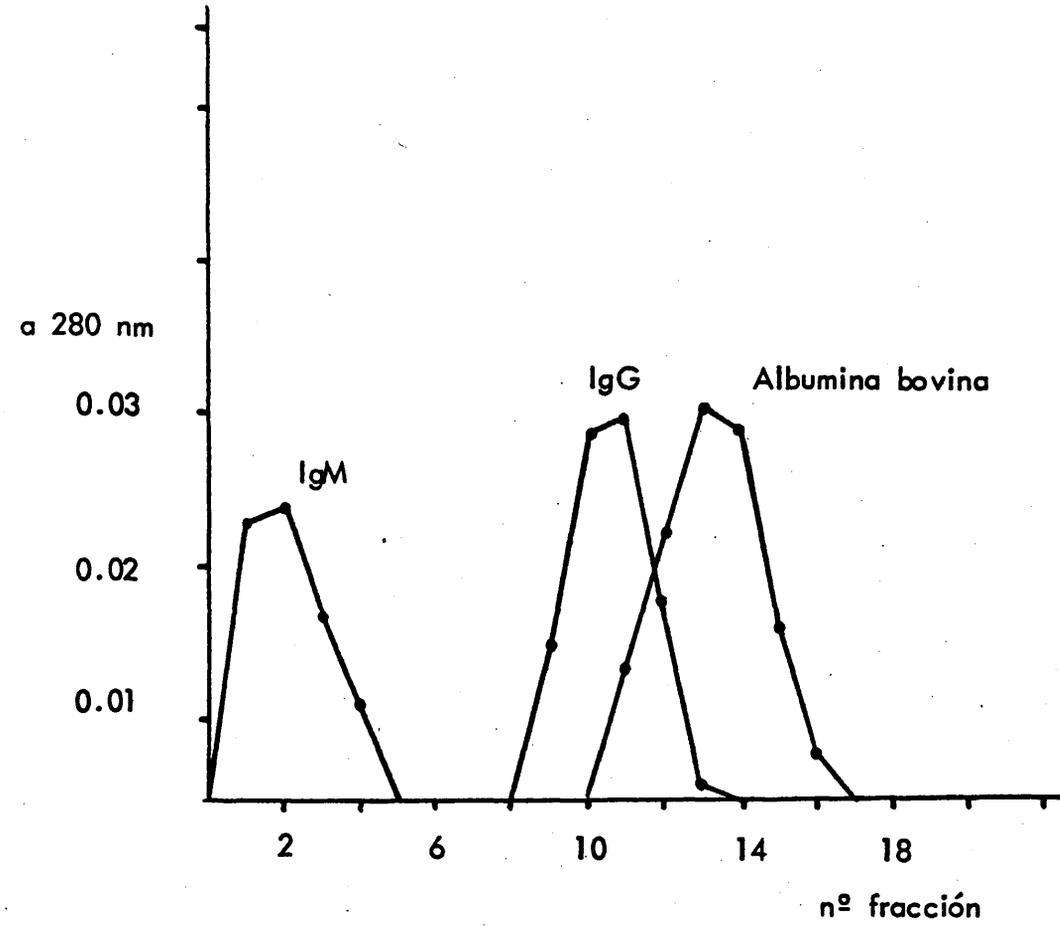
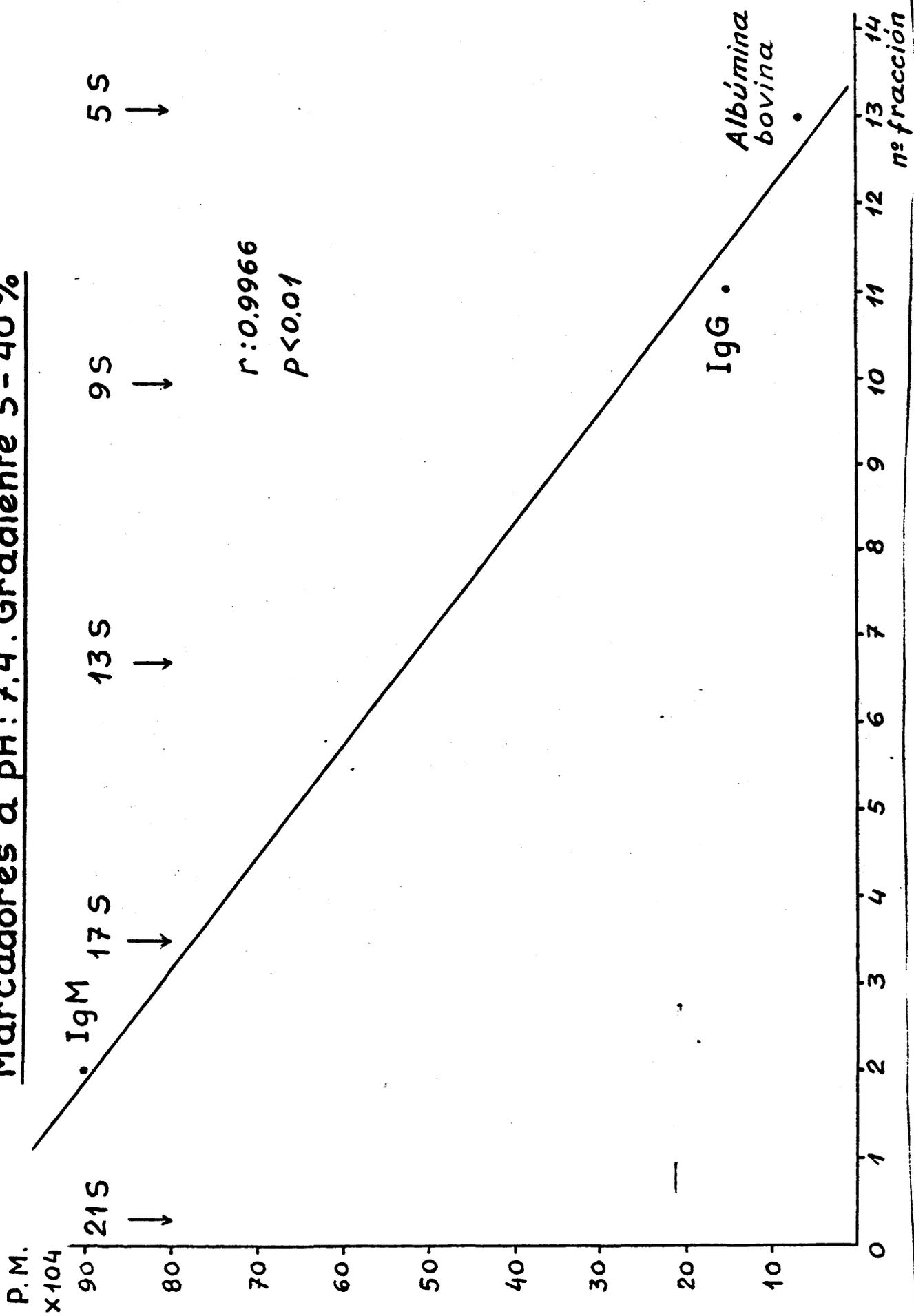
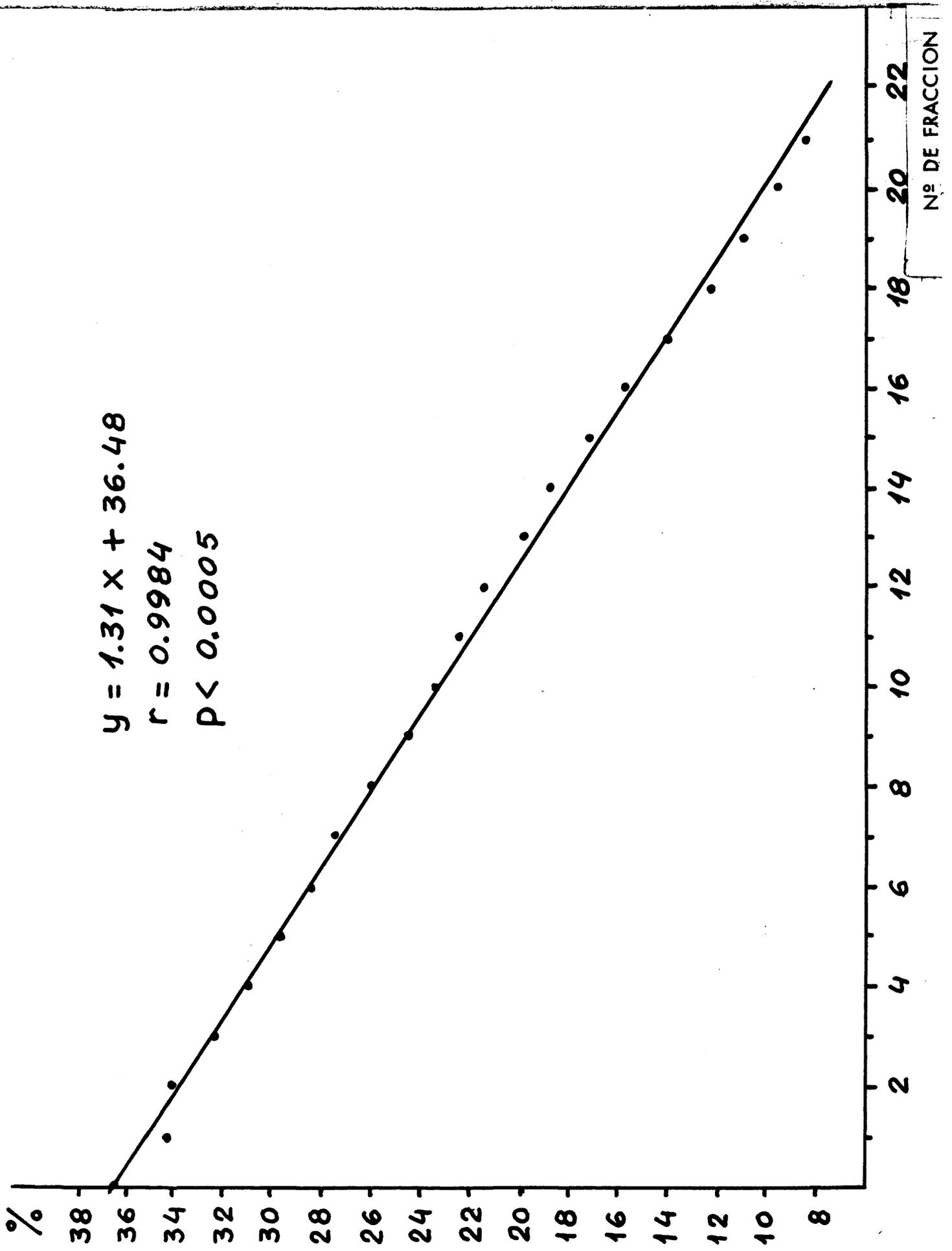


FIGURA 4

FIGURA 5

Marcadores a pH: 7.4. Gradiente 5 - 40 %





### 7.3 Radioinmunoensayo

#### 7.3.1 Obtención de la IgA

La localización de la IgA, proveniente del suero de un paciente con mieloma IgA, después de la electroforesis en almidón, fué tanto en las partes anódica como catódica del bloque utilizado.

La recuperación después de tres lavados fue del orden del 80%. La IgA de las fracciones catódicas -1 y -2 - concentradas se pasó por Sephadex G-200 superfino (Figura 7).

Las fracciones 30, 31 y 32, provenientes de esta cromatografía, se concentraron, cuantificaron y se hizo inmunodifusión frente a  $\alpha$ -IgG,  $\alpha$ -IgA,  $\alpha$ -IgM y antisuero humano total. La Fotografía 3, muestra el resultado de esta inmunodifusión. Sólo se observa una banda de precipitación con el suero anti-IgA. Con el suero antihumano total da una banda de identidad total a la obtenida con el suero - Anti-IgA y una banda débil que puede ser algún contaminante (Fotografía 3).

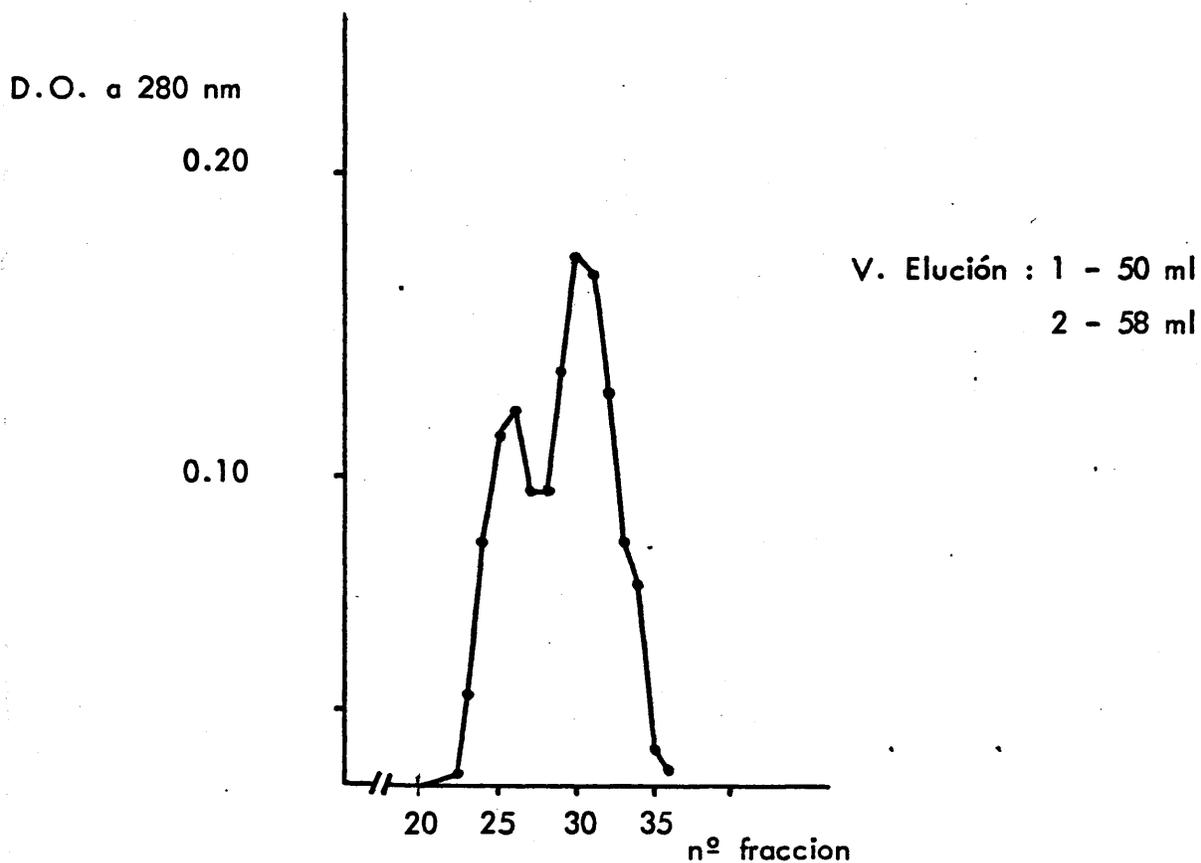
Esta muestra tenía una concentración de IgA de - 450 mg%.

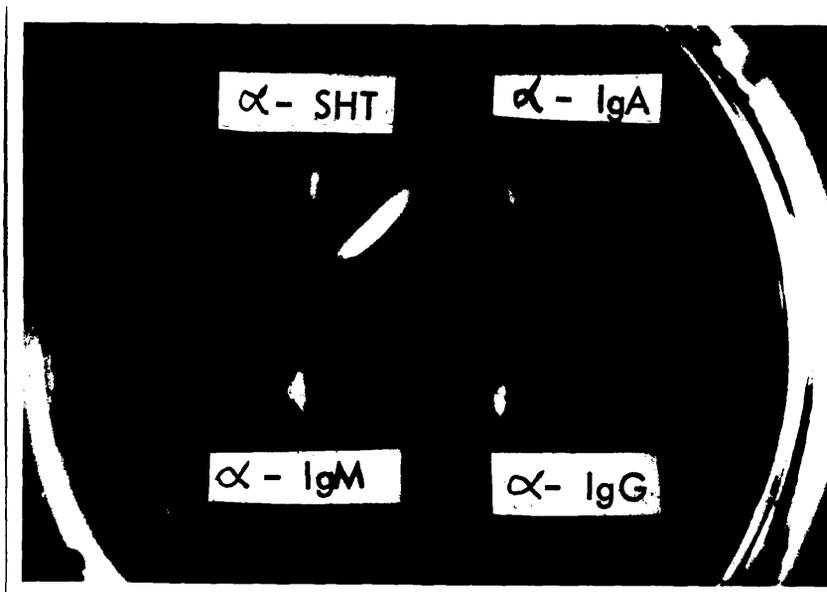
#### 7.3.2 Marcaje de la IgA

Se tomaron 20  $\mu$ l de la preparación - (90  $\mu$ g) y se marcaron con  $^{125}$ I según el método descrito anteriormente.

FIGURA 7

PERFIL EN SEPHADEX G-200 SUPERFINO DE LA IgA  
OBTENIDA POR ELECTROFORESIS DE ALMIDON DEL  
SUERO DE UN PACIENTE CON MIELOMA IgA  
( fracciones - 1 y - 2).





Fotografía 3: Inmunodifusión doble bidimensional.  
Pocillo central IgA proveniente de un paciente  
con mieloma IgA, revelada con distintos anti-  
sueros.

La actividad específica de la IgA  $^{125}\text{I}$  osciló entre (7,2 - 8,9)  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

La eficiencia del marcaje (incorporación de  $^{125}\text{I}$  a la IgA osciló entre 65-80%. La IgA  $^{125}\text{I}$  después de purificarla del  $^{125}\text{I}$  libre por diálisis presenta una pureza superior al 98% determinada tanto por precipitación con ácido tricloroacético como por filtración en gel de Sephadex (Figura 8).

Esta IgA  $^{125}\text{I}$  se utilizó al menos durante dos meses después del marcaje sin que se observara fragmentación, agregación ni pérdida de  $^{125}\text{I}$  durante este tiempo.

### 7.3.3 Titulación del suero de cobaya anti-IgG de conejo.

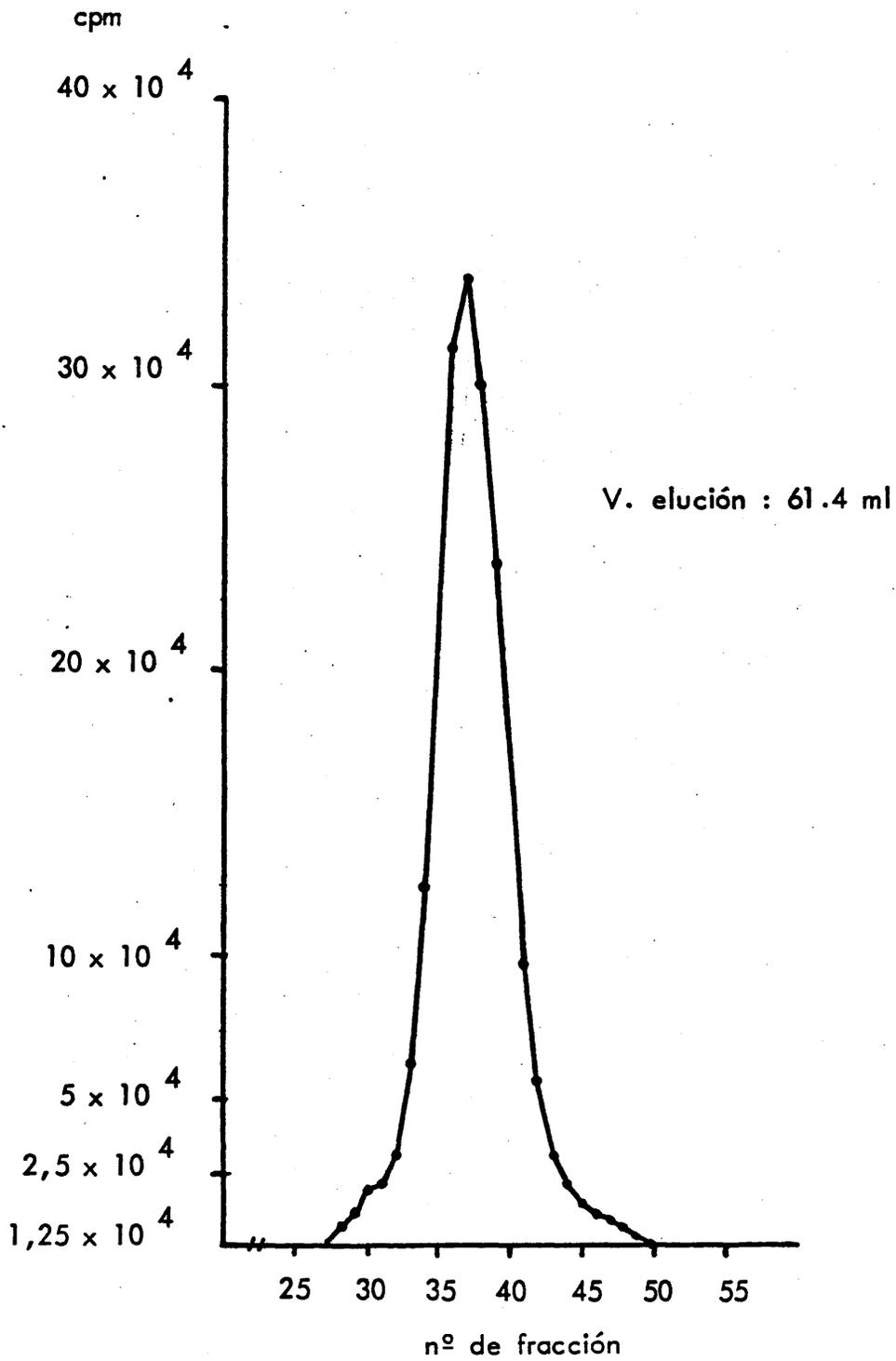
La Fotografía 4 muestra la reactividad del suero de cobaya (anti-IgG de conejo) frente a un suero de conejo normal y a la IgG de conejo utilizada en la inmunización (Fotografía 4).

Aparecen dos bandas, una frente a cada uno de los antisueros que se cruzan totalmente, lo que indica una reactividad sólo con IgG y descarta la reacción cruzada de este antisuero con otras proteínas de conejo que no sean IgG.

La Tabla I recoge las densidades ópticas correspondientes a los precipitados obtenidos y redisueltos en NaOH 0.1 N en la titulación del suero de cobaya ( $\alpha$ -IgG de conejo) frente a suero de conejo (una experiencia).

FIGURA 8

PERFIL DE LA IgA-<sup>125</sup>I EN SEPHADEX G-200  
SUPERFINO DESPUES DE PURIFICADA POR DIALISIS.





Fotografía 4: Inmunodifusión doble bidimensional.

Pocillo 1: Suero de cobaya inmunizado con IgG de conejo.

SCN: Suero de conejo normal.

IgG: IgG de conejo.

TABLA I

<u>Suero de conejo</u> <u>(dilución utilizada)</u>	<u>Suero de cobaya</u> <u>(dilución utilizada)</u>	<u>Densidad óptica</u> <u>a 280 nm.</u>
1/10	1/2	0.024
1/20	1/2	0.023
1/25	1/2	0.065
1/40	1/2	0.082
1/50	1/2	0.094
1/80	1/2	0.096
1/100	1/2	0.092
1/160	1/2	0.072
1/200	1/2	0.060
1/320	1/2	0.046
1/400	1/2	0.042

Se elige como sistema de trabajo aquel que está - inmediatamente por debajo al máximo de precipitación donde se considera está el punto de equivalencia. En este caso se tomó el sistema suero de conejo (1/50), suero de cobaya (1/2).

Estos datos corresponden a un experimento. La forma de operar fue siempre la misma, trabajándose siempre - con diluciones finales de suero de conejo entre (1/200 y 3/800).

El suero de cobaya se utilizó a diluciones finales comprendidas entre 1/4 y 1/16.

7.3.4 Valoración del primer anticuerpo: suero de conejo  
( $\alpha$ -IgA humana)

Utilizando las diluciones de suero de conejo y suero de cobaya establecida por la valoración anterior, se tituló el primer anticuerpo.

Se trabajó con una dilución final para este anticuerpo de 1/40.000 y 1/120.000 según el lote de antisuero  $\alpha$ -IgA utilizado.

La Figura 9 está representada la curva de valoración.

La verificación de la potencia de cada lote de suero anti-IgG de conejo, nos permitió utilizar un sistema de precipitación con cantidades menores de SCN y suero de cobaya IgG de conejo. (Figura 10). Así pudimos trabajar con diluciones de SCN de hasta 1/800 y de suero de cobaya 1/16 en diluciones finales.

7.3.5 Controles

Pruebas de recuperabilidad y efectos inespecíficos

Se realizaron pruebas de recuperabilidad, utilizando cantidades conocidas de IgA<sub>2</sub>.

Para dos muestras los resultados fueron los siguientes:

	<u>ng/ml</u>	
Cantidad puesta:	28	% de recuperación: 89.3
Cantidad recuperada:	25	
Cantidad puesta:	22	% de recuperación: 91.5
Cantidad recuperada:	20,12	

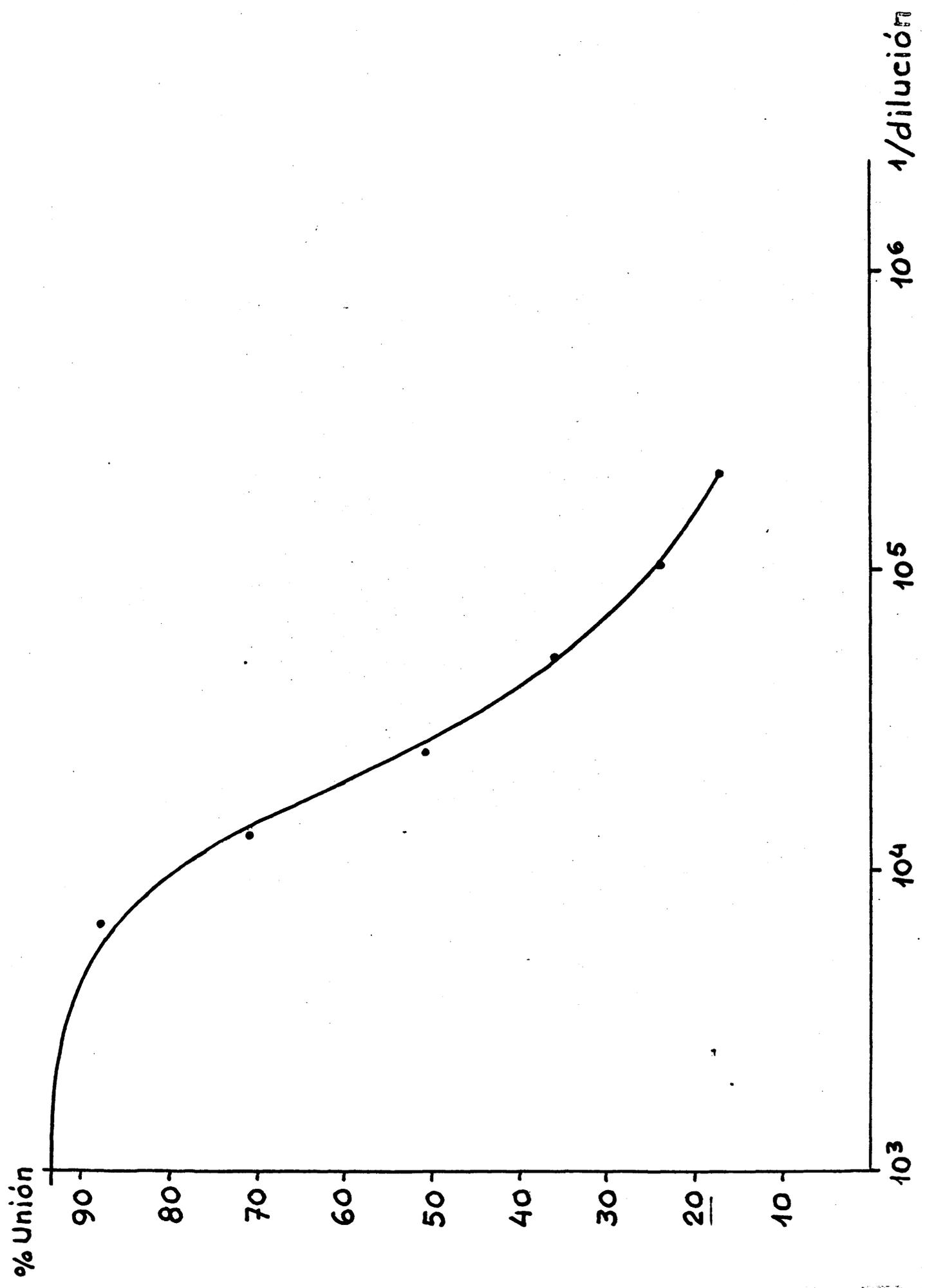


FIGURA 9

CURVA DE VALORACION DEL SUERO DE COBAYA  $\alpha$ -IgG DE CONEJO

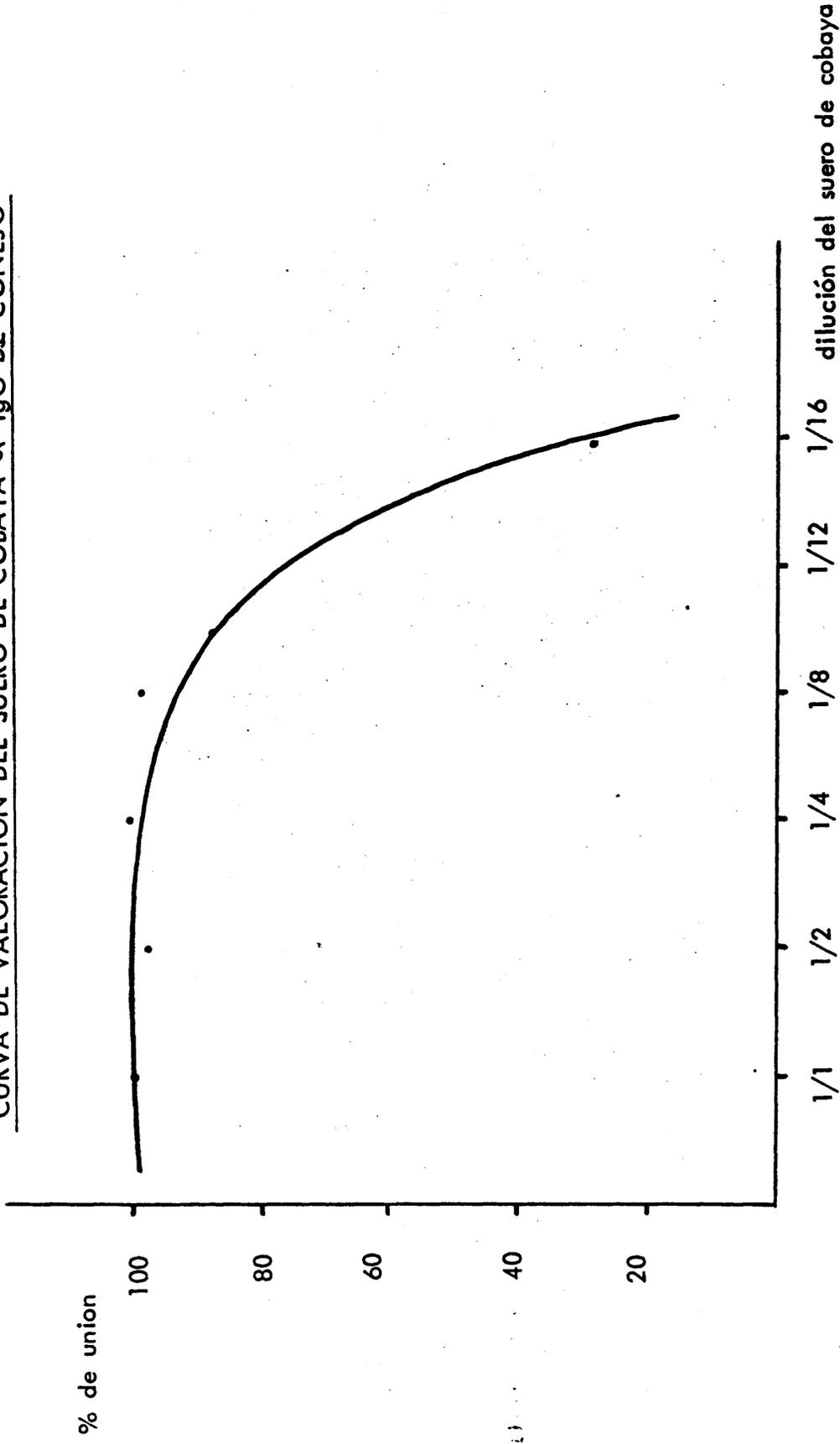


FIGURA 10

Puesto que el radioinmunoensayo utilizado radica en la separación de las fracciones libre y ligada de la IgA en la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo por un segundo anticuerpo específico del primero, es de gran interés establecer la cuantía de dicha especificidad. El control se estableció viendo el porcentaje de precipitación obtenido cuando se hace la adición del segundo anticuerpo sobre una mezcla conteniendo IgA-<sup>125</sup>I, SCN y tampón en ausencia del primer anticuerpo. Este control refleja asimismo la absorción de la IgA-<sup>125</sup>I a las paredes del tubo.

El porcentaje de unión inespecífica fue siempre inferior al 2%.

#### Reproducibilidad inter-ensayo

En la Tabla II se representan los valores de porcentajes de unión respecto al cero (ausencia de antígeno frío) en 8 curvas estandar  provenientes de distintos análisis para cada concentración de IgA fría. La Figura 11 corresponde a la curva estandar media de estas curvas.

#### Reproducibilidad intra-ensayo

En la Tabla III están recogidas las concentraciones de una muestra analizada por sextuplicado.

TABLA 2

REPRODUCIBILIDAD INTER-ANALISIS

Valores de % de union de 8 curvas estandar

ng/ml	10.000	5000	2500	1250	625	312.5	157	79	40	20	10	5
	7.08	9.28	10.16	13.60	14.69	21.60	26.07	36.56	58.86	84.10	82.73	99.86
	8.42	8.77	11.78	13.32	17.17	20.94	29	43.01	66.23	86.60	96.29	99.09
	8.79	8.08	9.48	13.01	15.91	20.01	27.05	40.78	63.10	78.35	89.70	100.1
% unión	6.71	9.02	9.85	11.73	14.26	17.45	26.04	38.80	60.75	76.67	90.64	97.77
	9.14	10.57	11.67	14.61	16.92	20.53	28.01	38.43	55.10	71.50	87.76	91.81
	11.05	12.16	14.36	15.03	18.11	21.80	26.34	37.70	58.09	75	88.11	92.65
	7.85	10.37	10.34	12.93	14.87	19.53	21.16	36.60	51.13	67.56	84.25	67.65
	6.43	7.93	11.43	15.07	17.75	22.70	28.84	47.48	64.36	78.91	92.11	
Media	8.18	9.52	11.13	13.66	16.21	20.57	26.56	39.92	59.70	77.34	86.45	92.63
D.E.	1.52	1.43	1.58	1.17	1.48	1.62	2.48	3.74	4.99	6.22	9.77	11.5
E.E.	0.54	0.50	0.56	0.41	0.52	0.57	0.88	1.32	1.77	2.20	3.45	4.35
C.V.	18.54	15	14.14	8.55	9.15	7.87	9.35	9.38	8.37	8.04	11.30	12.41

D.E. : Desviación estandar

E.E. : Error estandar

C.V.: Coeficiente de variación

CURVA ESTANDAR DE RADIOINMUNOENSAYO DE IgA

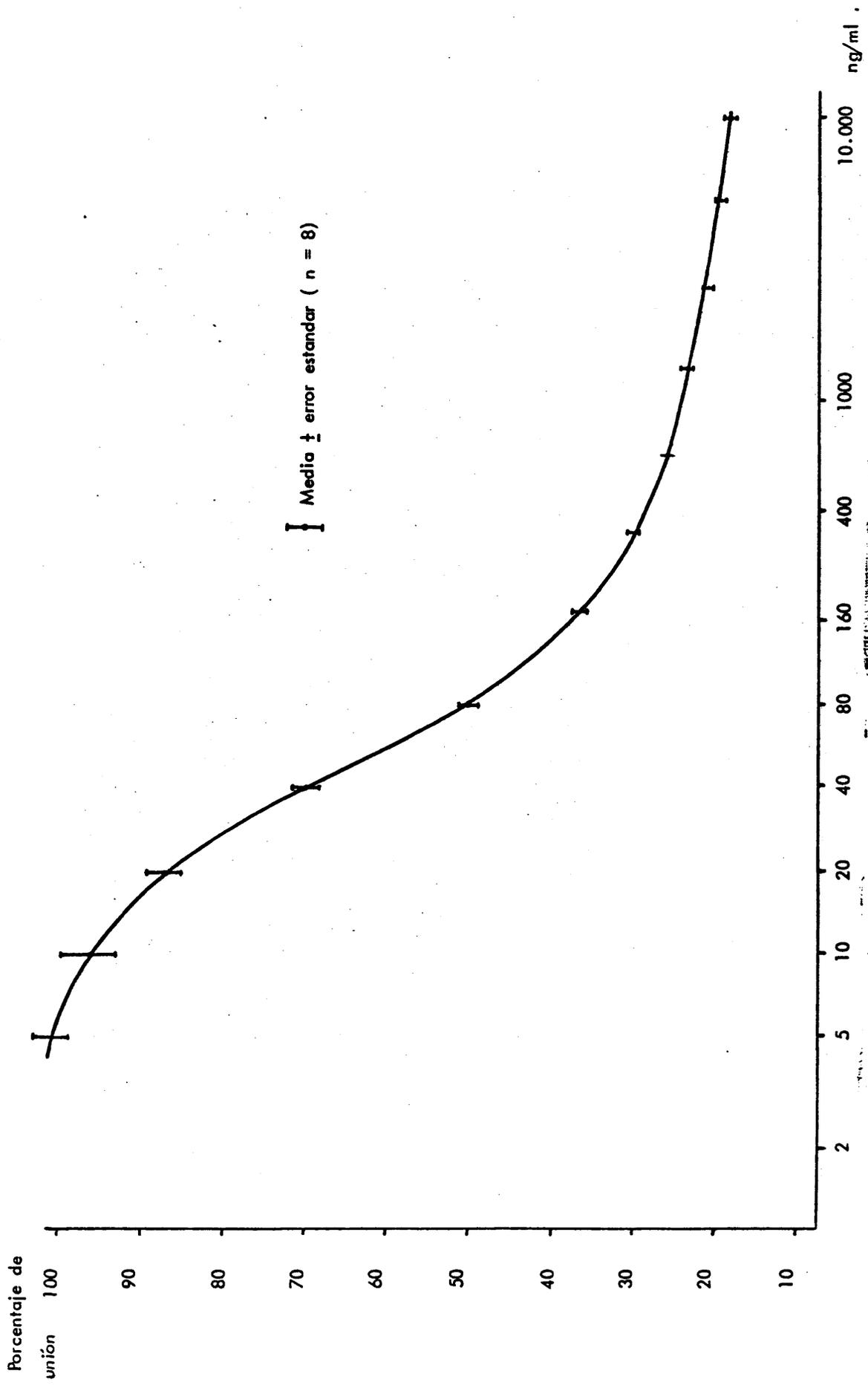


FIGURA 11

Tabla III

ng/ml

17            15            14.5

17            15.75        16.5

Media  $\pm$  desviación estandar: 15.96  $\pm$  1.05 ng/ml.

Coefficiente de variación: 6.58%

Paralelismo entre diluciones

Casi la totalidad de las muestras fueron analizadas a dos diluciones distintas. En la Tabla IV están recogidos los resultados correspondientes al análisis de 10 - muestras aleatorias a dos diluciones distintas.

TABLA 4

<u>Muestra</u>	<u>Dilución</u>	<u>ng/ml</u>	<u>Media ± D.E.</u>	<u>Coefficiente de variación (%)</u>
1	1/4	1780	1790 ± 14.14	0.79
	1/16	1800		
2	1/4	346	345 ± 1.41	0.41
	1/16	344		
3	1/4	324	318 ± 8.48	2.67
	1/16	312		
4	1/10	2000	1990 ± 14.14	0.71
	1/30	1980		
5	1/5	900	968.5 ± 96.87	10
	1/50	1037		
6	1/5	350	337.5 ± 17.68	5.24
	1/50	325		
7	1/10	1800	1900 ± 141.42	7.44
	1/100	2000		
8	1/10	1450	1475 ± 35.35	2.4
	1/100	1500		
9	1/100	25500	26875 ± 1944.5	7.23
	1/500	28250		
10	1/100	12500	12593.5 ± 132.2	1.05
	1/500	12687		

Análisis de sensibilidad

El límite de sensibilidad fue establecido viendo el porcentaje de unión en el cero en ausencia de antígeno frío en 10 muestras. Con la t correspondiente a una p = 0.025 para N - 1 grados de libertad, se estableció el límite de confianza:

$$t \times \text{desviación estándar} = \text{límite de confianza}$$

TABLA V

PORCENTAJES DE UNION EN EL CERO

42.18	45.50	46.92	42.04	43.63
43.72	38.19	43.30	47.51	42.36

Media  $\pm$  D.E.: 43.53  $\pm$  2.69

Coefficiente de variación: 6.17%

Mediante este cálculo se estableció el límite de sensibilidad en 8.6 ng/ml.

7.3.6 Cálculo de la actividad específica de la IgA-<sup>125</sup>I

Fue establecido viendo el porcentaje de unión de una muestra (por duplicado) que contenía, en lugar de antígeno frío, una alícuota radiactiva idéntica a la que iba en todos los tubos del análisis. Del porcentaje de unión respecto al número total de cpm puestas se observó la concentración en ng/ml, presentes en cada tubo del análisis.

La concentración de IgA fue 0.250 ng/ml. Este dato fue correlacionado con los porcentajes de unión correspondientes a un número de cpm doble y triple a los utilizados en el análisis, habiendo una buena correlación (r : 0.9934).

### 7.3.7 Estudio cualitativo de la IgA sérica. Resultados de la ultracentrifugación a pH 7.4

La concentración de IgA sérica en ng/ml correspondiente a cada fracción del gradiente se determinó por lectura directa desde cada curva estandar y multiplicando por el factor de dilución correspondiente. Los resultados se representaron en papel milimetrado para cada suero estudiado. La Figura 12, muestra la distribución de IgA sérica correspondiente a un suero humano normal, como podemos apreciar, el mayor porcentaje de IgA sérica corresponde a las fracciones con coeficientes de sedimentación entre (5-9)S, hay un porcentaje menos importante entre (9-13)S y a las fracciones con coeficientes de sedimentación entre (13-17)S y (17-21)S corresponde los porcentajes menores de IgA sérica.

Las Figuras 13 y 14 muestran la distribución de IgA sérica en sueros de dos pacientes con GN mesangial IgA. Uno de ellos tiene niveles de IgA sérica próximos a la normalidad (250 mg%) y otro en lo considerado como límite alto. Vemos que hay un porcentaje de IgA sérica importante no sólo en las fracciones con coeficientes de sedimentación entre (5-9)S sino también entre (9-13)S, (13-17)S. Las zonas entre (17-21)S tienen el menor porcentaje de IgA sérica pero son superiores a los de un suero humano normal.

FIGURA 12

DISTRIBUCION DE LA IgA SERICA EN GRADIENTE DE DENSIDAD DE SACAROSA EN SUERO HUMANO NORMAL (IgA : 165 mg%)

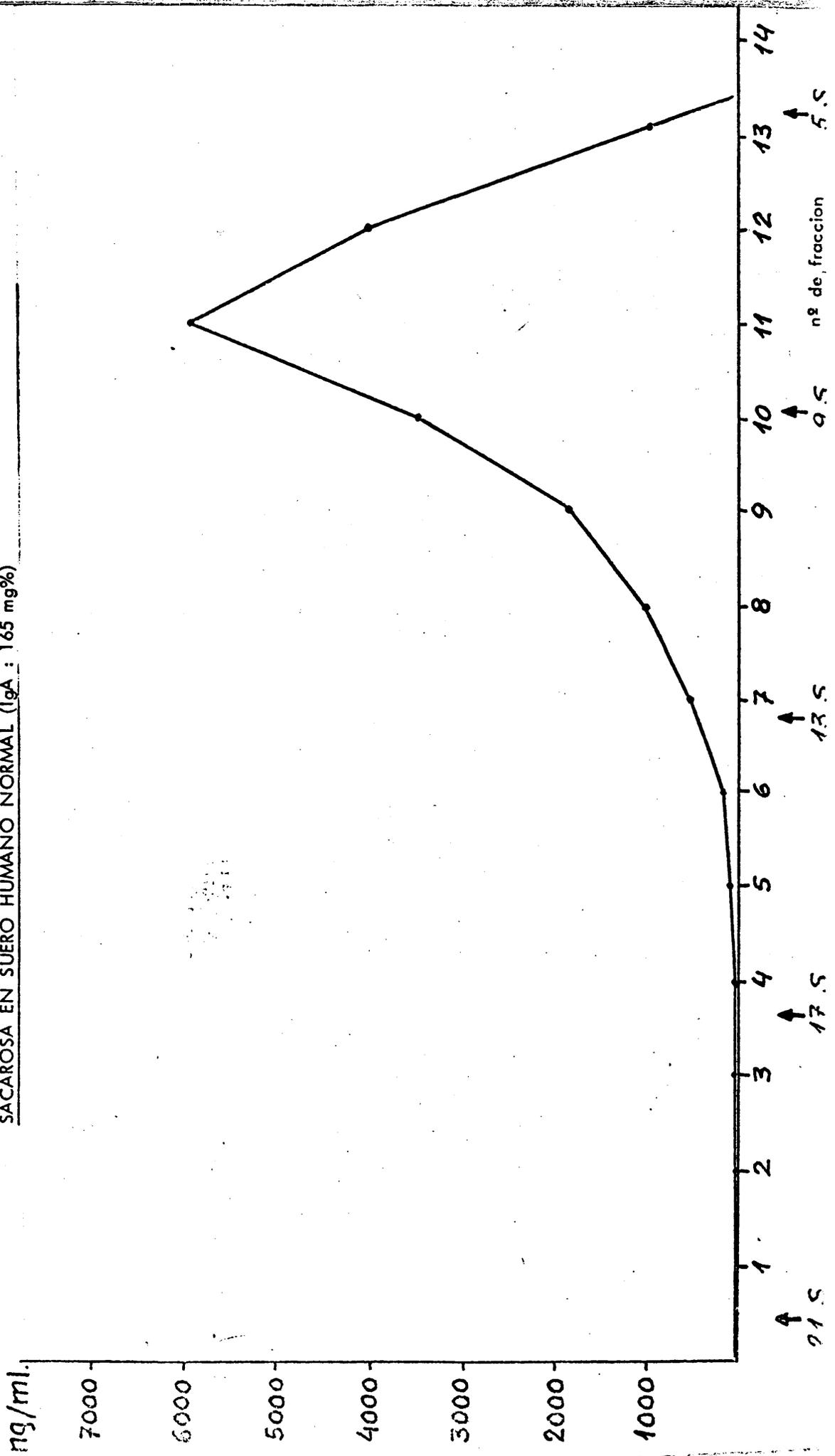
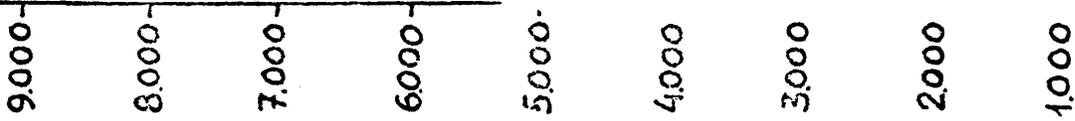


FIGURA 13

DISTRIBUCION DE LA IgA SERICA EN GRADIENTE DE DENSIDAD DE SACAROSA

EN UN PACIENTE CON GLOMERULONEFRITIS MESANGIAL IgA (IgA 250 mg%)

ng/ml.



↑ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14  
21 S 17 S 13 S 9 S 5 S

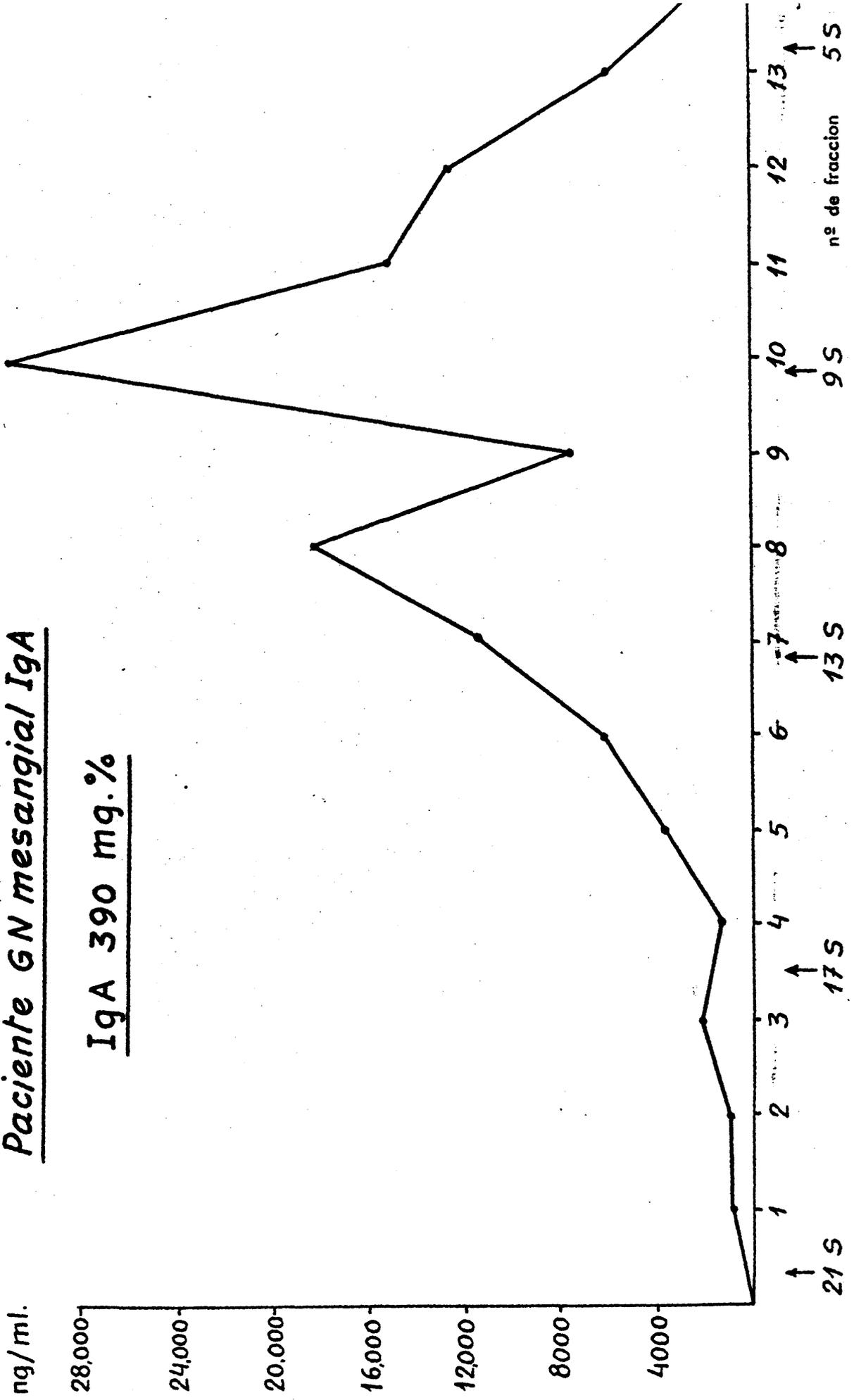
Nº DE FRACCION . 5 S

FIGURA 14

Distribución de la IgA sérica

Paciente GN mesangial IgA

IgA 390 mg.%



En la Tabla 6 están recogidos los valores individuales de los porcentajes de IgA sérica en las distintas zonas del gradiente correspondientes a sueros de 9 sujetos controles sanos.

En todos el porcentaje mayor de IgA sérica está en las fracciones con coeficientes de sedimentación entre (5-9)S. Este porcentaje osciló alrededor del 70-80% en todos los sujetos estudiados.

En la zona de coeficientes de sedimentación entre (17-13)S todos tienen un porcentaje inferior al 5%, solo hay uno con un porcentaje ligeramente superior al 5%.

A la zona con coeficientes de sedimentación entre (21-17)S corresponden los menores porcentajes, en todos los casos fue inferior al 1%.

En la Tabla 7 están recogidos los valores individuales de los porcentajes de IgA sérica en las zonas con distintos coeficientes de sedimentación en 15 pacientes con GN mesangial IgA.

Cuatro pacientes tienen sus porcentajes dentro de límites normales.

En la zona entre (9-13)S, nueve tienen porcentajes mayores al 25%. Tres de ellos tienen porcentajes mayores al 40%. En la zona entre (13-17)S, 11 de ellos tienen porcentajes superiores al 5%. A la zona entre (21-17)S le corresponden los porcentajes más bajos, tres de ellos tienen porcentajes superiores al 1%, en los demás los porcentajes están por debajo del 1%.

TABLA 6

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PORCENTAJES DE LA IgA SERICA EN CONTROLES DESPUES DE LA CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA A pH 7.4

<u>Controles</u>	<u>IgA sérica (mg%)</u>	<u>(5-9) S</u>	<u>(9-13) S</u>	<u>(13-17) S</u>	<u>(17-21) S</u>
F A M.	165	72.14	25.58	2.09	0.18
J.P.R.	180	75.46	20.86	3.06	0.61
A.S.L.	165	79.65	17.41	2.73	0.20
M.Z.M.	340	70.91	25.68	3.02	0.38
J.E R.	270	73.22	23.75	2.79	0.23
L.H.A.	300	73.37	22.16	4.08	0.39
R M A.	300	78.20	17.73	3.64	0.43
M.B.A.	240	73.80	20.31	5.27	0.61
A B H.	220	79.01	16.60	4.03	0.36

TABLA 7

Valores individuales en porcentajes de la IgA sérica en pacientes con glomerulonefritis mesangial IgA después de la centrifugación en gradiente de sacarosa a pH 7.4

Pacientes	IgA sérica (mg%)	(5-9) S	(9-13) S	(13-17) S	(17-21) S
T.L.O.	370	66.12	28.89	4.16	0.82
M.G.G.	175	40.21	50.62	8.54	0.63
S.H.H.	370	54.58	35.11	8.34	1.96
S.S.A.	350	71.26	25.60	2.59	0.69
A.A.D.	250	39.99	52.31	6.98	0.71
L.P.V.	370	58.38	34.26	6.84	0.52
A.A.U.	420	58.17	36.23	5.15	0.44
A.G.A.	375	32.18	43.38	21.84	2.59
M.S.V.	370	74.56	20.16	4.74	0.53
D.N.C.	250	59.50	32.75	6.97	0.78
V.T.G.	330	55.62	35.05	9.00	0.32
J.B.N.	200	74.65	18.05	6.44	0.83
J.T.L.	280	58.02	33.50	8.42	0.55
R.V.C.	520	80.93	16.01	2.56	0.49
G.G.L.	400	56.03	30.06	12.12	1.79

La Tabla 8 muestra las medias y desviaciones estándares correspondientes a los 9 sujetos y 15 pacientes estudiados. En el análisis estadístico de los resultados se utilizó la t Student, corrigiendo los grados de libertad en aquellos casos en que las varianzas eran distintas significativamente.

Podemos observar un aumento significativo de los porcentajes en las zonas con coeficientes de sedimentación entre (13-19)S,  $p < 0.0025$ . También hay un aumento significativo, pero en menor grado, en las zonas con coeficientes de sedimentación entre (17-13)S y (21-17)S. Como consecuencia de estos aumentos, en las zonas con coeficientes de sedimentación por encima de 95 hay un descenso muy significativo en los porcentajes en la zona entre (5-9)S. Aunque el método de cuantificación utilizado para la IgA total subestime en cierto grado los polímeros de IgS (Greenberg y col., 1978), las medias de los niveles de IgA sérica eran significativamente más altas en pacientes ( $328.7 \pm 9.9$  mg%) que en controles ( $242 \pm 64.5$  mg%). No había correlación entre niveles de IgA sérica y porcentajes de IgA de alto peso molecular ni en los pacientes ni en los controles.

En la Tabla 9 están recogidas las medias de los porcentajes correspondientes a 6 pacientes estudiados a pH 7.4 y pH 2.8. Estas medias no son distintas significativamente salvo en la zona (17-21)S en la que hay un aumento significativo de los porcentajes a pH 7.4, con respecto a pH 2.8.

TABLA 8

VALORES MEDIOS DE LA DISTRIBUCION DE IgA SERICA EN PACIENTES CON GLOMERULONEFRITIS MESANGIAL IgA DESPUES DE LA CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA A pH 7.4 EN RELACION CON LOS CONTROLES

	<u>Nº</u>	<u>(5-9) S</u>	<u>(9-13) S</u>	<u>(13-17) S</u>	<u>(17-21) S</u>
Controles	9	# 75.08 ± 3.17	21.12 ± 3.45	3.41 ± 0.95	0.38 ± 0.16
Pacientes	15	58.68 ± 13.74	32.80 ± 10.59	7.65 ± 4.68	0.91 ± 0.66
		p < 0.0025	p < 0.0025	p < 0.01	p < 0.025

# Media de los porcentajes ± desviacion estandar

t - test: corregidos los grados de libertad para varianzas distintas significativamente.

TABLA 9

VALORES MEDIOS DE LA DISTRIBUCION DE LA IgA SERICA EN 6 PACIENTES CON GN MESANGIAL  
IgA DESPUES DE LA CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA A pH 7.4 y pH 2.8

	<u>(5-9) S</u>	<u>(9-13) S</u>	<u>(13-17) S</u>	<u>(17-21) S</u>
Pacientes a pH 7.4	47.25 ± 11.19	41.98 ± 8.04	9.61 ± 6.11	1.14 ± 0.90
Pacientes a pH 2.8	51.52 ± 9.77	42.14 ± 6.40	5.50 ± 4.01	0.25 ± 0.11
	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0.05

Media de los porcentajes ± desviación estandar  
n.s. ; no significativo

Estas variaciones de porcentajes observadas a pH 2.8 pueden dar cuenta de un cierto grado de inmunocomplejos en el suero de estos pacientes como han apuntado algunos autores.

El mantenimiento de estos aumentos significativos entre (9-13)S y (13-17)S van a favor de que las formas de IgA con estos coeficientes de sedimentación son establecidas por uniones covalentes y no se trata de inmunocomplejos. En esta zona sedimentan los dímeros 10S y trímeros 13S de IgA, formas más frecuentes de IgA polimérica.

#### 7.3.8 Fiabilidad del método

Para ver si en estos pacientes el aumento de los porcentajes pudiera ser debido a la conservación de los sueros, un suero se analizó en dos momentos diferentes con intervalo de 4 meses.

Resultados:

	<u>(5-9) S</u>	<u>(9-13) S</u>	<u>(13-17) S</u>	<u>(17-21)S</u>
Previo	71.26	25.50	2.59	0.69
4 meses después	72.38	23.27	3.64	0.70

Vemos que después de 4 meses no ha cambiado apenas los porcentajes en las distintas zonas.

Para ver si el aumento en los porcentajes de IgA de alto peso molecular era una consecuencia del aumento de la tasa de IgA sérica, se estudiaron sueros de 4 pacientes con otras patologías con IgA sérica elevada y que no presen

tan nefropatía mesangial. Tabla 10.

Observamos que al menos los pacientes estudiados por nosotros tienen un patrón de distribución de la IgA sérica análogo a los controles.

No hay diferencias significativas entre las medias de los porcentajes de estos pacientes y los controles (Tabla 11).

#### 7.4 Aislamiento de IgA

Con el método de Litman y Good utilizado inicialmente, no fue posible evidenciar la fracción pesada de la IgA sérica de estos pacientes.

El rendimiento utilizado en el primer paso por cromatografía en DEAE celulosa bajó al 80% y tras el segundo paso a través del inmunoabsorbente, el rendimiento bajó hasta el 5%.

Con este método no fue posible evidenciar la IgA polimérica del suero de estos pacientes, no sabemos si debido a que en la pequeña cantidad obtenida no era posible evidenciar la IgA polimérica presente o a que ésta IgA quedaba retenida en alguno de los pasos intermedios del proceso de aislamiento.

#### Electroforesis en almidón

La electroforesis en almidón en tres pacientes estudiados (RVC, SHH, IRD) dió lugar a la aparición de IgA en las partes anódica y catódica del bloque de almidón co

TABLA 10

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PORCENTAJES DE IgA SERICA EN PACIENTES SIN NEFROPATIA MESANGIAL Y CON IgA SERICA ELEVADA

	<u>Diagnóstico</u>	<u>IgA sérica (mg%)</u>	<u>(5-9) S</u>	<u>(9-13) S</u>	<u>(13-17) S</u>	<u>(17-21) S</u>
A.R.L.	GN aguda y Diabetes	510	88.57	9.65	1.20	0.57
M.C.A.	Lupus discoide	425	78.46	16.50	4.26	0.78
F.M.S.	GN mínima y sin drome nefrótico	550	73.93	23.03	2.47	0.55
M.M.M.	Tiroiditis	420	71.72	25.86	2.16	0.25

VALORES MEDIOS DE LA DISTRIBUCION DE IgA SERICA EN PACIENTES SIN NEFROPATIA MESANGIAL Y CON IgA SERICA ELEVADA EN RELACION CON LOS CONTROLES A pH 7.4

	<u>Número</u>	<u>(5-9) S</u>	<u>(9-13) S</u>	<u>(13-17) S</u>	<u>(17-21) S</u>
Paciente	4	78.17 ± 7.47	18.76 ± 7.22	2.52 ± 1.27	0.53 ± 0.21
Controles	9	75.08 ± 3.17	21.12 ± 3.45	3.41 ± 0.95	0.38 ± 0.16
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Media de los porcentajes ± desviacion estandar

n.s. : no significativo

mo en el caso del suero con mieloma IgA utilizada para la obtención de IgA para marcaje.

Los rendimientos fueron inferiores a los obtenidos en el caso del mieloma IgA oscilando entre 35-40%.

La IgA proveniente de la parte catódica estaba contaminada con IgM o IgG o por ambas a la vez, y se localizó fundamentalmente en el segundo pico tras la filtración en gel de Sephadex, lo que parece indicar tratarse de monómeros (Figura 15).

La IgA proveniente de la parte anódica presentaba contaminación de alguna proteína de movilidad y de tamaño molecular menor, haptoglobina o siderofilina (Fotografías 5, 6 y 7). Esta IgA no estaba contaminada por otras inmunoglobulinas y se localizó fundamentalmente en el primer Sephadex (Figura 16).

#### 7.5 Reducción-alquilación

Una alícuota de IgA del suero de I.R.D. proveniente de la parte anódica de la electroforesis después de filtración en Sephadex G-200 superfino, se marcó con  $^{125}\text{I}$ . La IgA- $^{125}\text{I}$  presenta el mismo volumen de elución que antes de ser marcada lo que descarta una agregación o fragmentación de la proteína por el marcaje (Figura 17).

La IgA- $^{125}\text{I}$  se redujo durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  ditiotritol 0.04 M en un tampón Tris-salino 0.15 M, pH:8, conteniendo EDTA 0.002 M y se alquiló con iodoacetamida en la oscuridad 45 minutos 3,3 veces molar en exceso con respecto al reductor.

FIGURA 15

PERFIL DE ELUCION EN SEPHADEX G-200 SUPERFINO DE LA IgA OBTENIDA DE LA PARTE CATORCENA POR ELECTROFORESIS EN ALMIDON

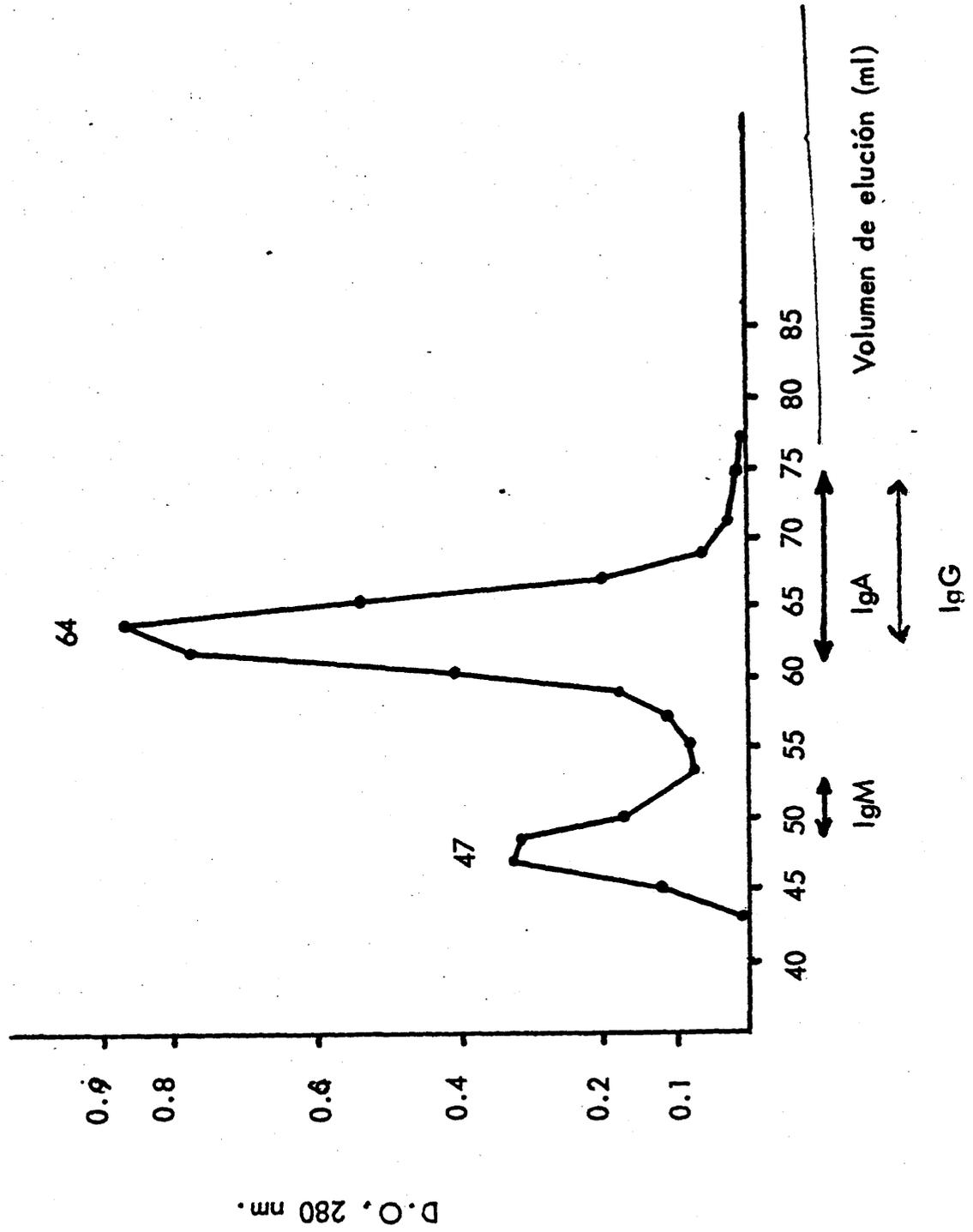
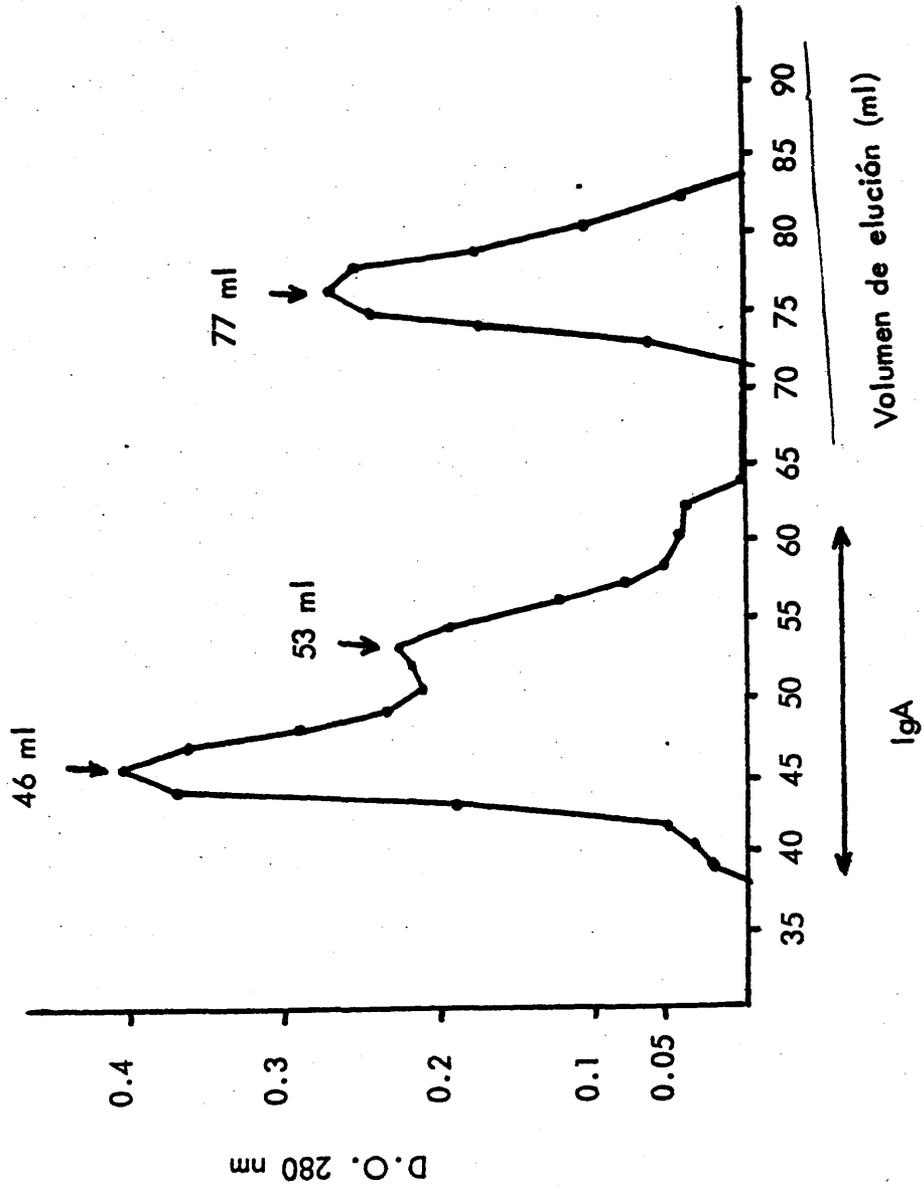
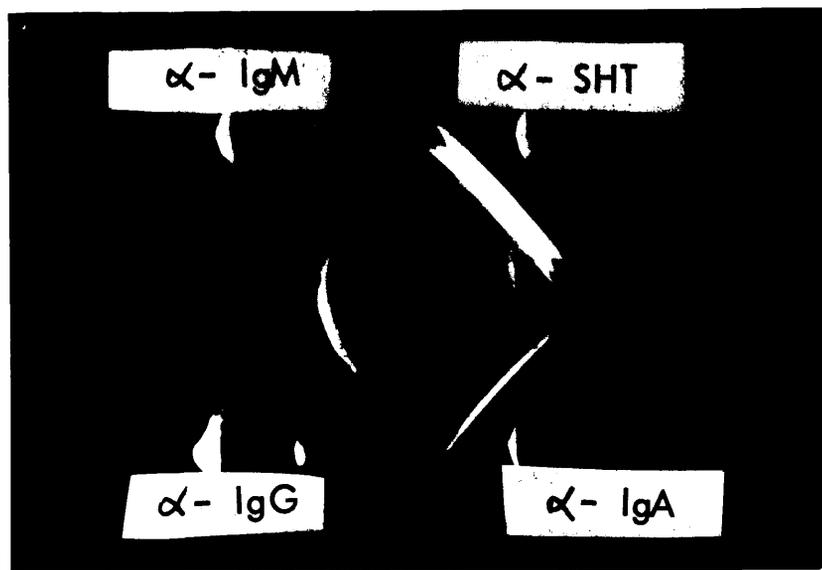


FIGURA 16

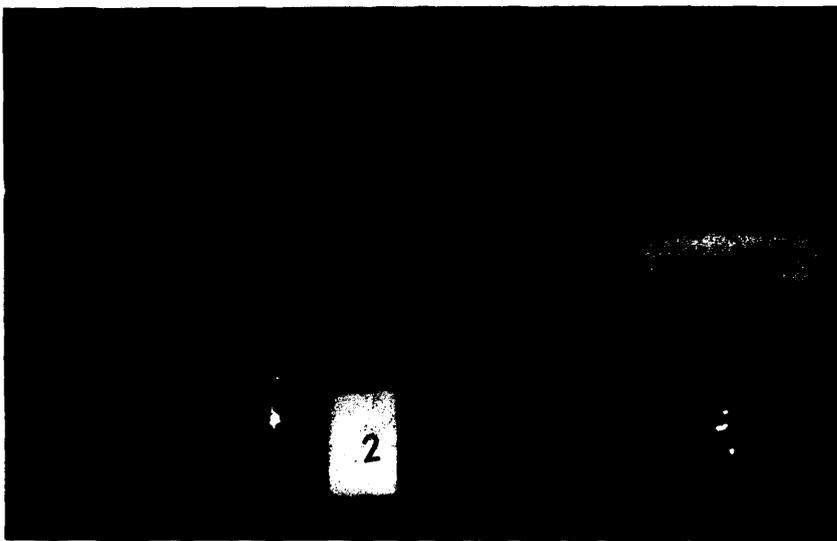
PERFIL DE ELUCION EN SEPHADEX G-200 SUPERFINO DE IgA OBTENIDA EN LA PARTE ANODICA POR ELECTROFORESIS EN ALMIDON





Fotografía 5: Inmunodifusión doble bidimensional.

Pocillo central: IgA de un paciente con GN mesangial IgA  
obtenido por electroforesis en almidón  
(parte anodica).



Fotografía 6



Fotografía 7

Fotografía 6: Inmunoelectroforesis de la IgA anodica después de pasar por Sephadex G-200 superfino revelada con suero antihumano total.

Pocillo 1: Suero humano normal.

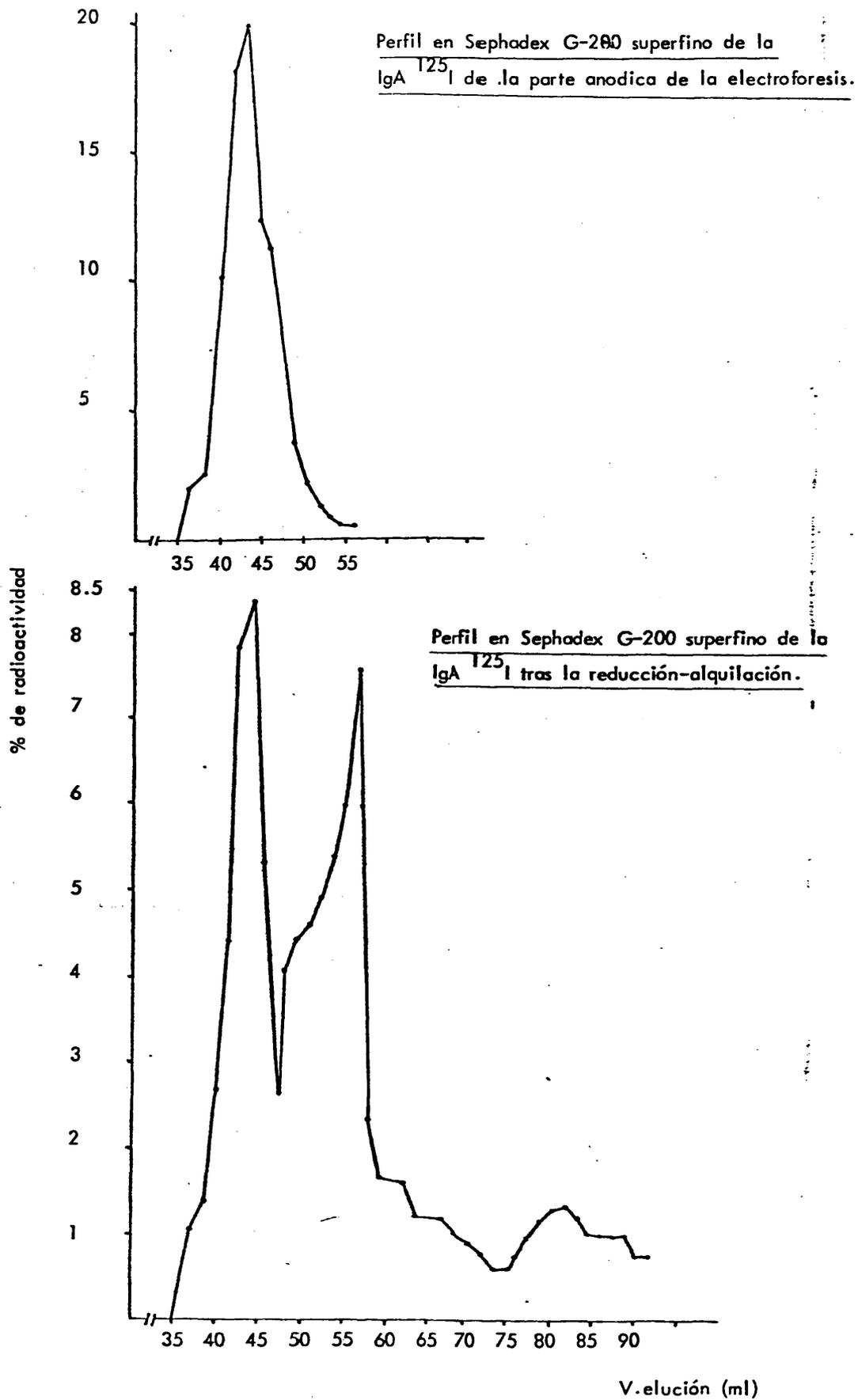
Pocillo 2: IgA anodica.

Fotografía 7: Inmunoelectroforesis de la IgA anodica anterior revelada con suero anti-IgA humana.

Pocillo 1: IgA anodica.

2: Suero humano normal.

FIGURA 17



La IgA-<sup>125</sup>I reducida y alquilada se pasó por la misma columna de Sephadex tras la reducción-alquilación observándose la aparición de fragmentos de tamaño molecular menor. El porcentaje de la IgA-<sup>125</sup>I establecido por precipitación inmunoreactiva, presente en el primer pico del Sephadex, antes y después de la reducción-alquilación fue del orden del 70 y 20 % respectivamente.

El pico 2 correspondería al monómero de IgA ya que corresponde al volumen de elución del 2º pico de la filtración de un suero humano normal en el que aparece la IgA monómero.

La susceptibilidad de esta IgA a tratamiento reductor, estaría también de acuerdo con la presencia de una IgA polimérica en el suero de estos pacientes.

#### 7.6 Presencia de cadena J

La presencia de cadena J en la IgA establecido por Radl y col., 1974, es un criterio de "verdaderos polímeros" para la IgA polimérica. Las muestras utilizadas, fueron IgA proveniente de la parte anódica del almidón o fracciones de IgA de alto peso molecular (sin IgM) provenientes de la filtración de suero de estos pacientes en Ultrogel Ac A 34.

La presencia de cadena J se detectó por electroforesis en geles de poliacrilamida urea alcalina.

En cuatro pacientes estudiados se evidenció la presencia de cadena J.

La Fotografía 8 muestra la presencia de este polipeptido en un paciente con GN mesangial IgA.

La Fotografía 9 muestra la movilidad de las cadenas ligeras en este medio, junto con la cadena J proveniente de reducir IgM; como se observa, su movilidad es bien distinta a la de la cadena J.

## 7.7 Estudios de afinidad al componente secretorio

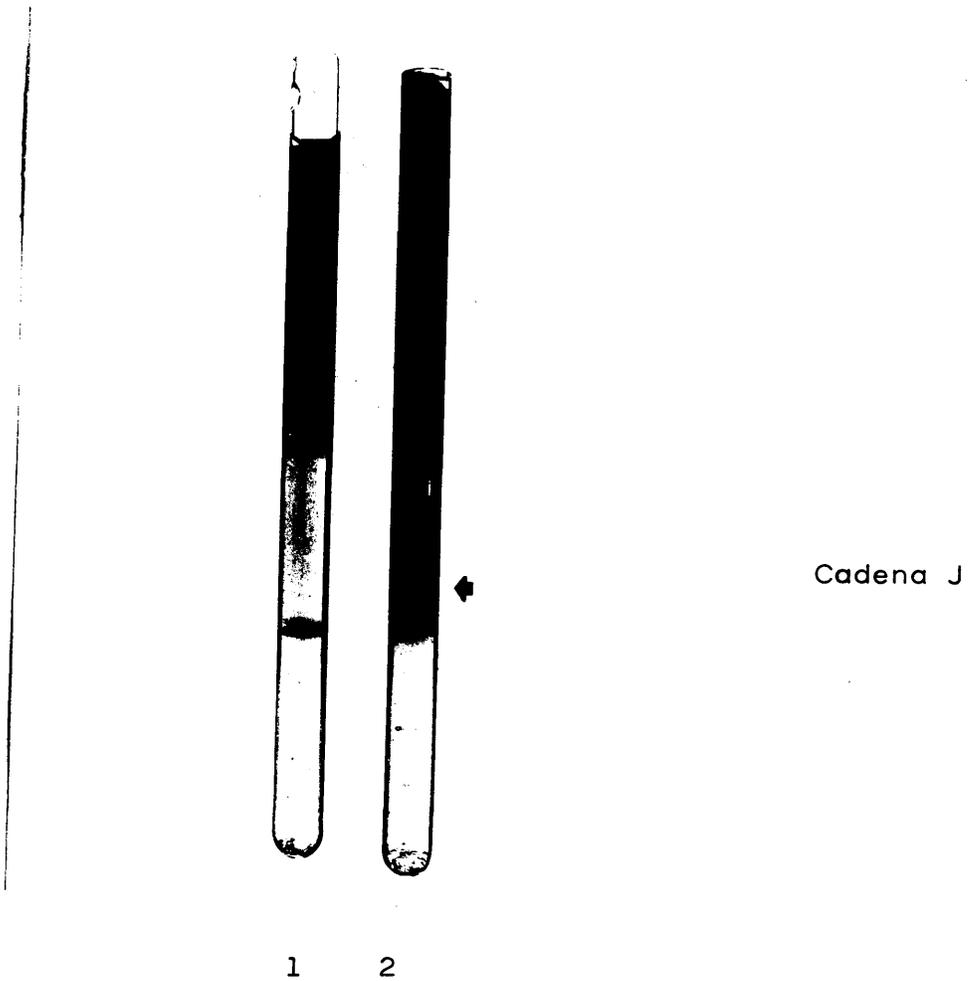
### Obtención del componente secretorio

La IgM se unió covalentemente al componente secretorio en una proporción aproximada de 30 mg/ml de Sepharosa. Estos son también los resultados obtenidos por Underdown y col., 1977, con éste método. De la proteína eluída de la Sepharosa IgM mediante KSCN se muestra su perfil en la Figura 18.

Las fracciones 5-6 de este eluído se dializaron frente a SS 0.15 M, pH: 7.2 aplicándose después a una columna de Sephadex G-200 superfino.

La Figura 18 muestra el perfil en densidades ópticas de las proteínas obtenidas. Las fracciones (40-49) del pico 9 en el que debe estar el componente secretorio libre se concentraron y analizaron su pureza en geles de poliacrilamida al 10% en SDS, apareciendo una banda única (Fotografía 10).

Su identidad se verificó con un antisuero anticomponente secretorio libre (Fotografía 11).



Fotografía 8: Electroforesis en geles de poliacrilamida (4%) urea alcalina.

Gel 1: IgA polimerica de un paciente con mesangial IgA sin reducir.

Gel 2: IgA polimerica de un paciente con mesangial IgA reducida.



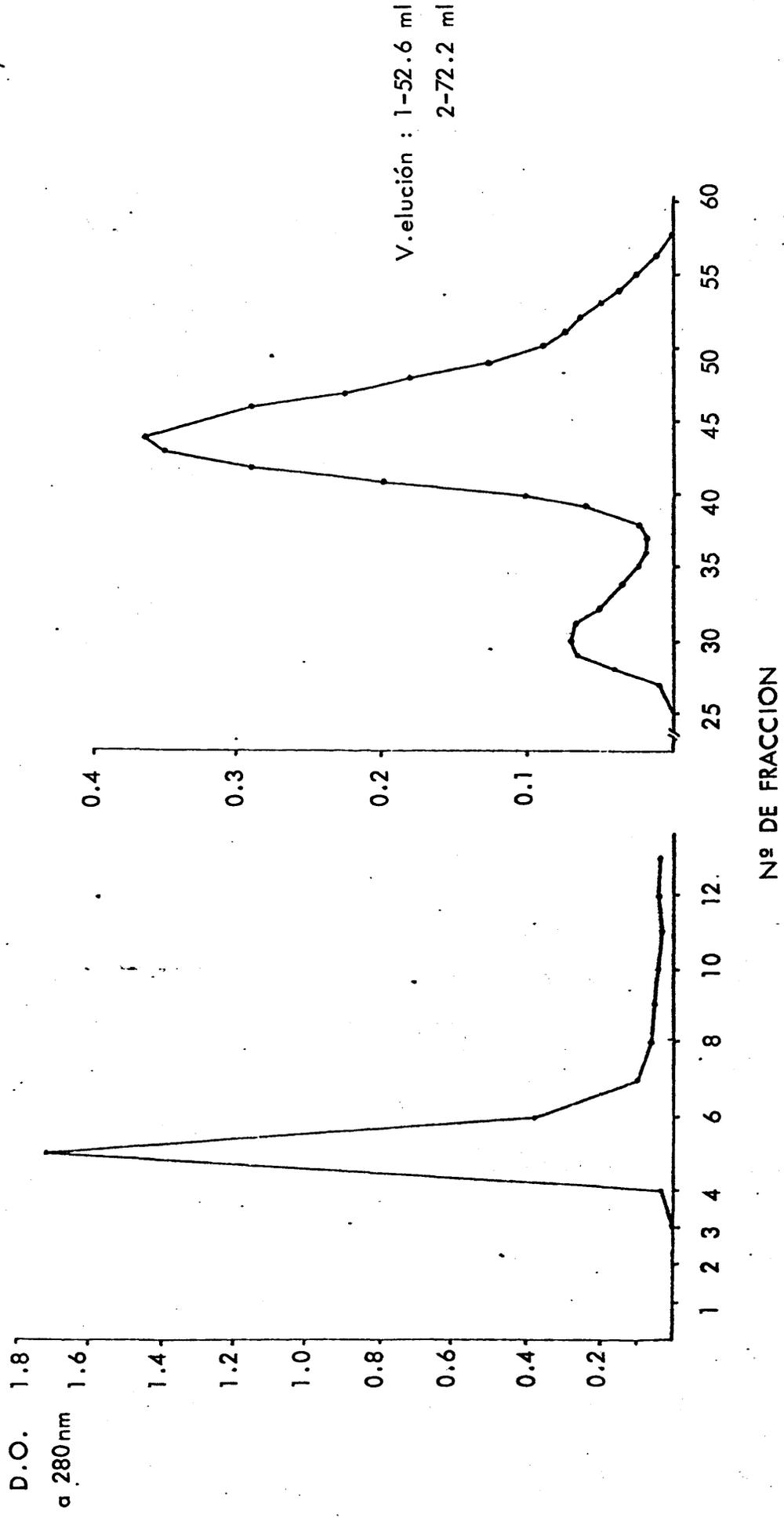
Fotografía 9: Electroforesis en gel de poliacrilamida (4%)  
urea alcalina.

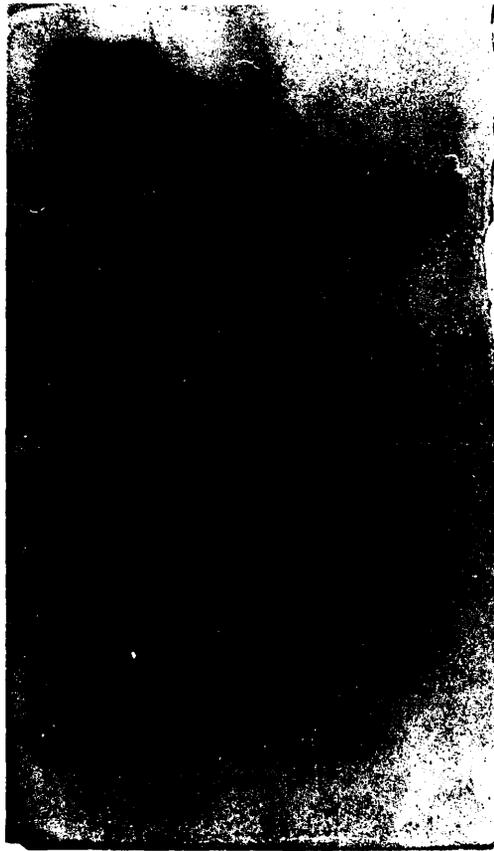
- Gel 1: IgM humana sin reducir.  
Gel 2: IgM humana reducida.  
Gel 3: Cadenas ligeras humanas.

FIGURA 18

DISTRIBUCION DE LA PROTEINA ELUIDA  
DE LA COLUMNA DE SEPHAROSA - 1gm  
EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

PERFIL EN SEPHADEX G-200 SUPERFINO DE LAS  
FRACCIONES (5,6) PROVENIENTES DE LA SEPHA  
ROSA - 1gm.





Fotografía 10: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%  
en SDS.

1: IgG de conejo (150000 Dalton)

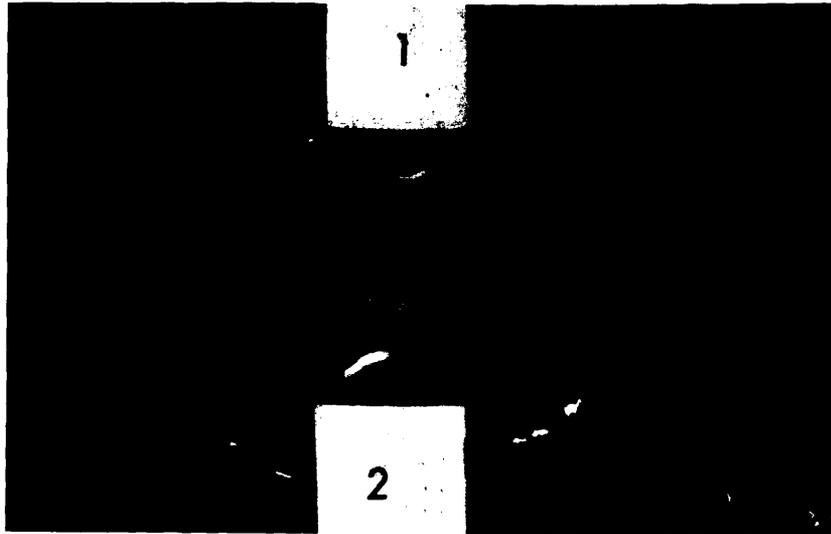
2: Marcadores: Fosforilasa a de musculo de conejo  
(96000 Dalton).

Albumina sérica bovina (66000 Dalton)

Cadena ligera humana (25000 Dalton)

Citocromo C de caballo (12400 Dalton)

3: Componente secretorio libre.



Fotografía 11: Inmunodifusión doble bidimensional.

Pocillo 1: Antisuero anti-componente secretorio libre humano.

Pocillo 2: Componente secretorio libre humano.

Marcaje del componente secretorio libre

1 mg. de esta proteína se marcó con 1 mCi de  $^{125}\text{I}$  según el método descrito. La purificación se verificó mediante filtración en gel de Sephadex G-25. La Figura 19 muestra el perfil de esta purificación. La incorporación de  $^{125}\text{I}$  fue del orden del 70%.

Ensayo de afinidad CS- $^{125}\text{I}$ -IgA polimérica

Alícuotas de IgA de alto peso molecular provenientes del suero de pacientes con GN mesangial IgA, así como otra conteniendo IgM proveniente del suero de un paciente con macroglobulinemia de Waldstrom, se incubaron con CS- $^{125}\text{I}$  en las condiciones descritas. Los resultados de este ensayo están recogidos en la Figura 20.

La afinidad de la IgA polimérica de estos pacientes por el componente secretorio fue del orden del 60%, la radiactividad se localizó fundamentalmente en las zonas entre (9-17)S. Hay también cierta unión en las zonas con coeficiente de sedimentación 19S, donde están las formas más pesadas de IgA sérica.

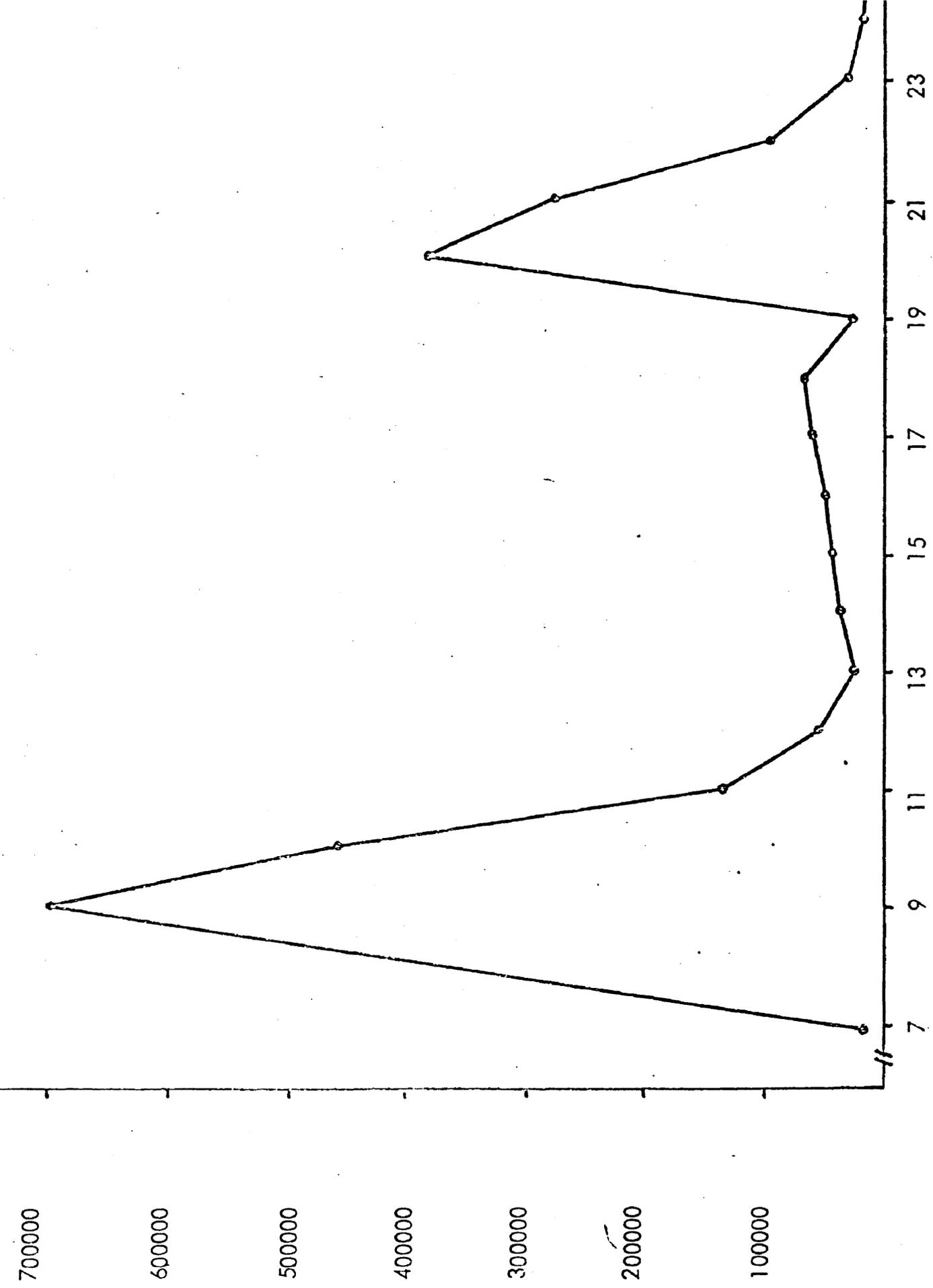
La IgM muestra una afinidad superior. Estos resultados con IgA polimérica e IgM son análogos a los encontrados por Brandtzaeg (1974) utilizando las mismas condiciones de incubación y fuerza iónica.

El perfil de distribución de la radioactividad encontrada con IgA monomérica es análoga a lo que se encuentra con el componente secretorio libre, lo cual confirma la falta de afinidad por el componente secretorio del mo-

PURIFICACION DE CS-<sup>125</sup>I DEL <sup>125</sup>I LIBRE DESPUES DEL MARCAJE EN FILTRACION

EN GEL DE SEPHADEX

cuentas en 0.1 ml



Distribución de la radioactividad del CS-<sup>125</sup>I después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa incubado en las condiciones siguientes :

19 S                      13 S                      7 S

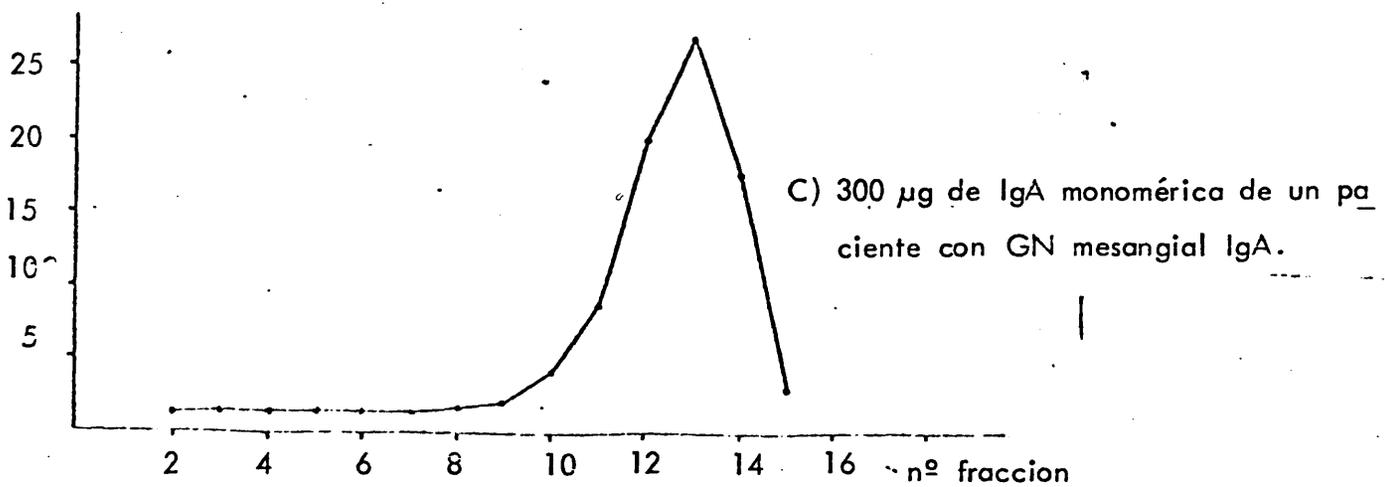
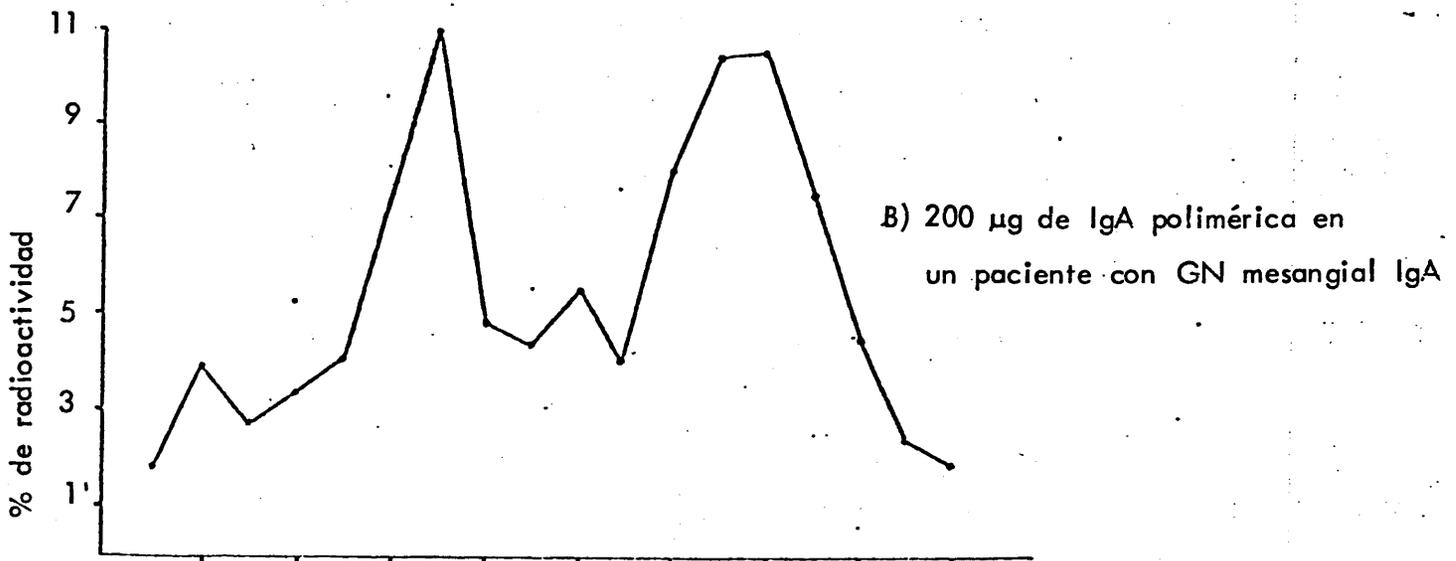
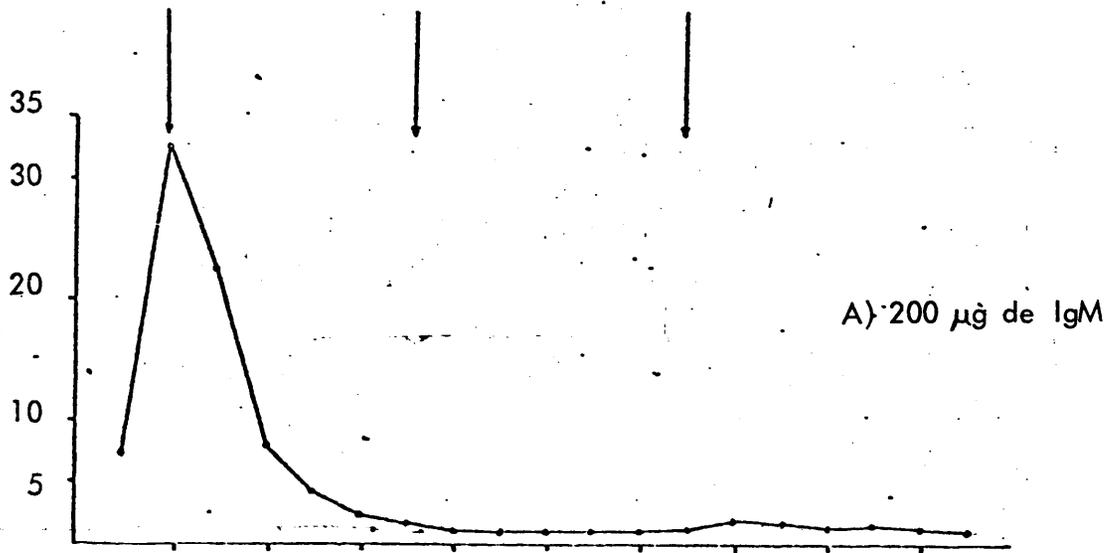


FIGURA 20

número de IgA.

#### 7.8 Posible origen secretorio de la IgA polimérica

La posibilidad de que esta IgA de alto peso molecular, fuese IgA secretora fue considerada. En muestras reducidas con mercaptoetanol urea, se hizo inmunodifusión doble con un antisuero frente a componente secretorio libre, no apareciendo banda de precipitación.

#### 7.9 Resultados del tratamiento de estos pacientes con difenilhidantoína.

En la Tabla 12 se muestra la distribución de porcentajes de IgA sérica en tres pacientes tratados con difenilhidantoína a los 3 y 6 meses del tratamiento.

Observamos que en la paciente M.T.V. hay una normalización de los porcentajes de IgA sérica después de 3 meses de tratamiento. En la paciente D.N.C. ésta normalización no se observó hasta los 6 meses. La paciente M.S.V. aunque partió de porcentajes normales también tuvo un descenso en las formas poliméricas de IgA sobre todo entre (9-13)S.

El enfermo M.T.G. ha sido rebiopsiado recientemente. Por inmunofluorescencia se observó la desaparición de la IgA depositada en el mesangio glomerular.

Estos resultados abren nuevas posibilidades terapéuticas para el tratamiento de esta nefritis con difenilhidantoína.

TABLA 12

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON DIFENILHIDANTOINA (DH) SOBRE LA IgA SERICA EN PACIENTES CON GN MESANGIAL IgA

<u>Paciente</u>		<u>(5-9) S</u>	<u>(9-13) S</u>	<u>(13-17) S</u>	<u>(17-21) S</u>	<u>DH/<math>\mu</math>g/ml</u>
D.N.C.	antes de DH	59.50	32.75	6.97	0.78	-
	3 meses después	65.32	31.63	2.58	0.46	6
	6 meses "	77.34	18.71	3.23	0.71	11.5
M.T.G.	antes de DH	55.62	35.05	9.0	0.32	-
	3 meses después	73.20	23.43	3.02	0.33	0.5
	6 meses "	75.72	22.0	1.70	0.57	6.5
M.S.V.	antes de DH	74.56	20.16	4.74	0.13	-
	3 meses después	84.46	13.46	2.73	0.35	12
	6 meses "	84.30	13.98	1.40	0.32	5

## DISCUSSION

## 8. DISCUSION

Berger descubrió en 1969 una nefropatía glomerular caracterizada por el depósito de IgA fundamentalmente a nivel mesangial.

Estos depósitos pueden también localizarse aunque sólo ocasionalmente, a lo largo de la pared capilar. La IgA puede ser la única inmunoglobulina que se deposite. Este hecho, junto con el aumento de la tasa de IgA sérica, observado en un tanto por ciento importante de pacientes ( $\approx 70\%$  en nuestra experiencia. Perez García y col., 1977) y la recidiva de la enfermedad tras el trasplante renal, han centrado la atención en esta inmunoglobulina como un factor importante en la patogenia de esta glomerulonefritis.

La posible alteración cualitativa de esta inmunoglobulina sérica ha sido postulada por algunos autores (Berger, 1975; Lagrue y col., 1974).

No hay en la literatura ningún trabajo sobre el estudio cualitativo de la IgA sérica en estos pacientes. Los primeros estudios realizados por nosotros mediante la filtración en gel de Sephadex G-200 superfino, pusieron de manifiesto la presencia de IgA en el primer pico de la cromatografía (en pacientes tanto con IgA sérica elevada como normal). Este primer abordaje nos hizo pensar en la posibilidad de que existiera una mayor cantidad de IgA de alto peso molecular en el suero de estos pacien-

tes respecto a controles, ya que en suero humano normal, la presencia de IgA en el primer pico del Sephadex es un hecho poco común en las condiciones utilizadas.

Con el fin de poder estudiar más detalladamente cuáles eran los porcentajes de IgA de alto peso molecular en el suero de estos pacientes y en controles normales, se realizó un fraccionamiento del suero de estos pacientes mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa a pH 7.4 y pH 2.8.

En este gradiente había una buena correlación en tre las posiciones de los marcadores y coeficientes de sedimentación. Mediante refractometría comprobamos la linearidad del gradiente de sacarosa. El radioinmunoensayo utilizado para cuantificar la IgA presente en cada fracción permite cuantificar IgA de alto peso molecular sin los errores que presenta la inmunodifusión radial para estas macromoléculas. Este radioinmunoensayo presenta un aceptable grado de fiabilidad en cuanto a reproducción inter e intra-análisis, sensibilidad, recuperación y paralelismo entre diluciones.

El estudio cualitativo de la IgA sérica después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa en un método directo que obvia los errores que pueden llevar los métodos de aislamiento en los que sólo va a ser recuperada una parte de la IgA de partida y en los que ha podido haber una alteración de las formas monómero/polímero de la muestra inicial.

Mediante este estudio cualitativo hemos visto que la IgA sérica circulante es en su mayor parte monomérica en el suero humano normal ( $\approx 75\%$ ). Este dato concuerda bien con los datos de la bibliografía (Heremans, 1974b; Radl y col. 1974).

De los 15 pacientes con enfermedad de Berger hay 4 que presentan una distribución de IgA sérica análoga a la de los controles. Los 11 restantes tienen un mayor porcentaje de IgA sérica de alto peso molecular superior que los controles. Las medias de la distribución de la IgA sérica con distintos coeficientes de sedimentación en los pacientes estudiados, establecen un aumento significativo de los porcentajes de IgA sérica entre (9-13) S, (13-17)S y (17-21) S en estos pacientes respecto a los controles.

Cuatro pacientes estudiados por nosotros con IgA sérica alta y sin nefropatía mesangial presentan un patrón de distribución de su IgA sérica análoga a los controles.

Estas formas de IgA pesada plantean la posibilidad de que puedan ser debidas a inmunocomplejos, entidades moleculares frecuentes en otros tipos de glomerulonefritis: lupus eritematoso diseminado, GN membranosa, etc.

La presencia de un aspecto granular de los depósitos de IgA a nivel mesangial en estos pacientes, también llevó a englobarla, en principio, dentro de las GN por inmunocomplejos, puesto que recordaban a lo observado en la nefritis experimental por ICs.

Para estudiar si estos aumentos en los coeficientes de sedimentación eran debidos a una IgA unida no covalentemente con otras proteínas como inmunocomplejos, se centrifugaron sueros de 6 pacientes a pH 2.8. Las variaciones de los porcentajes observados entre 17-21S a pH 2.8, podrían explicar el escaso porcentaje de inmunocomplejos en el suero de estos pacientes (Glauckman y col., 1978; Tung y col., 1978).

En la zona entre (9-17) S los porcentajes en los pacientes estudiados a pH ácido, no varían, lo cual está a favor de la naturaleza covalente de esta IgA. En estas zonas sedimentan las formas más frecuentes de IgA polimérica: dímeros (10S), trímeros (13S) y tetrámeros (15S).

Las medias de los niveles de IgA sérica eran significativamente más altas en los pacientes ( $328.7 \pm 9.10$  mg%) que en los controles ( $242 \pm 64.5$  mg%). No hubo correlación entre los niveles de IgA sérica y porcentajes de IgA de alto peso molecular ni en los sujetos ni en los controles.

Con el método utilizado en el aislamiento, inicialmente no fue posible evidenciar más que la presencia de IgA monomérica. Mediante electroforesis en almidón obtuvimos una IgA en la parte anódica con tamaño molecular superior al monómero (a juzgar por el menor volumen de elución). Este distinto comportamiento de la IgA monómero y polímero en electroforesis en almidón ha sido observado por Gavrilova y col., 1976, en IgA proveniente de sueros de pacientes con mieloma IgA.

La naturaleza covalente de estas formas de IgA pesada está atestiguada por su sensibilidad a tratamiento reductor, produciendo fragmentos de tamaño molecular menor.

La presencia de radioactividad en el primer pico del Sephadex, tras la reducción-alquilación, da cuenta de la no despolimerización total de la IgA-<sup>125</sup>I, como han apuntado algunos autores, (Parkhouse y Corte, 1974) y de la falta de pureza total de la IgA de partida.

Con estos hechos podíamos atestiguar que se trataba de formas de IgA pesada establecidas por uniones covalentes (no sensibles a pH ácido y sensibles a tratamiento reductor) lo cual nos podría llevar a hablar de formas "poliméricas de IgA".

Para algunos autores la existencia de "verdaderos polímeros de IgA" (Radl y col., 1974) necesita además de ciertos requisitos como son: presencia de cadena J, afinidad por el componente secretorio y reactividad con un antisuero específico para formas poliméricas de IgA.

La presencia de cadena J fue evidenciada mediante electroforesis en poli(acrilamida-urea)-alcalina, descartándose la posibilidad de que sea cadena ligera, a juzgar por la movilidad de éstas en este medio. Este polipéptido ha sido detectado en IgM y formas poliméricas de IgA, se ha descrito en algún paciente con mieloma IgA sin presencia de cadena J; asimismo, también en algún paciente con macroglobulinemia de Waldstrom hay ausencia de este polipéptido (Eskeland y Brandtzaeg, 1974). Su misión parece ser la de unir subunidades monoméricas, para ayudar a man

tener su estructura terciaria. Estos autores han mostrado resultados contradictorios en los que la cadena J no sería necesaria para la polimerización, sino más bien en la transferencia de inmunoglobulinas poliméricas a las secreciones exocrinas, para lo cual la IgA se combina con el componente secretorio.

Para ver la afinidad por el componente secretorio fue preciso aislar éste de calostro humano mediante cromatografía de afinidad con una Sepharosa a la que se le había unido covalentemente IgM. Con el método utilizado se obtuvo un buen grado de pureza, como lo atestigua la electroforesis en SDS. Su identidad fue atestiguada con un antisuerro anti-componente secretorio libre.

La afinidad por el componente secretorio fue observada en cuatro pacientes estudiados. El porcentaje de componente secretorio marcado con <sup>125</sup>I unido a la IgA polimérica fue del orden del 60%, permaneciendo aproximadamente un 40% de la radioactividad en las zonas con coeficientes de sedimentación inferior a 7S. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Brandtzaeg, 1974, en las mismas condiciones de incubación y fuerza iónica del tampón utilizado. Este autor encuentra también un porcentaje de unión al componente secretorio en la IgM, análogo al mostrado por nosotros en estas experiencias. En el caso de la IgA monomérica la distribución de radioactividad coincide con lo que se observa en la centrifugación de una muestra conteniendo sólo componente secretorio, lo cual confirma que no existe ninguna afinidad del componente secretorio por la IgA monomérica, como ya estaba descrito. El componente secretorio confiere a las inmunoglobulinas poliméricas una mayor

resistencia y estabilidad frente a los ataques proteolíticos. Estas dos experiencias adicionales (afinidad por el componente secretorio y presencia de cadena J) son una confirmación de que se trata de verdaderos polímeros de IgA.

La causa de altos niveles de IgA polimérica en el suero de estos enfermos es desconocida. En algunos pacientes con ciertas enfermedades intestinales (enfermedad celíaca, colitis ulcerativa) se ha evidenciado la presencia de IgA secretora en suero en un 41% de ellos, frente a un 9% en controles normales. (Thompson y col., 1969). Nosotros hemos buscado la presencia de componente secretorio en muestras de "IgA polimérica" de cuatro pacientes, después de la reducción con mercaptoetanol, sin resultados positivos. Algunos autores han buscado también el componente secretorio en biopsias de estos pacientes sin que haya sido posible evidenciarla. Estas experiencias indicarían que esta IgA tiene su origen en los linfocitos circulantes y no en las secreciones. Además, recientemente, Sakai y col. 1978, han mostrado que todos los pacientes con esta nefropatía presentaban un aumento de los linfocitos periféricos portadores de IgA. La actividad de las células T supresoras IgA específicas estaba disminuida en relación a los controles.

El papel de la IgA sérica en la inmunidad sistémica no está claro. Pocas actividades como anticuerpo han sido encontradas para la IgA. En algunas IgA de mieloma se ha encontrado IgA anticuerpo frente a músculo liso (Toh y col., 1977). También se han encontrado en pacientes con dermatitis herpetiformis anticuerpos anti membrana ba

sal (Yaoita y Katz, 1977). En relación con la IgA de estos pacientes con mesangial IgA, algunos autores (Lowance y col., 1973) y en nuestro laboratorio (Sancho, J. 1979) se han buscado anticuerpos, factores antinucleares, anticuerpos anti-músculo liso, anti-membrana basal, sin haber sido posible evidenciarlos.

El mesangio glomerular (Vernier, 1971) parece actuar eliminando los residuos de filtración de muchas partículas trazadoras inyectadas en la circulación: Thorotrast, ferritina, oro coloidal, que están en las vacuolas intracitoplasmáticas de las células mesangiales. Los inmunocomplejos, especialmente los formados en equivalencia, los más pesados y menos solubles, se podrían depositar en el mesangio (Bari y col., 1970; Dressman y col., 1970). La mayor cantidad de IgA polimérica encontrada en el suero de estos pacientes con enfermedad de Berger, podría seguir el mismo camino. La desaparición de la IgA del mesangio en un paciente con esta nefropatía concomitante con el retorno a la normalidad de los porcentajes de IgA de alto peso molecular, tras el tratamiento con difenilhidantoína son sugestivos en apoyo de esta hipótesis.

El descenso en las formas poliméricas de estos pacientes tratados con difenilhidantoína van a favor también de que se trata de una IgA polimérica y que no sea una nefropatía por inmunocomplejos.

La difenilhidantoína es una droga que baja la IgA sérica en pacientes con epilepsia (Sorrell y Forbes, 1975). Se ha visto también que pueden descender la IgM y la IgG, pero los descensos no son significativos como en el caso

de la IgA.

En estudios realizados en cultivos de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina se vió que había una - inhibición en la síntesis del DNA, quizás debido a que de primera la DNA polimerasa (Sorrell y Forbes, 1975).

Recientemente, Seager y col., 1978, han visto que esta droga disminuye la IgA también en ratones. Levo y col., 1975, observaron que en las células del bazo de ratones tratados la respuesta inmune estaba disminuida. Los macrófagos están implicados en la rama aferente de la respuesta inmune, ellos realizan una cooperación con las células T en la exposición del antígeno para la producción de anticuerpos en las células B (Feldmann, 1972); y hay una evidencia de que la formación de IgA es especialmente dependiente en la cooperación eficaz T y B (Clough y col., 1971). Seager y col., 1978, han encontrado una supresión de la función de los macrófagos con difenilhidantoína pero no la han podido correlacionar con el descenso de inmunoglobulinas. La difenilhidantoína afecta a muchos sistemas enzimáticos, pero es difícil de especificar el mecanismo de estos efectos. El restablecimiento del patrón normal de IgA sérica en dos pacientes y el descenso de los niveles de formas poliméricas de IgA en uno de los pacientes con niveles normales, junto con los resultados de la biopsia de uno de los pacientes tratados con esta droga, en que han desaparecido los depósitos de IgA en el mesangio, abren nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento de esta nefritis, así como en el modo de actuación de es

ta droga sobre el sistema de cooperación linfocitos T-B.

Además, el establecimiento de un patrón normal de IgA sérica a la vez que desaparece la IgA del mesangio, favorecería la hipótesis de que una mayor cantidad de IgA polimérica en el suero de estos pacientes es capaz de sobrepasar la capacidad de retículo endotelial del mesangio y depositarse. Se necesitan más datos sobre el efecto de esta droga en otros pacientes con esta GN. Todos los datos actuales en la bibliografía (Berger, 1978; Droz, 1976) sobre biopsias iterativas en estos pacientes, hablan de la persistencia de la IgA en esta GN a lo largo de toda la enfermedad.

En cuanto al mecanismo de depósito de esta IgA, la reciente demostración de depósitos de IgA en el hígado, intestino y piel de algunos pacientes con hepatopatía alcohólica (Kater y col., 1978), sugeriría que con las proteínas agregadas se sobrepasaría la capacidad del sistema retículo endotelial y los depósitos de IgA persisten. Otra alteración hipotética de este sistema no puede ser excluida.

El porcentaje de IgA normal hallado en algunos pacientes sugeriría, que bien el momento de la determinación es crítico o bien, la existencia de un subgrupo de pacientes en esta entidad.

La persistencia de los niveles elevados de IgA debe de ser importante puesto que en algunos pacientes con mieloma IgA, en los que hay altos niveles de IgA polimérica no hay depósito mesangial de esta inmunoglobulina posiblemente por la mala evolución de estos pacientes a corto plazo que no daría tiempo a depositarse.

Otro problema por esclarecer es la naturaleza de la IgA depositada en el mesangio de estos pacientes. La obtención de riñones de estos enfermos para realizar la elución de la IgA depositada no es fácil ya que es una nefropatía en principio benigna y con bajo índice de mortalidad. Actualmente se está estudiando en nuestro laboratorio cualitativamente la IgA sérica de pacientes cirróticos, así como la naturaleza de la IgA eluida de riñones de las autopsias de los mismos. La posible relación bioquímica entre ambas formas de IgA es desconocida. Existen otras nefropatías (no enfermedad de Berger) en las que hay depósitos mesangiales de IgA (Síndrome de Schönlein-Henoch, hepatopatía alcohólica, dermatitis herpetiformis) sin que se conozca la interrelación entre ellas.

La pregunta fundamental en esta glomerulonefritis es el porque estos pacientes presentan esta IgA alterada. Recientemente , Sakai y col., 1978, encontraron un aumento en los linfocitos periféricos portadores de IgA, no sólo en los pacientes sino en algunos familiares. Esto unido a que nosotros mismos hemos encontrado un aumento de IgA polimérica en algunos familiares sugieren factores inmunogénicos que pudieran intervenir en la patogénesis de la enfermedad de Berger.

También se ha buscado la conexión de esta nefropatía con algún antígeno del sistema HLA. Recientemente Berthoux y col., 1978, encontraron el antígeno Bw-35 en un 40% de los pacientes con esta nefropatía, frente a un 20% en la población normal.

Sabatier y col., 1978, han descrito dos hermanos con GN mesangial IgA que tienen el antígeno Bw-35.

En 12 de nuestros pacientes con enfermedad de Berger, que han sido tipados, se ha visto una frecuencia del 58% de este antígeno en estos pacientes frente a un 18% - en la población normal.

La anomalía descrita en estos pacientes, junto con las posibilidades terapéuticas con difenilhidantoína, siguen centrando nuestro interés en esta glomerulonefritis.

## CONCLUSIONES

### CONCLUSIONES

1. Se ha realizado un estudio cualitativo de la IgA sérica en pacientes con glomerulonefritis mesangial IgA y controles mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa a pH 7.4 y pH 2.8 y posterior cuantificación de la IgA presente en cada una de las fracciones por radioinmunoensayo.
2. En el gradiente de densidad de sacarosa, tanto a pH 7.4 como a pH 2.8, existía una buena correlación entre la posición de los marcadores con distintos coeficientes de sedimentación y el número de fracción correspondiente. La linealidad de este gradiente, establecida por refractometría, era también buena.
3. El radioinmunoensayo utilizado para cuantificar la IgA en las distintas fracciones tenía una suficiente fiabilidad, establecida por medio de: reproductibilidad inter e intra-ensayo, recuperación, sensibilidad y paralelismo entre diluciones.
4. El resultado del análisis cualitativo de la IgA sérica en sujetos normales, establece que el mayor porcentaje de IgA sérica ( $\approx 75\%$ ) es monomérica como ya se conoce por los datos de la bibliografía.

5. El estudio cualitativo de la IgA sérica en los pacientes con GN mesangial IgA mostró un comportamiento de su IgA distinto del observado en los sujetos controles, apareciendo un mayor porcentaje de IgA sérica en estos pacientes entre (9-21) S. Cuatro de estos pacientes tenían una distribución de su IgA sérica análoga a los controles.
6. Las medias de los niveles de IgA sérica eran significativamente más altos en los pacientes que en los controles. En cambio, no hubo correlación entre niveles de IgA y porcentajes de IgA de alto peso molecular ni en los pacientes ni en los controles.
7. El análisis estadístico de los resultados mostró un aumento significativo de los porcentajes de IgA sérica entre (9-21) S en los pacientes respecto a los controles, después de la centrifugación a pH: 7.4.
8. En pacientes se estudió la distribución de la IgA sérica a pH: 2.8 no habiendo variaciones significativas en las medias de los porcentajes entre (9-17) S con relación a los resultados a pH: 7.4. Sólo hubo un ligero descenso de los porcentajes de IgA en estos pacientes entre (17-21) S.
9. Estos resultados son compatibles con la presencia de un mayor porcentaje de IgA de alto peso molecular esta

blecido por uniones covalentes en los pacientes y en los controles. La pequeña variación de los porcentajes observada entre (17-21) % puede ser la expresión de que exista una parte de IgA como inmunocomplejos en el suero de estos pacientes.

10. La sensibilidad de esta IgA anódica a tratamiento reductor confirma la naturaleza covalente de la IgA pesada - tratándose por tanto de formas poliméricas de IgA.
11. En el aislamiento realizado mediante electroforesis en almidón de la IgA sérica, se observa un distinto comportamiento en cuanto a la movilidad electroforética de la IgA monomérica, que se localiza en la parte catódica e IgA pesada (anódica) de estos pacientes.
12. La presencia de cadena J en estos polímeros de IgA fue atestiguada por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea-alcalina, descartándose la posibilidad de que fueran cadenas ligeras como se muestra por la movilidad de ellas en este medio.
13. Para estudiar la afinidad al componente secretorio fue preciso aislar componente secretorio libre de calostro humano, obteniéndose una preparación pura y que reaccionaba con un antisuero específico.

14. La afinidad de IgA polimérica de estos pacientes por el componente secretorio fue del orden del 60%, inferior a la mostrada por IgM.
15. La presencia de cadena J y afinidad por el componente secretorio confirma la naturaleza de "verdaderos polímeros" para estas formas de IgA pesada.
16. Con el tratamiento de algunos de estos pacientes con difenilhidantoína (droga que baja selectivamente la IgA), se observó el establecimiento del patrón de normalidad en la distribución de IgA con distintos coeficientes de sedimentación. En un paciente que tenía un patrón normal de distribución de su IgA sérica se observó también un descenso en las formas de mayor tamaño molecular.
17. La disminución de los porcentajes de IgA alto peso molecular iría a favor también de que se trate de una IgA polimérica y no sean inmunocomplejos.
18. El restablecimiento de un patrón normal de la IgA sérica de estos pacientes, junto con el hecho de que haya desaparecido la IgA despositada en el mesangio de uno de ellos, abren nuevas posibilidades en el tratamiento de esta nefritis.
19. En resumen, se muestra que los pacientes con enfermedad de Berger tienen un mayor porcentaje de IgA polimérica

en suero que en controles normales, lo que supone una aportación nueva a la patogenia de esta glomerulonefritis. Estos porcentajes descienden tras el tratamiento con difenilhidantoína, lo cual sugiere una posibilidad terapéutica en esta nefropatía.

## BIBLIOGRAFIA

10. BIBLIOGRAFIA

ALARCON-SEGOVIA, D. y FISHBEIN, E. (1972).

Serum immunoglobulins in Systemic lupus erythematosus.  
Clin. Sci. 43, 121.

ANDRE, F. y ANDRE, C. (1976a).

Cirrhotic glomerulonephritis and secretory immune globulin A (letter).  
Lancet., 1, 197.

ANDRE, F. y ANDRE, C. (1976b).

Participation de l'immunoglobuline A monomérique et dimérique à l'hyperglobulinémie de la cirrhose éthylique.  
Arch. Fr. Mal. App. Dig., 65, 147.

ANDREWS, P. (1964)

Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration.  
Biochem. J., 91, 222.

ANGEVINE, C. D., ANDERSEN, B.R. y BURNETT, E. V. (1966)

A cold agglutinin of the IgA class.  
J. Immunol., 96, 578.

BAART DE LA FAILLE-KUYPER, E.H., KATER, L., KUIFTEN, R. H., KOOIKER, C.J., WAGENAAR, S.S., VAN DER ZOUWEN, P. y DORHOUT MEES, E.J. (1976).

Ocurrence of vascular IgA deposite in clinically normal skin of patients with renal disease.

Kidney Int., 9, 424.

BARI, W., TAYLOR, J., y GERMUTH, F. (1970).

The pathogenesis of focal immunecomplex glomerulonephritis (abstract).

Fed. Proc., 29, 236.

BENNICH, H. y JOHANSSON, S.G.O., (1967).

Studies on a new class of immunoglobulins. II. Chemical and physical prperties. Nobel Symp. 3. In Gamma Globulins Structure and Control of biosynthesis, ed. Killander, J.P. 199. Stockolm: Almquvisty y Wiksell.

BENNICH H., JOHANSSON, S.G.O. (1971)

Structure and function of human Immunoglobulin E.

Adv. Immunol. 13, 1.

BERGER, J. (1969)

IgA glomerular deposits in renal disease.

Transplant. Proc., 1, 939.

BERGER, J. (1979)

Glomérulonèphites à dépôts mesangiaux d'IgA.

Nephrologie, 1, 541. Flammarion Medicine Sciences. Paris.

BERGER, J., e HINGLAIS, N. (1968).

Les dépôts intercapillaires d'IgA-IgG.

J. Urol. Nephrol., 74, 694.

BERGER, J., YANEVA, H. y NABARRA, B. (1977)

Lésions glomerulaires des cirrhotiques.

Actualités Nephrologiques de l'Hopital Necker, 165.

Ed. Flammarion Médecine Sciences. París.

BERGER, J., YANEVA, H., NABARRA, B. y BARBANEL, C. (1975)

Recurrence of mesangial deposition of IgA after renal -  
transplantation.

Kidney Int., 7, 232.

BERTHOUX, F.C., GAGNE, A., SABATIER, J.C., DUORET, F., La

PETIT, J.C., MARCELLIN, M., MERCIER, B., BRIZARD, C.P.

(1978).

HLA - Bw35 and mesangial IgA glomerulonephritis.

N. Engl. J. Med., 298, 18.

BRANDTZAEG, P. (1973).

Two types of IgA immunocytes in man.

Nature New Biol., 243, 142.

BRANDTZAEG, P. (1974).

Characteristics of SC-Ig complexes formed in vitro. The  
Immunoglobulin A System.

Adv. Exp. Med. Biol, 45, 87. Editado por A.R. Lawton y J.  
Mestecky: Plenum Press.

BRANDTZAEG, P. (1976a).

Complex formation between secretory component and human immunoglobulines related to their content of Jchain.

Scand. J. Immunol., 5, 411.

BRANDTZAEG, P. (1976b).

Structural, functional and cellular studies of human Jchain.

Ric. Clin. Lab., 6 (Suppl. 3), 15.

BRANDTZAEG, P. (1978).

Molecular basis for the glandular selection of human secretory immunoglobulins.

Prot. of the Biol. fluids, Coll., 25, 827.

Editado por H. Peeters. Pergamon Press. Oxford y New York.

BRANDTZAEG, P., FJELLANGER, I. y GJERULDSSEN, S.T. (1968).

Immunoglobulin M: Local synthesis and selective secretion in patients with immunoglobulin A deficiency.

Science, 160, 789.

BURKHOLDER, P.M. (1977).

Conceptual advances in pathologic diagnosis of renal glomerular diseases.

Becker Seminars in nephrology, p. 7.

Wiley, New York.

CALLARD, P., FELDMANN, G., PRANDI, D., BELAIR, M.F., MANDET, C., WEISS, Y., DRUET, P., BENHAMON, J.P. y BARIETY, J. (1975).

Immune complex type glomerulonephritis in cirrhosis of the liver. Am. J. Pathol. 80, 329.

CLAMAN, H.N. y MERRIT, D. (1966)

Serum immunoglobulins in rheumatoid arthritis

J. Lab. Clin. Med. 67, 850.

CLOUGH, J.D., MIMS, L.H. y STROBER, W. (1971)

Deficient IgA antibody responses to arsanilic acid bovine serum albumin (BSA) in neonatally thymectomised rabbits.

J. Immunol. 106, 1964.

COCHRANE, C.G., y KOFFLER, D. (1973).

Immune complex disease in experimental animals and man.

Adv. Immunol. 16, 185.

Editado por Academic Press, New York y Londres.

CORDONIER, D., VIALTEL, P.L., CHEMAIS, F., GROSLAMBERT, P. BARRAQUET, M.C. y MARTIN, H. (1974).

Augmentation du taux des IgA sériques dans les glomérulonephrités avec dépôts d'IgA dans le méaangium.

Nouv. Presse Med., 35, 2264.

DIXON, F.J., VAZQUEZ, J.J., WEIGLE, W.O. y COCHRANE, C.G. (1958).

The pathogenesis of serum sickness.

Arch. Pathol., 65, 18.

DIXON, F.J. y WILSON, C.B. (1976)

Recent advances in immunology of glomerulonephritis.

Proc. 6th Int. Congr. Nephrol., 60

Editado por Karger-Basel.

DOBRIN, R.S., KNUDSON, F.E. y MICHAEL, A.E. (1974)

The secretory immune system and renal disease.

Clin. Exp. Immunol., 21, 318.

DORRINGTON, K.J. y ROCKEY, J.H. (1968)

Studies on the conformation of purified human and canine

$\gamma$ A-globulines and equine  $\gamma$ T-globulin by optical rotatory dispersion.

J. Biol. Chem., 243, 6511.

DREESMAN, L., SENTERFIT, L. y GERMUTH, F. (1970)

Experimental immune complex disease: antibody level, immune complex size and pattern of glomerular alteration (abstract).

Fed. Proc., 29, 3285.

DRIVSHOLM, A. (1964).

Turnover rate of paraproteins in myelomatosis studies on the turnover rate of serum paraproteins after labelling in vivo, with special reference to repeated turnover rate determinations.

Acta. Med. Scand., 176, 257.

DROZ, D. (1976)

Natural history of primary glomerulonephritis with mesangial deposits of IgA.

Contrib. Nephrol., 2, 150.

EDGINTON; T.S., GLASSOCK, R.J. y DIXON, F.J. (1968)

Autologous immune complex nephritis induced with renal

tubular antigens. I. Identification and isolation of the pathogenetic antigen.

J. Exp. Med., 127, 555.

EISEN, H.N., SIMMS, E.S., y POTTER, M. (1968)

Mouse myeloma proteins with antihapten antibody activity.

The protein produced by plasma cell tumor MOPC-315.

Biochemistry, 7, 4126.

EKINS, R.P. (1974)

Radioimmunoassay and saturation analysis.

Br. Med. Bull., 30, 1.

EKNOYAN, G., GYORKEY, F., DICHOSO, C., MARTINEZ MALDONADO, M., SUKI, W.N., GYORKEY, P., (1972).

Renal morphological and immunological changes associated with acute viral hepatitis.

Kidney Int., 1,413.

ESKELAND, T. (1974)

IgM reassociation in vitro: no influence of J chain in the amount of polymers.

Scand., J. Immunol., 3, 757.

ESKELAND, T., y BRANDTZAEG, P. (1974).

Does J-chain mediate the combination of 19 S IgM and dimeric IgA with secretory component rather than being necessary for their polymerization?

Immunochemistry, 11, 161.

ESKELAND, T. y CHRISTENSEN, T.B. (1975)

IgM molecules with and without J chain in serum and after purification, studied by ultracentrifugation, electrophoresis and electronmicroscopy.

Scand. J. Immunol., 4, 217.

EVANS, D.J., WILLIAMS, D.G., PETERS, D.K., SISSONS, J.G.P., BOULTON-JONES, J.M., OGG, C.S., CAMERON, J.S., y HOFFBRAND, B.I. (1973).

Glomerular deposition of properdin in H $\ddot{a}$ noch-Schonlein syndrome and idiopathic focal nephritis.

Br. Med. J., 3, 326.

FALK, G.A., DISKIND, G.W. y SMITH, J.F. (1970)

Immunoglobulin elevations in the serum of patients with chronic bronchitis and Emphysema.

J. Immunol. 105, 1559.

FEIZI, T. (1968).

Immunoglobulins in chronic liver disease.

Gat. 9, 193.

FELDMANN, M. (1972)

Cell interactions in the immune response in vitro. II. The requirement for macrophages in lymphoid cell collaboration.

J. Exp. Med., 135, 1049.

FIREMAN, P., BOESMAN, M., GITLIN, D. (1965)

Association of skin sensitizing antibody with 7S  $\gamma_2$ -globulins.

J. Allergy, 36, 194.

FUDENBERG, H., PINK, J.R.L., STITES, D.P. y AN-CHUAN WANG.

Immunoglobulins: Structure and evolution. Basic immunogenetics. Cap., 2. Editado por Oxford University Press, - New York.

GAVRILOVA, E.M., EGOROV, A.M. y SHAKHANINA, K.L. (1976)  
Isolation and immunochemical study of monomeric and dimeric forms of human IgA globulins.  
Biokhimiya, 41 (4), 684.

GAVRILOVA, E.M., EGOROV, A.M., PANURINA, R.L. y SHAKHANINA, L.K. (1977).  
Quaternary structure of oligomer forms of human blood serum immunoglobulin A.  
Biokhimiya, 42(1), 129.

GERMUTH, F.G., FLANAGAN, C. y MONTENEGRO, M.R. (1957).  
The relationships between the chemical nature of the antigen, antigen dosage, rate of antibody synthesis and the occurrence of arteritis and glomerulonephritis in experimental hypersensitivity.  
Bull. Johns Hopkins Hosp. 101, 149.

GERMUTH, F.G., RODRIGUEZ, E. (1973)  
Immunopathology of the renal glomerulus immune complex deposit and antibasement membrane disease.  
Boston, Little Brown y Co.

GLUCKMAN, J.C., JACOB, N., BEAUFILS, H., BAUMELOU, A.,  
SALAH, H., GERMAN, A. y LEGRAIN, M. (1978).

Clinical significance of circulating immune complexes de  
tection in chronic glomerulonephritis.

Nephron., 22, 138.

GOTZE, O., MULLER-EBERHARD, H.J. (1971).

The C3-activator system: an alternative pathway of comple  
ment activation.

J. Exp. Med. 134, 90.

GREEN, B.M., DOORMANSHKIN, R.R., y PARKHOUSE, R.M.E. (1971)

Electron microscopy of complexes between IgA (MOPC 315)  
and a bifunctional hapten.

J. Mol. Biol., 56, 203.

GREENBERG, S.B., ROSSEN, R.D., SIX, H.R., BAXTER, B.D.,  
y CONCH, R.B. (1978).

Determination of immunoglobulin A concentrations in human  
nasal secretions with a serum immunoglobulin A standard.

J. Clin. Microbiol., 8(4), 465.

GUTEMBERGER, J., TRYGSTAD, C.W., Stiehm, E.R., OPITZ, J.  
M., THATCHER, L.G., BLOODWORTH, J.M.B., SETZKORN, J. (1970)

Familial thrombocytopenia, elevated serum IgA levels and  
renal disease.

Am. J. Med., 49, 729.

HADZIYANNIS, S., FEIZI, T., SCHENER, P.J., y col.(1969).  
Immunoglobulin-containing cells in the liver.  
Clin. Exp. Immunol. 5, 499.

HAUPTMAN, S.P., TOMASI, T.B. Jr. (1975)  
Mechanism of immunoglobulin A polymerization.  
J. Biol. Chem., 250 (10), 3891.

HEREMANS, J.F. (1959)  
Immunochemical studies on protein pathology. The immunoglobulin concept.  
Clin. Chim. Act., 4, 639.

HEREMANS, J.F. (1960).  
Les globulines sériques du système gamma. Leur nature et leur pathologie.  
Arscia, Brussels y Masson. París.

HEREMANS, J.F. (1974a)  
Immunoglobulin A.  
The Antigens. Vol. 2, 365.  
Editado por Sela. Academic Press. Londres.

HEREMANS, J.F. (1974b)  
The IgA system in connection with local and systemic immunity.

The immunoglobulin A System. Adv. Exp. Med. Biol., 45.  
Editado por J. Mestecky y A.R. Lawton. Plenum Press.

HEREMANS, J.F., HEREMANS, M. Th. y SCHULTZE, H.E. (1959)  
Isolation and description of a few properties of the  
 $\beta_2$ A-globulin of human serum.  
Clin. Chim. Acta., 4, 96.

HEREMANS, J.F. y MASSON, P.L. (1973)  
Specific analysis of immunoglobulins. Techniques and cli  
nical value.  
Clin. Chem. 19, 294.

HEREMANS, J.F., y VAERMAN, J.P. (1962).  
 $\beta_2$ A globulin as a posible carrier of allergic reaginic -  
activity.  
Nature. Lond., 193, 1091.

HIJMANS, W., SCHUIT, H.R.E. y HULSING-HESSELINK E. (1971)  
An immunofluorescence study on intracellular immunoglobu  
lins in human bone marrow cells.  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 177, 290.

HOPF, W., BRANDTZAEG, P., HUITTEROTH, H. y MEYER ZUM BUS-  
CHENFELDE, K.H. (1978).  
In vivo and in vitro binding of IgA to the plasma membrane  
of hepatocytes.  
Scand. J. Immunol., 8, 543.

HUBER, H., FUNDERBER, H.H. (1968).

Receptor sites of human monocytes for IgG.

Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 34, 18.

HUNTER, W.M. y Green Wood, F.C. (1962)

Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.

Nature, Lond., 194, 495.

ISHIZAKA, K. (1970).

Human reaginic antibodies.

Ann. Rev. Med., 21, 181.

ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T. y HORNBROOK, M.M. (1963).

Blocking of Pransnitz-Küstner sensitization with reagin by normal human  $\beta_2A$  globulin.

J. Allergy. 34, 395.

ISHIZAKA, K. y NEWCOMB, R.W. (1970).

Presence of  $\gamma E$  nasal washings and spretum from asthmatic patients.

J. Allergy, 46, 197.

IMMAN, F.P. (1974)

Physical-chemical characteristics of J chains obtained from IgM.

The immunoglobulin A System.

Adv. Exp. Med. Biol., 45, 167.

Editado por J. Mestecky y A.R. Lawton. Plenum Press.

KAARTINEN, M. (1978)

Liver damage in mice and rats causes tenfold increase of blood immunoglobulin A.

Scand. J. Immunol., 7, 519.

KATER, L., JOBSIS, C., BAART DE LA FAILLE-KUYPER, E.H.,  
WAGENAR, S.S., GRYM, R., VOGTEM, A.J.M. (1978).

Occurrence of IgA deposits in clinically normal skin, liver and glomerular mesangium of patients with alcoholic hepatic disease.

Eur. J. Clin. Invest., 109 (Abstract).

KOFFLER, D y PARONETTO, F. (1965).

Immunofluorescent localization of immunoglobulins, complement and fibrinogen in human diseases. II. Acute, subacute, and chronic glomerulonephritis.

J. Clin. Invest., 44, 1665.

KOWNATSKI, E. (1973)

Reassociation of IgM subunits in the presence and absence of J chain.

Immunol. Commun., 2, 105.

KURIJAMA, T. (1973)

Chronic glomerulonephritis induced by prolonged immunization in the rabbit.

Lab. Invest., 28, 224.

LAGRUE, G., HIRBEC, G., FOURNEL, M. e INTRATOR, L. (1974)  
Glomérulonéphrite mésangiale à dépôts d'IgA: étude des im  
munoglobulines sériques.

J. Urol. Nephrol. 80, 25.

LEVO, Y., MARKOWITZ, O. y TRAININ, N. (1975)  
Hydantoin immunosuppression and carcinogenesis.  
Clin. Exp. Immunol., 19, 521.

LEVY, M., BEAUFILS, H., GUBLER, M.C. y HABIB, R. (1973)  
Idiopathic recurrent macroscopic hematuria and mesangial IgA-  
IgG deposits in children (Berger's disease)  
Clin. Nephrol. 2, 63.

LEVY, M., BROYER, M., ARSAN, A., LEVY-BENTOLILA, D., HABIB,  
R. (1976).  
Glomerulonéphrites du purpura rhumatoïde chez l'enfant.  
Histoire naturelle et étude immunopathologique.  
Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker, p. 11.

LEWIS, D.M., LAPP, N.L. y BURRELL, R. (1970)  
Quantitation of secretory immunoglobulin a in chronic pul  
monary disease.  
Amer. Rev. Respir. Dis. 101, 55.

LITMAN, G.W. y GOOD, R.A. (1971)  
Rapid purification of IgA from normal human serum.  
Biochim. Biophys. Acta, 263, 89.

LOWANCE, D.D., MULLINS, J.D. y McPHAUL, J.J. Jr. (1973).  
Immunoglobulin A (IgA) associated glomerulonephritis.  
Kidney Int., 3, 167.

MANCINI, G., CARBONARA, O.A., HEREMANS, J.F. (1965)  
Immunological quantitation of antigens by single radial im  
munodifusion.  
Immunochemistry., 2, 235.

MANIGAND, G., MOREL-MAROGER, L., SIMON, J., DEPARIA, M.  
(1970).  
Lesions renales glomerulaires et cirrhose du foie.  
Rev. Eur. Et. Clin. Biol., 15, 989.

MARCOLONGE, R., CARCASSI, A., FRULLINI, F., BIANCO, G., y  
BRAVI, A. (1967).  
Levels of serum immunoglobulins in patients with rheumatoid  
arthritis.  
Ann. Rheum. Dis., 26, 412.

MASUGI, M. (1933)  
Ueber das Wesen der Spezifischen Veränderungen der Niere  
und der Leber durch das Nephrotoxin bzw das Hepatotoxin.  
Beitr. Path. Anat., 91, 82.

MASUGI, M. (1934)  
Ueber die experimentelle Glomerulonephritis durch das spe  
zifische Antinierenserum.  
Beitr. Path. Anat., 92, 429.

MAUER, S.M., FISH, A.J., BLAU, E.B., MICHAEL, A.F. (1971)  
The glomerular mesangium. I. Kinetic studies of macromolecular  
uptake in normal and nephrotic rats.  
J. Clin. Invest., 51, 1092.

MAUER, S.M., FISH, A.J., DAY, N.K., MICHAEL, A.F. (1974)  
The glomerular mesangium. II. Studies of macromolecular up  
take in nephrotoxic nephritis rats.  
J. Clin. Invest., 53, 431.

MAUER, S.M., SUTHERLAND, D.E.R., HOWARD, R.J., FISH, A.J.,  
NAJARIAM, J.S. y MICHAEL, A.F. (1973).  
The glomerular mesangium. III. Acute immune mesangial inju  
ry: A new model of glomerulonephritis.  
J. Exp. Med., 137, 553.

McCOY, R.C., ABRAMOSWY, C.R. y TISHER, C.c. (1974)  
IgA nephropathy.  
Am. J. Pathol., 76, 123.

METZGER, H. (1970)  
Structure and function of macroglobulins.  
Adv. Immunol., 12, 57.

MIDGLEY, A.R. (1967).  
Radioimmunoassay for human follicle-Stimulating hormone.  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 27, 295.

MUNN, E.A., FEINSTEIN, A. y MUNRO, A.J. (1971)

Electron microscope examination of free IgA molecules and of their complexes with antigen.

Nature (London), 231, 527.

NEWCOMB, R.W. e ISHIZAKA, K. (1967)

Human diphtheria antitoxin in immunoglobulin classes IgG and IgA.

J. Immunol., 90, 40.

NOEL, L.H., DESCAPMS, B., JUNGERS, P., BACH, J.I., BUSSON, M., SUET, C., HORS, J. y DAUSSET, J. (1978).

HLA antigen in three types of glomerulonephritis.

Clin. Immunol. Immunopathol., 10, 19.

OGRA, P.L., COPPOLA, P.R., MAC GILLIVRAY, M.H. y DZIERBA, J.L. (1974)

Mechanism of mucosal immunity to viral infections in  $\gamma$ A immunoglobulin-deficiency syndromes.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 145, 811.

ORLANS, E., PEPPARD, J., REYNOLDS, J y HALL, J. (1978).

Rapid active transport of immunoglobulin A from blood to le.

J. Exp. Med., 147, 588.

OUCHTERLONY, O. (1948)

In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria.

Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 25, 186.

PARKHOUSE, R.M.E. y DELLA CORTE, E.D. (1973)

Biosynthesis of immunoglobulin A (IgA) and immunoglobulin M (IgM): control of polymerization by J chain.

Biochem. J. 136, 607.

PARKHOUSE, R.M.E. y DELLA CORTE, E.D. (1974)

Assembly and secretion of immunoglobulin A. The Immunoglobulin A system.

Adv. Exp. Med. Biol., 45, 139.

Editado por J. Mestecky y A.R. Lawton, Plenum Press.

PERELMUTTER, L., GOODFRIEND, L. (1967)

Fractionation on DEAE-Sephadex of normal and a-myeloma human sera. I. Electrophoretic heterogeneity of gamma-a globulins.

Can. J. Biochem. 45, 203.

PEREZ GARCIA, R., EGIDO DE LOS RIOS, J., BARAT CASCANTE, A., OLIVA ALDAMIZ, H., HERNANDO AVENDAÑO, L. (1977).

Evolución de la glomerulonefritis con depósitos mesangiales de IgA. Estudio de 45 casos.

X Reunión Nacional Sociedad Española de Nefrología. Resúmenes, p. 76.

PETERSON, E.A. y SOBER, H.A. (1962).

Column chromatography of proteins: Substituted cellulose.

Methods Enzimol. V, 3.

QUABBE, H.J. (1969)

MODifikation der radio immunologischen Insulinbestimmung nach Hales und Randle.

Diabetologia, 5, 101.

RAAM, SH.V., e INMAN, F.P. (1973).

The presence of J chains in the intracellular fluid of IgM secreting murine tumor cells.

J. Immunol., 110, 1044.

RADL, J., SCHUIT, H.R.E., MESTECKY, J. y HIJMANS, W. (1974).

The origin of monomeric and polymeric forms of IgA in man. The immunoglobulin A system.

Adv. Exp. Med. Biol., 45, 57.

Editado por Mestecky, J y Lawton, A.R., Plenum Press.

REISFELD, R.A. y SMALL, P.A.J. (1966)

Electrophoretic heterogeneity of polypeptide chains of specific antibodies.

Science., 152, 1253.

RICHET, G., ADAM, C. y MOREL-MAROGER, L. (1974).

Cryoglobulinemie des glomérulonéphrites en dehors des affections generales.

Actualités Nephrologiques, 3, 119.

Editado por Flammarion Médecine-Sciences. París.

SABATIER, J.C., DUCRET, F., COLON, S., GENIN, C., BERTHOUX, F.C. (1978).

Glomerulonephrite intercapillaire à dépôt d'IgA chez deux frères HLA identiques.

J. Urol. Nephrol. 84, 672.

SADE, J., ELIEZER, M., SILBERBERG, A., y NEVO, A.C. (1970)

The role of mucus in transport by cilia.

Am. Rev. Respir. Dis., 102, 48.

SAKAI, H., y NAMOTO, Y. (1978)

Increase of IgA bearing Lymphocytes in patients with IgA nephropathy. Abstract VIIth International Congress of Nephrology. Montreal G-2. Editado por S. Karger.

SANCHO LOPEZ, J. (1979)

Estudio de los polimorfonucleares y de los mecanismos de depósito de la IgA en las glomerulonefritis mesangiales de IgA.

Tesina. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense. Madrid.

SAVILAHTI, (1972)

Immunoglobulin-containing cells in the intestinal mucosa and immunoglobulins in the intestinal juice in children. Clin. Exp. Immunol. 11, 415.

SCHERIDEGGER, J.J. (1955)

Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. Int. Arch. Allergy., 7, 103.

SCHICK, B. (1907)

Nachkrankheiten des Scharlach.

Ib. Kinderheilk., 65, 132.

SCHOENFELD, Y., PICK, A.I., DANZINGER, Y., KALACZI, I.,  
FROLICHMAN, R. y PINKNAS, J. (1978).

Immunoglobulins changes in SLE.

Ann. Allergy, 39, 99.

SCHUIJZE, H.E., y HEREMANS, J.F. (1966).

Molecular Biology of human proteins.

Vbl. I., 222. Amsterdam. Elsevier.

SCHUMACHER, K., WEHMER, U., KOCH, W., SCHREIDER, W., LOO,  
J., y GROSS, R. (1972).

Protein pattern of the toracic duct lymph in normal subjects  
and in patients with liver cirrhosis.

Klin. Wochenschr., 50, 86.

SEEGAL, B.C., ANDRES, G.A., HSU, K.C., y ZABRISKIE, J.B.  
(1965).

Studies on the pathogenesis of acute and progressive glomerulonephritis in man by immunofluorescein and immunoferritin techniques.

Fed. Proc., 24, 100.

SEAGER, J., COOVADIA, H.M., y SOOTHILL, J.F. (1978).

Reduced immunoglobulin concentration and impaired macrophage function in mice due to diphenylhydantoin.

Clin. Exp. Immunol., 33, 437.

SEAGER, J., JAMISON, D.L., WILSON, J., HAYWARD, A. R. y  
SOOTHILL, J.F. (1975).

IgA deficiency, epilepsy, and phenitoin treatment.  
Lancet, II, 632.

SELIGMAN, M., DANON, F., HUREZ, D., MIHAESCO, E., y PREUD  
HOMME, J.L. (1968).

Alpha chain disease: a new immunoglobulin abnormality.  
Science (Wash.) 162, 1396.

SISSONS, J.G.P., WOODROW, D.F., CURTIS, J.R., EVANS, D.J.  
GOWER, P.E., SLOPER, J.C., PETERS, D.K. (1975).

Isolated glomerulonephritis with mesangial IgA deposits.  
Br. Med. J., 3, 611.

SLATER, R.J., WARD, S.M., KUNKEL, H.G. (1955)

Immunological relationships among the myeloma proteins.  
J. Exp. Med., 101, 85.

SORRELL, T.C., y FORBES, I.J. (1975)

Depression of immune competence by phenytoin and carbama-  
zepine. Studies in vivo and in vitro.

Clin. Exp. Immunol., 20, 273.

STANWORTH, D.R., y TURNER, M.W. (1978).

Immunochemical analysis of immunoglobulins and their sub-  
units.

Handbook of experimental Immunology, Cap. 6.

Editado por Blackwell Scientific Publications.

STIEHM, E.R., y FUDENBERG, H.H. (1966)

Serum levels of immunoglobulins in health and disease.  
Asurvey. Pediatrics., 37, 715.

TERR, A.I. y BENTZ, I.D. (1964)

Gel filtration of human skin-sensitizing antibody and  $\beta_2$ A-globulin.

J. Allergy. 35, 206.

TERRY, W.D., ASHMAN, R.F., y METZGER, H. (1970).

Human IgA-myeloma protein which binds nitrophenyl ligands.  
Immunochemistry, 7, 257.

THOMPSON, R.A., ASQUITH, P. y COOKE, W.T. (1969).

Secretory IgA in the serum.  
Lancet, 2, 517.

TOH, B.H., CEREDIG, R., CORNELL, F.N., CLARKE, F.M. (1977)

Multiple myeloma and monoclonal IgA with anti-actin reactivity.

Clin. Exp. Immunol., 30, 379.

TOMASI, T.B., y CZERWINSKI, D.S. (1976).

Naturally occurring polymers of IgA lacking J chain.  
Scand. J. Immunol., 5, 647.

TOMASI, T.B., y GREY, H.M. (1972).

Structure and function of immunoglobulin A.  
Prog. Allergy, 16, 81.

TOMASI, T.B., y TISDALE, W.A. (1964)

Serum Gamma-globulins in acute and chronic liver diseases.  
Nature. London., 201, 843.

TOMASI, T.B. y ZIGELBAUM, S. (1963)

The selective occurrence of  $\gamma_1A$  globulins in certain body fluids.

J. Clin. Invest., 42, 1552.

TRESER, G., SEMAR, M., SAGEL, T.A., FRANKLIN, M.A., y LANGE, K. (1970).

Partial characterization of antigenic streptococcal plasma membrane components in acute glomerulonephritis.

J. Clin. Invest., 49, 762.

TUNG, K.S.K., WOODROFFE, A.J., AHLIN, T.D., WILLIAMS, R.C., Jr. y Wilson, C.B. (1978).

Application of the solid phase Clq and Raji Cell radioimmune Assays for the detection of circulating immune complexes in glomerulonephritis.

J. Clin. Invest., 62(1), 61.

UFF, J.S., y EVANS, D.J. (1978).

In vitro fixation of complement by renal biopsies.

Abstract VIIth International Congress of Nephrology. Montreal G-2. Editado por S. Karger.

UNANUE, E.R. y DIXON, F.J. (1964).

Experimental glomerulonephritis IV. Participation of complement in nephrotoxic nephritis.

J. Exp. Med., 119, 965.

UNDERDOWN, B.J., DE ROSE, J., KOCZEKAN, K., SOCKEN, D., y WEICKER, J. (1977).

Isolation of human secretory component by affinity chromatography on IgM-Sepharose.

Immunochemistry, 14, 111.

VAERMAN, J.P. (1973)

Comparative immunochemistry of IgA.

Res. Immunochem. Immunobiol., 3, 91.

Editado por Kwapinski, J.B. University Park Press.

VAERMAN, J.P., LEMAITRE-COELHO, I. y JACKSON, D.F. (1978)

Role of liver in the rat intestinal S-IgA system.

Adv. Exp. Biol. Med., 107, 233.

VERNIER, R., MAUER, S., FISH, A., MICHAEL, A.F. (1971).

The mesangial cell in glomerulonephritis.

Adv. in Nephrol., 31.

Editado por Hamburger, J., Crosnier, J. y Maxwell, M.H.

Chicago, Year Book Pub. Inc.

DEVERRA, P., MOREL-MAROGER, L., LEROUX-ROBERT, C., y RICHEL, G. (1973).

Glomérulites à dépôts d'IgA diffus dans le mésangium.

Schweiz. Med. Wschenschr., 103, 797.

WADSWORTH, C. (1976).

Estimation of aggregates of IgG and their effect on quantitation of IgG: A comparison of four quantitating methods.

Scand. J. Immunol., 5, 97.

WAGER, O., MUSTAKALLIO, K., y ROSANEN, J.A. (1968).

Mixed IgA-IgG cryoglobulinemia.

Am. J. Med., 44, 179.

WALDMAN, R.H., BENCIC, Z., SAKAZAKI, R., SINHA, R., GANGU  
LY, R., DEB, B.C. y MUKERJEE, S. (1971).

Cholera Immunology I. Immunoglobulin levels in serum, fluid  
from the small intestine, and feces from patients with ill-  
ness and convalescence.

J. Infect. Dis., 123, 579.

WALDMANN, T.A. y STROBER, W. (1969)

Metabolism of immunoglobulins.

Prog. Allergy., 13, 1.

WEBER, K., OSBORN, M. (1975).

Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight deter-  
mination on polyacrilamide gels and related Procedures.

The proteins, Cap. 3, 179.

Editado por Academic Press.

WHITHWORTH, J.A., LEIBOWITZ, S., KENNEDY, M.C., CAMERON,  
J.S., y CHANTLER, C. (1976).

IgA and glomerular disease.

Clin. Nephrol., 5, 33.

WRIGHT, R. (1977).

Immunology gastrointestinal and liver disease, 8.

Current topics in immunobiology series.

Editado por Arnolds.

YADITA, H. y KATZ, S.I. (1977)

Circulating IgA anti-basement membrane zone antibodies in dermatitis herpetiformis.

J. Invest. Dermatol., 69, 558.

ZIMMERMAN, S.W., y BURKHOLDER, P.M. (1975)

Immunoglobulin A nephropathy.

Arch. Intern. Med., 135, 1217.