

4
2004



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES - CUAUTITLAN

**OBTENCION DE ANTICUERPOS CONTRA
FACTOR B HUMANO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

HILDA AVENDAÑO MUNGUIA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pag.
Resumen.....	2
Introducción.....	3
Propiedades generales.....	9
Polimorfismo del Factor B	13
El Factor B en otras especies	15
Síntesis del Factor B	16
Relación del Factor B con el HLA	18
Importancia Clínica	21
Material y Métodos	23
Método para la Purificación del Factor B	26
Resultados	48
Discusión	54
Conclusiones	57
Glosario	58
Bibliografía	60

RESUMEN

En el presente trabajo se plantea la purificación de una protefna humana, denominada Factor B.

Se trabajaron tres litros de suero humano, donado por el banco de sangre del Hospital de Urgencias Respiratorias, el cual provenfa de individuos sanos.

El trabajo experimental consistió en una precipita---ción con una solución de rivanol; se continuó trabajando _ el sobrenadante, al que se le practicó una segunda precipi---tación con una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Posteriormente se realizaron cromatograffas en DEAE-celulosa, eluidas con gradiente continuo. Las fracciones en las que se localizó el Factor B fueron pasadas en una columna de afinidad preparada con Sepharosa 4-B y anticuerpos especffi---cos contra Factor B humano.

La localización de la protefna en cuestión, en las -- fracciones de las cromatograffas, se llevó a cabo mediante inmunodifusión radial y la pureza de la muestra se probó _ con inmunoelectroforesis con antiprotefnas totales.

Finalmente se inocularon conejos para óbtener anti---cuerpos especfficos contra Factor B.

Debido a la relación que se ha encontrado entre algunos alelos del Factor B y la aparición de diabetes mellitus, este trabajo podría servir en futuras investigaciones para el diagnóstico precoz de diabetes y como consecuencia la aplicación de un tratamiento preventivo.

INTRODUCCION

El Factor B (Bf), también conocido como glicoproteína beta rica en glicina (GBG) (14), C₃ proactivador (C₃PA) -- (24) y β₂-glicoproteína II (17), es una proteína que se encuentra normalmente en el suero humano y en el de la mayoría de los vertebrados (37).

La función del Bf es la de participar en la vía alterna del complemento, también denominada sistema de la properdina por Pillemer en 1954 (34), junto con otras proteínas, conocidas como proteína D, C₃ y properdina. Esta vía alterna de complemento evita la activación de los componentes C₁, C₄ y C₂ de la vía clásica, pero no la de C₃, C₅-C₉ (3).

El inicio de la activación de la vía alterna ocurre cuando en el plasma fresco la properdina (P) es activada para formar la enzima P activa. Entre las sustancias activantes se encuentran: zymozan, inulina, dextran, lipopolisacáridos, agar, agregados de IgG, IgA, IgE y anticuerpos IgG₁ de cobayo (17). Estas sustancias activantes actúan sobre la properdina para activarla; a su vez, esta properdina activa tiene la capacidad de actuar sobre el Factor D,

el cual requiere de la presencia de C_3b (25), antiguamente conocido como Factor A (17)(3)(23), y de Mg^{2+} para activar al Factor B (25), que es dividido en dos fragmentos: Ba o GAG (glicoprotefna alfa rica en glicina) con un peso --- aproximado de 34000 D, y Bb o GGG (glicoprotefna gama rica en glicina) con peso aproximado de 72000 D (3)(32). En -- este último fragmento está localizada la función de activa_ ción del C_3 (30).

El factor iniciante, el factor D y Bb interactúan de_ una manera similar a aquella de los tres primeros componen_ tes de la vfa clásica y tienen la función de una C_3 conver_ tasa (42).

Posteriormente el C_3 es dividido en dos fragmentos, _ C_{3a} y C_{3b} ; el fragmento C_{3b} forma un complejo trimolecular con B y D activados (42), el cual, estabilizado por la _ properdina (19), funciona como una C_5 convertasa para la _ activación del C_5 y los restantes componentes C_6-C_9 , para_ terminar en la lfsis celular (42).

Esta vfa alterna de activación posee un mecanismo de_ retroalimentación, en el cual un complejo bimolecular BbD_ en la membrana celular provoca la fragmentación de C_3 en _

C_3a y C_3b , por lo que se hace indispensable un mecanismo de regulación (42), en el que participa el C_3b INA, conocido también como KAF (Factor Activante del Conglutinógeno) (1), y su función es la de interrumpir la retroalimentación dividiendo al C_3b en dos fragmentos denominados C_3c y C_3d (42); cuando la activación por el complejo BbD se lleva a cabo en la fase flufna, se requiere de otra proteína de control llamada B_1H que está presente normalmente en el suero, y compete con el C_3b por la superficie celular (42); con esto se aumenta el tiempo de inactivación del C_3b por el C_3b INA y además se provoca una desestabilización del complejo trimolecular BbDC₃b (9). Este mecanismo de regulación es importante, ya que si no ocurriera, el C_3 actuaría como un amplificador permanente de la vía alterna con el consumo constante de C_5 - C_9 , lo que resultaría perjudicial para el organismo (42).

Un aspecto importante de la vía alterna es que también puede ser activada por un factor de veneno de cobra (CVF), el cual actúa en forma parecida al C_3b formando un complejo bimolecular CVF-Bf que tiene la propiedad de una C_3 convertasa y además de ser más estable que C_3b -Bb no es inactivado por KAF (25). Así mismo, la plasmina puede actuar directamente sobre el Bf (17).

En la Figura 1 se muestran los mecanismos de activación del complemento por las dos vías, clásica y alterna, así como la actividad biológica de los productos originados.

La activación alterna del complemento juega un papel importante en diversas propiedades del suero, incluyendo: muerte de ciertas bacterias gram negativas, neutralización de ciertos virus y lisis de eritrocitos de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna (22).

Otra característica importante es que la vfa alterna, al actuar independientemente de la respuesta inmune humoral, en comparación con la vfa clásica, es más rápida su acción.

PROPIEDADES GENERALES

El Factor B (GBG) ha sido aislado y caracterizado como una glicoproteína de movilidad beta rica en glicina (17), con un contenido total de carbohidratos de 10.6%; el análisis de los azúcares respectivos, así como la composición de aminoácidos se encuentran en las tablas I y II respectivamente (14).

Se encuentra en el suero normal humano en una concentración de 100-200 $\mu\text{g/ml}$; tiene una constante de sedimentación de 6.2 S y un peso molecular de 80000 D (17).

Esta proteína se desnaturaliza a 50°C en 30 minutos. En el suero incubado con tripsina o *Staphylococcus aureus* o a 37°C en reposo, el Factor B se fragmenta (5), dando origen a una glicoproteína de movilidad gama llamada glicoproteína gama rica en glicina (GGG) la cual es 4.3 S y una glicoproteína con movilidad alfa llamada glicoproteína alfa rica en glicina (GAG) de similar tamaño (5). Estudios recientes de la secuencia de aminoácidos del Factor B han demostrado que el fragmento GAG procede de la fracción amino y que el fragmento GGG se deriva del carboxilo terminal (33). El fragmento GAG tiene características ácidas y no participa en la reacción de activación

del complemento, mientras que en el fragmento más básico, GGG, está localizada la función de activación del C₃ (30).

Los determinantes antigénicos de los dos fragmentos parecen ser distintos ya que el anti-GGG produce reacción de identidad entre el GBG y GGG, pero no reacciona con el GAG. Por otro lado, el anti GBG produce reacciones con el GBG y con los dos fragmentos (4)(14).

T A B L A I

Contenido de Carbohidratos del Bf
(14)

Hexosas	5.4%
Acetilhexosamina	4.2%
Acido N-acetilneuraminico	0.9%
Fucosa	0.1%
Galactosa/manosa	1:1

T A B L A II

Composición de Aminoácidos del Bf (14)			
AMINOACIDO	%	AMINOACIDO	%
Lisina	7.40	Histidina	2.48
Arginina	5.40	Ac. aspáritico	10.82
Treonina	5.33	Serina	6.17
Ac. glutámico	11.53	Prolina	5.91
Glicina	8.35	Alanina	5.14
Cistina	2.48	Valina	7.69
Metionina	1.23	Isoleucina	4.73
Leucina	7.06	Tirosina	4.31
Triptofano	1.31	Fenilalanina	2.66

POLIMORFISMO DEL FACTOR B

El polimorfismo del Bf fue inicialmente estudiado y descrito por Alper en 1972 (4).

Esta proteína ha demostrado ser altamente polimórfica cuando se le prueba en inmunofijación a pH 8.6 y aún en sueros de individuos homocigóticos se detectan cuando menos cinco bandas (4). Dicho polimorfismo es determinado por dos genes comunes BfF (rápido) y BfS (lento) y dos genes raros BfF₁ y BfS₁ (37). Las frecuencias genéticas en diferentes razas se muestran en la tabla III (4)(37).

Debido a la presencia de los cuatro alelos han sido observados siete fenotipos: SS, FS, FF, F₁F, F₁S, FS₁ y SS₁ (4). Se ha sugerido que las variantes comunes BfF y BfS residen en el fragmento GAG y las variantes raras BfF₁ y BfS₁ están localizadas en el fragmento GGG (4).

T A B L A III

Frecuencias genéticas del Bf en diferentes razas (4)(37)				
RAZA	BfF	BfS	BfF ₁	BfS ₁
Negros	0.50	0.44	0.06	-
Caucásicos	0.28	0.71	-	0.01
Orientales	0.13	0.87	-	-

EL FACTOR B EN OTRAS ESPECIES

En distintos vertebrados ha sido demostrada la presencia del complejo polimolecular que constituye el complemento, aunque con distinta actividad según la especie animal.

El Factor B ha sido observado en muchas especies de vertebrados y ha sido estudiado en ellas, encontrándose polimorfismo en las siguientes:

Mono Rhesus	(46)
Cobayo	(13)
Ratón	(40)
Chimpance	(37)

SINTESIS DEL FACTOR B

El mecanismo de síntesis en el organismo del Bf ha sido estudiado por algunos investigadores, entre los que se encuentra Alper, quien sostiene la hipótesis de que el hígado es el principal sitio de síntesis del Bf. En sus estudios se realizaron trasplantes hepáticos, determinándose los alotipos de los donadores y receptores antes y después del trasplante; el resultado ha sido un cambio al tipo del donador sin que se vuelvan a encontrar rastros del alotipo original en los días posteriores al trasplante (6). Esta hipótesis también es sostenida por Hauptmann, quien ha realizado estudios de trasplante de hígado en humanos, llegando a la misma conclusión (27).

También se ha encontrado que los macrófagos peritoneales de cobayos son capaces de sintetizar el Bf (15).

Halbwachs y Lachmann han encontrado que las células provenientes del Linfoma de Burkitt, tienen la capacidad de sintetizar Bf, sin embargo no han podido encontrar si el Bf está normalmente presente en la superficie de los linfocitos o si es secretado por ellos. Proponen la hipótesis de que el Bf está presente en la superficie celular en una forma no accesible a los anticuerpos y que los si--

tios que reaccionan con el veneno de cobra están expuestos, encontrándose el resto de la molécula dentro de la membrana celular (25).

En otro estudio realizado en mujeres parturientas, se demostró que el Bf no tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria, ya que los tipos Bf para la madre e hijo fueron diferentes en la mayoría de los casos, sin encontrarse mezclas de ellos. Además se demostró que en la fase fetal hay síntesis de Bf, encontrándose una concentración muy baja en el cordón umbilical en comparación con la concentración de la madre (4)(43).

RELACION DEL FACTOR B CON EL HLA

El rechazo que se presentaba en muchos organismos, aún de la misma especie, con algún tipo de injerto, representó por mucho tiempo una barrera para la práctica del trasplante de tejidos; sin embargo, después se descubrió que ese rechazo no era debido a deficiencias en las técnicas quirúrgicas, sino a unas moléculas denominadas Antígenos de Histocompatibilidad o de Transplante, que proporcionan a los tejidos de cada organismo su propia identidad química (20).

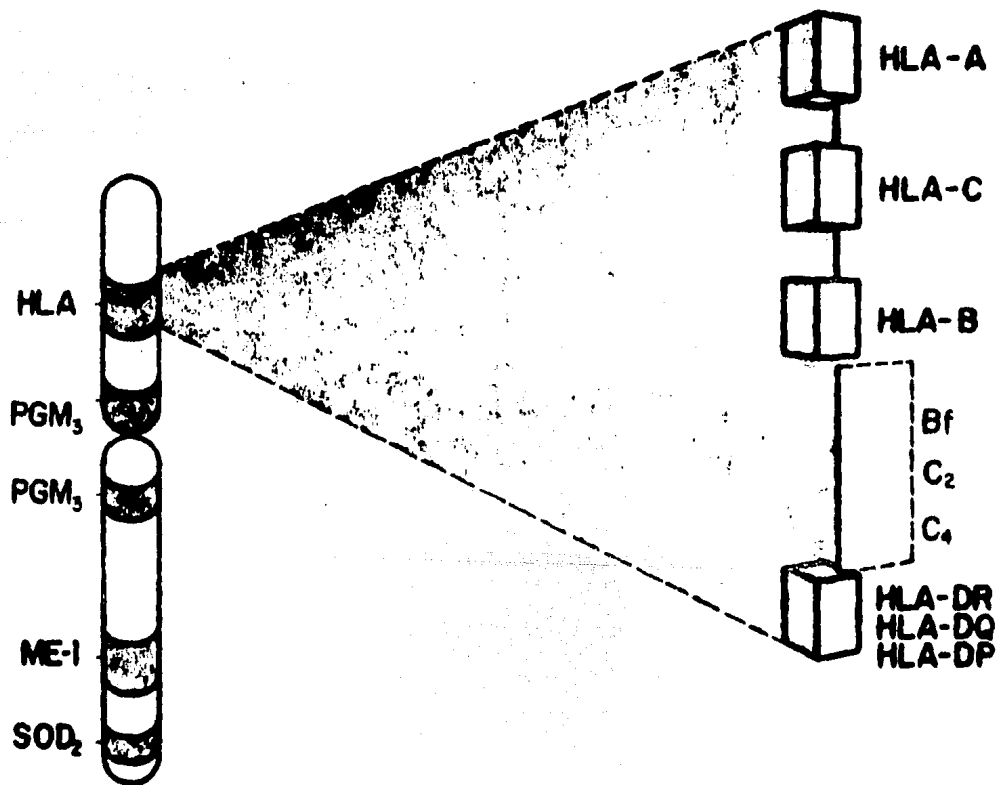
Actualmente se sabe que esas moléculas de transplante se encuentran en la superficie de la mayoría de las células que forman los tejidos, y en el humano son codificadas en un segmento del brazo corto del cromosoma seis (42). Dicho segmento es conocido como HLA (Primer Sistema Leucocitario Humano) (20), y consiste de una serie de genes fuertemente ligados.

Una serie similar de genes han sido identificados en varias especies de mamíferos como el ratón (H_2), perro (DLA), mono (RhLA), etc. (20).

El sistema HLA es importante para la regulación de muchos aspectos de la respuesta inmune, entre los que se encuentra la biosíntesis de algunos componentes del complemento.

Los componentes del complemento que se codifican dentro del sistema HLA son el Bf, C₂ y C₄. El descubrimiento de que el Bf se encontraba ligado al HLA fue realizado por Allen en 1974 (2). La localización del gen para Bf dentro del complejo HLA fue motivo de gran controversia, ya que algunos autores aseguraban que el orden era HLA-B,D (Bf,C₂) (38). Sin embargo, actualmente se sabe que dicho gen se localiza entre la región HLA-B y HLA-D (7)(26).

La representación esquemática del complejo HLA en el cromosoma 6, así como la localización del Bf dentro del mismo se muestra en la Figura 2.



CROMOSOMA SEIS HUMANO

FIG. 2 : LOCALIZACION DEL Bf EN EL HLA. (7)(100)

IMPORTANCIA CLINICA

El descubrimiento del sistema HLA y su importancia en el trasplante de tejidos atrajo la atención de muchos investigadores, quienes tuvieron la inquietud de saber si dicho sistema podría estar relacionado en algunos casos con la aparición de padecimientos orgánicos. A través de numerosos estudios se llegó a la conclusión de que efectivamente dicho sistema tiene un marcado efecto en la susceptibilidad de una variedad de enfermedades debido a una asociación inusual de alelos, denominado desequilibrio de enlace.

Actualmente se sabe que los componentes del complemento que se codifican dentro del HLA (Bf, C₂ y C₄) pueden caer en desequilibrio de enlace con genes vecinos a ellos; esto se refiere al fenómeno de encontrar dos genes particularmente asociados más allá de la probabilidad, por lo que muchas veces conducen a la aparición de enfermedades.

El Bf se ha estudiado en pacientes con Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente (DMID), encontrándose asociación en blancos entre el BfS y el HLA-B8, así como entre éste último y la DMID (10)(31). Así mismo, recientemente se ha encontrado una fuerte relación entre el BfF₁ y dicha enfer

medad (11)(38), así como una incrementada asociación entre el BfF₁ y el HLA-B18 en niños blancos (12)(36)(44). En Francia, Alemania y Australia, la DMID está más fuertemente asociada con el alelo B18 que con el B8 (41).

Kirk y colaboradores aseguran que la relación de la DMID con el BfF₁ depende mucho de la edad ya que las frecuencias encontradas entre niños y adultos varían significativamente (11)(29).

Stewart y Cann encontraron que en las poblaciones caucásicas, el BfS₁ está predominantemente asociado con el Bw50 y que el BfF₁ ocurre con mayor frecuencia con el haplotipo Aw30, B18, causando diabetes mellitus en ambos casos (41).

En otros estudios realizados en Islanda, se demostró que el HLA-B27 está asociado fuertemente con el alelo BfS₁ en pacientes con espondilitis anquilosante (8); mientras que en las investigaciones en Italia e Inglaterra no se encuentra relación entre el B27 con algún alelo Bf (45).

Con todos los datos anteriores es fácil entender la importancia de la genética de poblaciones ya que los resultados que se obtengan en todo estudio, dependerá en gran parte del origen étnico de la población que se estudie .

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico

Tres litros de suero humano proveniente de donadores sanos
(Banco de Sangre del Hospital de Urgencias Respirato-
rias de la SSA.)

Albúmina humana pura

Conejo Nueva Zelanda de 3 meses

Suero anti-Bf humano (Atlantic Antibody)

Suero anti-Tf humana (Unidad de Transplante del C. H. "20_
de Noviembre", ISSSTE)

Suero de conejo anti-protefnas totales humanas

Suero normal humano estandar, a una concentración de ___
7g/100 ml

Transferrina humana pura (Unidad de Transplante del C. H. _
"20 de Noviembre", ISSSTE)

Equipo

Agitador magnético

Bomba para vacfo

Cámara húmeda

Cámara para Inmunolectroforesis

Centrffuga J-21 C Beckman

Colector de fracciones LKB Ultrarrac 2000

Columna para cromatografía

Espectrofotómetro Spectronic, Bausck Lomb

Fuente de poder

Jeringa Hamilton (Hamilton Co)

Liofilizadora Labconco

Medidor de pH

Perforador para inmunolectroforesis LKB

Pipeta automática de 100 μ l

Placa para inmunodifusión radial anti-Bf

Placas para inmunolectroforesis

Refrigerador a 4°C

Rotor Beckman JA-14

Soportes y molde para doble difusión micro

Tubo para diálisis

Reactivos

Acido clorhídrico 0.001 M

Acido clorhídrico 1 M

Solución de ácido clorhídrico-glicina 0.2 M, pH 2.2 y 2.8

Agarosa

Solución de acetatos 0.1 M conteniendo cloruro de sodio 1 M

pH 4.0

Solución amortiguadora de barbituratos pH 8.6-9.0, fuerza iónica 0.075 (Lab. Helena)

Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.005 M, pH 7.5

Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.005 M conteniendo cloruro de sodio 0.11 M, pH 7.5

Azida de sodio (Sigma)

Solución de azul de Coomassie G-250 para cuantificar proteínas (Sigma Ch. Co.): 50 ml de etanol, 100 ml de ácido fosfórico, 0.1g de azul de Coomassie. Aforar a 1 lt con agua destilada; filtrar dos veces la solución)

Solución de boratos 0.1 M conteniendo cloruro de sodio 1 M, pH 8.0

Solución de carbonato ácido de sodio 0.1 M conteniendo cloruro de sodio 0.5 M

Cloruro de sodio sólido

Dietil aminoetil celulosa: DEAE-celulosa (Sigma Ch. Co.)

Glicina 1 M, pH 8.0

Hidróxido de sodio 1 M

Solución reguladora de fosfatos (PBS) 0.1 M, pH 7.2

Solución de rivanol al 1.68 g/100 ml

Sepharosa 4-B (Pharmacia Fine Chemicals)

Solución de sulfato de amonio saturada

METODO PARA LA PURIFICACION DEL FACTOR B

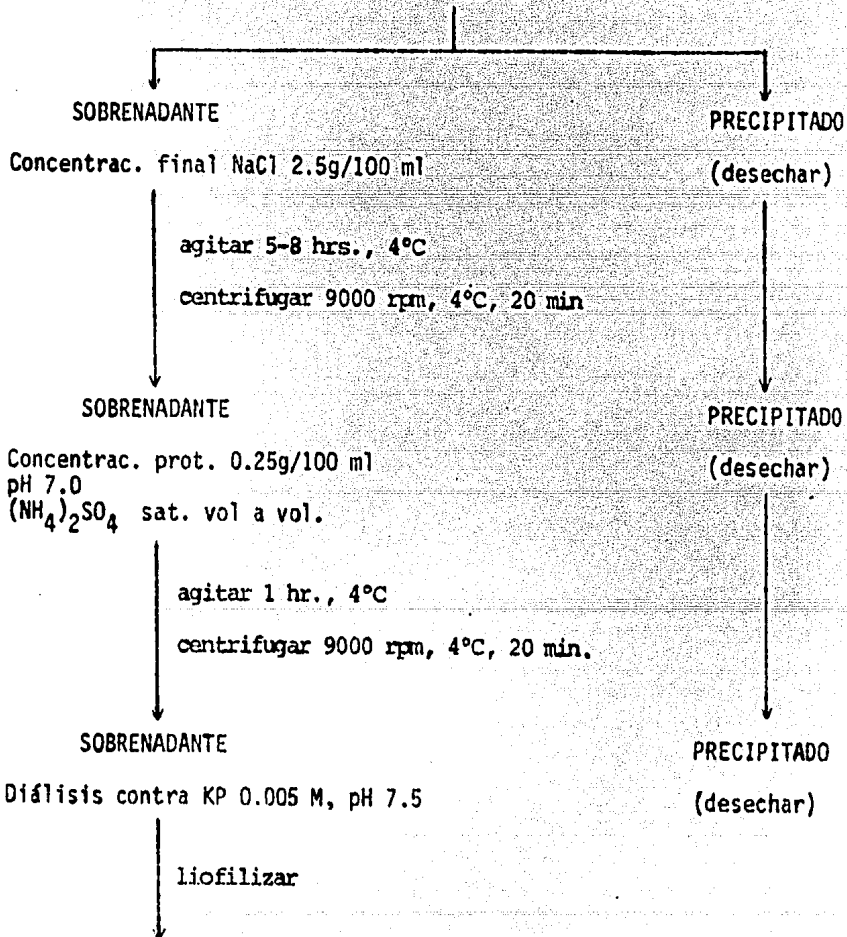
- Ajustar tres litros de suero humano a pH 8.0 con una solución de NaOH 1 N
- Diluir la muestra hasta una concentración de protefna de 6 g/100 ml; llevar a cabo la cuantificación de protefna por el método de azul de Coomassie (Técnica I)
- Añadir tres litros de rivanol (lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina) al 1.68% (Técnica II)
- Agitar 1 hr a temperatura ambiente y 12 hrs. a 4°C
- Centrifugar a 4°C, 20 min., 9000 rpm.
- Llevar el sobrenadante a una concentración final de 2.5g/100 ml de NaCl y agitar 5-8 hrs. a 4°C
- Centrifugar a 4°C, 20 min., 9000 rpm.
- Ajustar las protefnas del sobrenadante a una concentración de 0.25g/100 ml y pH 7.0
- Añadir una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ volumen a volumen y agitar 1 hr. a 4°C

- Centrifugar a 4°C, 20 min., 9000 rpm.
- Dializar exhaustivamente el sobrenadante contra una solución amortiguadora de fosfatos 0.005 M, pH 7.5
- Liofilizar
- Disolver la proteína en el mínimo volumen de amortiguador de fosfatos 0.005 M, pH 7.5 y colocar una alícuota en la columna de DEAE-celulosa de acuerdo a la capacidad de la columna. Eluir con gradiente continuo con un amortiguador inicial de KP 0.005 M, pH 7.5 y uno final de KP 0.005 M, NaCl 0.11 M, pH 7.5 (Técnica III)
- Probar las fracciones obtenidas con inmunodifusión radial (Técnica IV) e identificar los contaminantes presentes por inmunoelectroforesis con antiproteínas totales (Técnica V)
- Dializar con una solución reguladora de fosfatos (PBS)
- Realizar cromatografías de afinidad en Sepharosa 4-B acoplada con anticuerpos específicos contra Bf humano (Técnica VI). Eluir con solución amortiguadora de HCl-glicina 0.2 M, pH 2.8 y 2.2

- Determinar las fracciones que contengan protefna (Densidad óptica mayor a 0.05) con el método de azul de Coomassie y juntarlas. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 0.1 M y dializar con PBS
- Liofilizar y disolver en el mfnimo volumen de PBS
- Comprobar la presencia del Bf por doble difusión en microtécnica con anti-Bf (Técnica VII)
- Determinar la pureza de la muestra por inmunoelectroforesis con antiprotefnas totales y por doble difusión en microtécnica con anti-transferrina)
- En caso de determinarse la presencia de transferrina como contaminante, hacer diluciones de un suero anti-transferrina y agregar a cada dilución un mismo volumen de la muestra contaminada. Incubar durante 2 hrs. a 20°C; la mfnima cantidad de suero anti-transferrina que se debiera agregar estará representado por la dilución más alta que presente anillo de precipitación
- Para obtener los anticuerpos específicos contra Bf, inocular conejos de raza Nueva Zelanda, inmunológicamente vírgenes (Protocolo de Inoculación)

PURIFICACION DEL Bf

3 lts. de suero humano
pH 8.0
Concentrac. final prot. 6g/100 ml
3 lts. rivanol 1.68 %



↓
Disolver en mínimo vol. de KP 0.005 M, pH 7.5

↓
CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

Gradiente continuo formado por:
KP 0.005 M, pH 7.5 y
KP 0.005 M, NaCl 0.11 M, pH 7.5

↓
Identificar fracciones positivas para Bf con inmunodifusión radial e identificar contaminantes con inmunolectroforesis con antiprotefnas totales

↓
juntar fracciones positivas para Bf

↓
Diálisis contra PBS

↓
CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA 4-B

Eluir con solución HCl-glicina 0.2 M, pH 2.8
Eluir con solución HCl-glicina 0.2 M, pH 2.2

↓
Juntar fracciones con D.O. mayor a 0.05 nm
Rápidamente pH 7.2
Diálisis contra PBS

↓
Neutralizar el gel con PBS

↓
Disolver en el mínimo vol. de PBS

↓
Guardar a 4°C

↓
Doble difusión en microtécnica con anti-Bf y anti-Tf
Comprobar pureza con inmunolectroforesis con
antiprotefnas totales

↓
Precipitación con Tf

↓
Extraer sobrenadante
Soble difusión en microtécnica con anti-Bf y anti-Tf
Inmunolectroforesis con antiprotefnas totales

↓
INOCULACION A CONEJOS NUEVA ZELANDA

↓
OBTENCION DE ANTICUERPOS CONTRA Bf

TECNICA I

CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE AZUL DE COOMASSIE

Fundamento

El colorante azul brillante de coomassie G-250 se enlaza a la protefna, con lo que se provoca un cambio en la absorción máxima del colorante, de 465 a 595 nm.

La reacción se lleva a cabo en dos minutos y el color permanece estable por 1 hr.

La prueba es reproducible y su sensibilidad es de 10-100 μ g de protefna (16).

Método

- Adicionar 5 ml de la solución de coomassie a 0.1 ml de la muestra
- Agitar y reposar 15 min. a temperatura ambiente
- Leer a 595 nm utilizando solución de coomassie como blanco

- Comparar la densidad óptica obtenida con una curva estándar de albúmina humana en concentraciones de 25, 50, 75, y 100 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ y determinar la concentración de la muestra.

TECNICA II

PRECIPITACION DE PROTEINAS CON RIVANOL

Fundamento

A pH de 8.0, la mayoría de las proteínas del suero son cargadas negativamente.

El rivanol es un colorante de acridina, el cual forma complejos insolubles con muchas de esas proteínas; la unión proteína-rivanol es de tipo electrostática debido a que el rivanol está cargado positivamente a ese pH (35).

Método

- Ajustar a pH de 8.0 la muestra a precipitar
- Ajustar las proteínas a una concentración de 3.0 g/100 ml
- Agregar una solución de rivanol de tal forma que su concentración final sea de 0.84 g/100 ml
- Agitar 1 hr. a temperatura ambiente

- Agitar 24 hrs. a 4°C
- Retirar el precipitado con centrifugación
- El rivanol es retirado de la muestra con NaCl a una con centración final de 2.5 g/100 ml, agitando de 5 a 8 hrs. a 4°C

TECNICA III

CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

Fundamento

Las resinas de intercambio iónico están constituidas por una matriz insoluble que contiene grupos químicos cargados fijos, que se unen electrostáticamente a las proteínas de carga opuesta, las cuales pueden ser eluidas con cambios de pH o por incremento de la fuerza iónica del medio. La dietil aminoetil celulosa (DEAE-celulosa) es una resina con carga positiva sobre la cual se realiza un intercambio aniónico (28)(30).

Método

- Dializar la muestra exhaustivamente contra una solución amortiguadora de fosfatos 0.005 M, pH 7.5
- Montar una columna con DEAE-celulosa y equilibrarla con una solución amortiguadora de fosfatos 0.005 M, pH 7.5

- Colocar una alícuota de la muestra dializada en la columna. La cantidad de la muestra dependerá de la concentración de la proteína que contenga, así como de la capacidad de la columna (100 mg de proteína por gramo de DEAE-celulosa)
- Lavar la columna con una solución amortiguadora de fosfatos 0.005 M, pH 7.5, hasta que ya no se registre la salida de proteína (densidad óptica menor a 0.05)
- Eluir las proteínas con un gradiente continuo, formado por una solución amortiguadora inicial de fosfatos 0.005 M, pH 7.5 y una solución amortiguadora final de fosfatos 0.005 M, NaCl 0.11 N, pH 7.5
- Colectar fracciones de 3 ml y cuantificar la concentración de proteínas cada cinco tubos para realizar la gráfica correspondiente

TECNICA IV

INMUNIDIFUSION RADIAL

Fundamento

Los anticuerpos incorporados en una placa delgada de agarosa, reaccionan específicamente con el antígeno colocado en pozos de diámetro uniforme en la placa. La difusión del antígeno en la agarosa forma un anillo de precipitación si el reconocimiento antígeno-anticuerpo se lleva a cabo. Existe una relación lineal entre el área del precipitado y la cantidad de antígeno presente (35).

Método Cualitativo

- Colocar 10 μ l de suero humano en el primer pozo de una placa para inmunodifusión radial
- En los siguientes pozos colocar 10 μ l de las diferentes muestras que se deseen probar

- Dejar la placa en reposo a temperatura ambiente durante 12 hrs. o hasta que el halo de precipitación del primer pozo sea perfectamente distinguible.
- De acuerdo a los anillos de precipitación obtenidos, localizar la zona donde se encuentre la protefna en cuestión y juntar las fracciones.

TECNICA V

INMUNOELECTROFORESIS

Fundamento

La inmunolectroforesis es una combinación de electroforesis con inmunodifusión, en la que en un principio las proteínas son sometidas a un campo eléctrico, por lo que son separadas de acuerdo a su carga superficial. Posteriormente, difunden a través del gel de agar para reaccionar con un antisuero colocado en un canal paralelo, obteniéndose líneas de precipitación características a cada una de las proteínas presentes (18).

Método

- Llenar una placa con 10 ml de agar al 1% y dejar gelificar
- Hacer las perforaciones con el perforador para inmunolectroforesis y extraer el agar únicamente de los pozos por succión con vacío

- Llenar el primer pozo con suero humano previamente teñido con azul de bromofenol
- En los siguientes pozos colocar las muestras por probar
- Colocar la placa dentro de la cámara de electroforesis que contendrá una solución amortiguadora de barbituratos
- Conectar la cámara a la fuente de poder, taparla para evitar evaporación y ajustar a 100 volts
- Dejar correr las protefna hasta que el colorante del suero se haya separado 2.5 cm del pozo
- Sacar la placa y retirar el agar de los canales
- En cada uno de los canales colocar anticuerpos antiprotefnas totales
- Colocar la placa en una cámara húmeda a temperatura ambiente y esperar 12 a 24 hrs.
- Observar las bandas obtenidas e identificarlas de acuerdo a su forma característica

TECNICA VI

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN SEPHAROSA 4-B

Fundamento

En un soporte poroso insoluble se inmoviliza con un enlace covalente, una protefna fijadora que tiene la capacidad de adsorber selectivamente aquel componente -- del medio que se desee separar. Como las fuerzas de unión que regulan la adsorción son de tipo covalente, la elución puede -- llevarse a cabo por acidificación, aumentando considerablemente la fuerza iónica del eluyente o compitiendo con haptenos -- (18)(30).

Método

Inmovilización de la protefna

- Lavar e inchar el gel en un filtro de vidrio con HCl 0.001 M (200 ml) por 15 minutos

- Disolver la protefna a ser acoplada (10 mg) en NaHCO_3 0.1 M conteniendo NaCl 0.5 M (5 ml)
- Mezclar la protefna con el gel en un tubo de vidrio y _ agitar durante 2 hrs. a temperatura ambiente o 12 hrs. a 4°C (la agitación magnética debe realizarse con cuida do para evitar la fragmentación del gel)
- Lavar el material no enlazado con HCl 0.001 M y hacer reaccionar cualquier grupo activo con lisina o etanola mina 1 M a pH 8.0 por 1-2 hrs.
- A fin de remover la protefna enlazada no covalentemente, realizar tres ciclos de lavado consistentes de: solu-- ción de acetatos 0.1 M conteniendo NaCl 1M, pH 4.0 y so- lución de boratos 0.1 M conteniendo NaCl 1 M, pH 8.0
- Colocar el gel en una columna para cromatografía y hacer pasar a través de ella 500 ml de solución reguladora de_ fosfatos (PBS) 0.1 M, pH 7.2
- La columna debe ser guardada a 4°C hasta su uso

Cromatografía

- Colocar en la columna un volumen de muestra igual a aquel ocupado por la sepharosa; al mismo tiempo, abrir la columna y permitir la salida del PBS hasta antes de que se pueda visualizar la superficie del gel
- Dejar reposar 12 hrs. a 4°C
- Lavar la columna con suficiente PBS
- Eluir con una solución de HCl-glicina 0.2 M, pH 2.8 hasta que la densidad óptica de las fracciones sea menor a 0.05 nm
- Volver a eluir con una solución de HCl-glicina 0.2 M, pH 2.2 hasta que la densidad óptica de las fracciones sea menor a 0.05 nm
- Cambiar rápidamente a 7.4 el pH de las fracciones para evitar la desnaturalización de la proteína
- Neutralizar el gel con PBS para evitar su fragmentación
- Juntar las fracciones que contengan una densidad óptica mayor a 0.05 nm

TECNICA VII

DOBLE DIFUSION EN MICROTECNICA

Fundamento

Es una técnica para el análisis de sistemas antígeno-anticuerpo, en donde cada uno de ellos es colocado separadamente en pequeños orificios cortados en un medio semi-sólido de agar. Se permite la difusión de uno hacia el otro; una banda de precipitación es formada cuando el antígeno y el anticuerpo se encuentran en la zona de equivalencia. Esta técnica puede ser usada para caracterizar un antígeno o anticuerpo (42).

Método

- Hacer un frotis con agarosa sobre un portaobjetos y dejar secar.
- Colocar los soportes y el molde

- Introducir la agarosa entre el molde y el portaobjetos_ por capilaridad (espesor 1.5 mm)
- Agregar al primer pozo 50 μ l de suero control
- Agregar a los siguientes pozos 50 μ l de las muestras -- que se deseen probar
- Agregar 50 μ l de antisuero en el pozo central
- Dejar reposar de 24 a 48 hrs. en una cámara húmeda a temperatura ambiente
- Cuando en el pozo del suero control se tenga una banda - de precipitación perfectamente distinguible, se puede -- proceder a observar la aparición o ausencia de bandas en el resto de los pozos.

PROTOCOLO DE INOCULACION

INOCULACION	Bf(mg)	ADJUVANTE FREUD	VOLUMEN TOTAL
Primera semana	2	completo	3 ml
Segunda semana	2	completo	3 ml
Tercera semana	2	incompleto	2 ml
Cuarta semana	1	incompleto	3 ml
Quinta semana	1	-	2 ml

RESULTADOS

Cromatografía en DEAE-celulosa

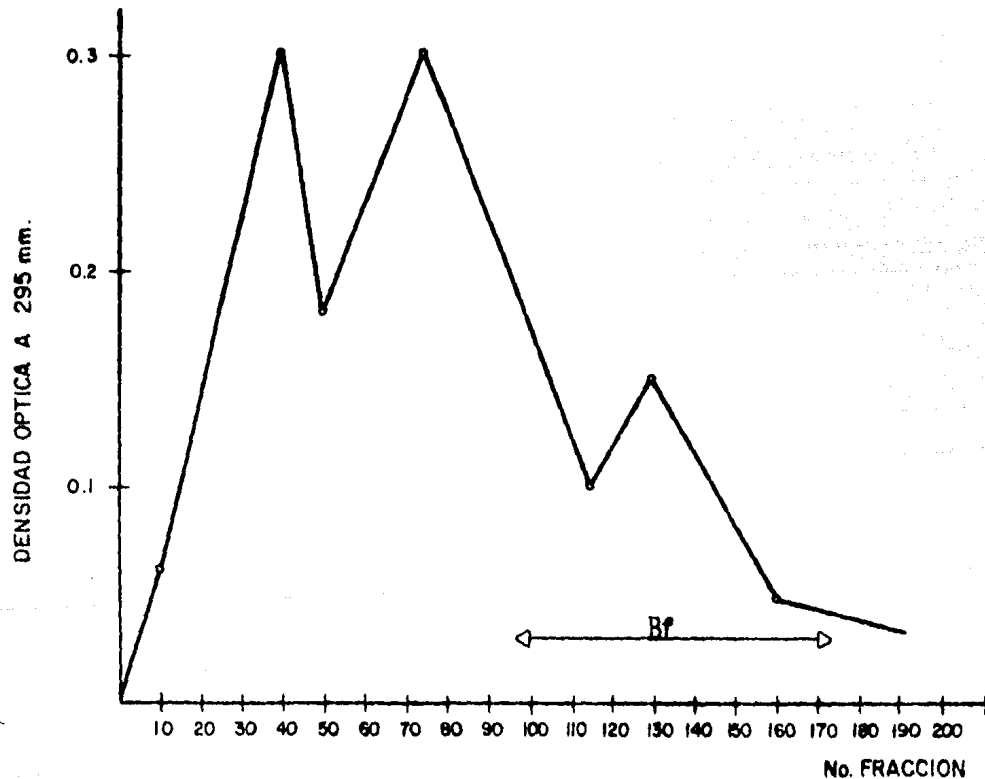
La Gráfica I muestra la forma característica de la curva obtenida en la cromatografía de DEAE-celulosa.

La zona de predominio de Bf se localizó por inmunodifusión radial.

Entre los contaminantes presentes después de la cromatografía se encontraban: albúmina, inmunoglobulinas y transferrina, los cuales fueron identificados por inmunoelectroforesis con antiproteínas totales.

Cromatografía en Sepharosa 4-B

Por medio de esta cromatografía se logró separar al Bf de la mayoría de los contaminantes; sin embargo, la doble difusión en microtécnica y la inmunoelectroforesis con antiproteínas totales mostraron la presencia de transferrina, aunque las bandas visualizadas eran muy tenues.



GRAFICA I: Cromatografía en DEAE-celulosa con gradiente continuo formado por: KP 0.005 M, pH 7.5 y KP 0.005 M conteniendo NaCl 0.11 M, pH 7.5. Se localizó la zona de predominio del Bf por inmunodifusión radial y se identificaron tres contaminantes en dicha zona por inmunoelectroforesis con antiproteínas totales.

Precipitación con antitransferrina

Con ayuda de las diluciones de antitransferrina se logró encontrar la menor cantidad necesaria de ese antisuero para separar la transferrina contaminante.

La doble difusión en microtécnica con antitransferrina y la inmunolectroforesis con antiproteínas totales mostraron finalmente una alta pureza del Bf. (Figs. 3 y 4).

Anticuerpos obtenidos de la inoculación

Los anticuerpos obtenidos de la inoculación al conejo se hicieron reaccionar en inmunolectroforesis con suero humano fresco, obteniéndose una sola banda de precipitación correspondiente a una movilidad beta (Fig. 5).

Fig. 3: Doble difusión en microtécnica. En el pozo A, fue colocado un antisuero contra transferrina; en el pozo B, un antisuero contra Factor B y en el pozo C, se colocó la muestra finalmente purificada. Como puede notarse, sólo se observa reacción entre la muestra purificada y el antisuero contra Factor B.

Fig. 4: Inmunoelectroforesis con antiproteinas totales. En el pozo superior se colocaron 10 μ l de suero normal humano y en el inferior se colocaron 10 μ l de la muestra finalmente purificada. El canal fue llenado con un antisuero contra proteinas totales humanas. Se puede observar en el pozo inferior la aparición de una sola banda de precipitación con movilidad beta, característica del Factor B.

Fig. 5: Inmunolectroforesis con suero de conejo obtenido de la inoculación. En los dos pozos fueron colocados 10 μ l de suero normal humano. En el canal fue colocado el antisuero obtenido de la inoculación al conejo. Puede observarse la aparición de una sola banda de precipitación con movilidad beta, característica del Factor B.

DISCUSION

Antes del desarrollo de métodos para la purificación de los diversos componentes del complemento, sólo se disponía de fracciones obtenidas por diálisis, e inactivadas con calor, zimosan o amoníaco. Las mezclas de estas fracciones preparadas en diversas combinaciones que carecían de una o de otra de las fracciones, se empleaban como reactivos, agregando diluciones a diferentes sueros problema. Esto se hacía con el fin de determinar si la carencia de alguno de los componentes del complemento podría estar causando algún estado patológico.

Actualmente se dispone de una diversidad de métodos que sirven como herramientas para disponer fácilmente de proteínas altamente purificadas y antisueros específicos.

No obstante de todos los adelantos en cuestión de purificación de proteínas, existen algunas que resultan un problema por ser difícilmente purificables y requerir de métodos costosos. Nosotros trabajamos con una proteína para la que resulta difícil su purificación; sin embargo, mediante ensayo y error en el laboratorio, llegamos a encontrar un método sencillo y poco costoso.

Inicialmente se practicaron precipitaciones con rivanol y sulfato de amonio, con lo que se logró separar al Bf de una gran cantidad de protefna presentes en el suero, además de que es la mejor forma de evitar grandes pérdidas de nuestra protefna, ya que la mayor parte de ella permanece disuelta en los sobrenadantes.

Se eligió el uso de cromatografías en DEAE-celulosa porque se trabaja a un pH casi neutro, evitando así una rápida desnaturalización de la protefna, en comparación con otros soportes, como la carboximetil celulosa, con los cuales se obtiene el mismo grado de pureza, pero mayor destrucción del Bf por trabajarse a pH ácido. Por medio de inmunolectroforesis con antiprotefna totales logramos comprobar la eficacia de la cromatografía en DEAE-celulosa, ya que sólo se encontró la presencia de tres contaminantes: albúmina, inmunoglobulinas y transferrina.

Posteriormente, al disponer de un antisuero contra Bf, se corrieron cromatografías de afinidad en Sepharosa 4-B, esperándose obtener al Bf altamente purificado, sin embargo, se comprobó nuevamente la presencia de transferrina. Esta última protefna resultó ser un contaminante persistente, ya que estuvo presente en todos los pasos de la purificación; la razón se debe a que muchas de las propiedades

fisicoquímicas de la transferrina son muy semejantes a las del Bf, entre las que se encuentran: el mismo peso molecular y semejantes movilidad electroforética y punto isoeléctrico.

Ese contaminante pudo ser separado del Bf por medio de una precipitación con antitransferrina, por lo que se prosiguió a inocular al conejo.

Determinación de la pureza

La pureza del Bf se probó antes de inocular al conejo con doble difusión en microtécnica con antitransferrina, en la cual no se observó reacción. En inmunoelectroforesis con antiproteínas totales, también se comprobó la pureza al obtenerse sólo una banda de precipitación característica del Bf.

Después de inocular al conejo se comprobó la pureza de la proteína con el antisuero obtenido, haciéndolo reaccionar con suero humano fresco en inmunoelectroforesis, observándose sólo una banda de precipitación característica del Bf. Más aún, al hacer reaccionar dicho antisuero con transferrina pura en doble difusión en microtécnica, no se obtuvo ninguna reacción.

CONCLUSIONES

En este trabajo se presentó un nuevo método para la purificación de una protefna sérica humana, denominada Factor B (Bf).

Es de gran relevancia que cada laboratorio llegue a -- ser autosuficiente en la producción de los antisueros que -- requiera, con metodologías económicas y sencillas; por lo -- tanto, se exploraron las técnicas ya descritas para la purificación del Bf y se desarrolló una que además de efectiva, es sencilla, sin requerir de gran metodología ni aparatos -- complicados. Todo esto es importante, ya que los sueros y antisueros comerciales resultan ser muy caros y muchas veces difíciles de adquirir.

GLOSARIO

Alotipo: Una de dos o más formas alternativas de un gen.

Bf: Factor B; GBG (Glicoprotefna beta rica en glicina); C_3 proactivador; B_2 -glicoprotefna II. Protefna participante de la vfa alterna del complemento.

Bff: Variante electroforética del Bf (rápida).

Bfs: Variante electroforética del Bf (lenta).

B_1H : Compite con el C_3b desestabilizando el complejo -- $DBbC_3b$.

C_3b INA: Conocido también como KAF, tiene la función de romper la molécula de C_3b en C_3c y C_3d .

CVF: Factor de veneno de cobra que tiene la propiedad de una C_3 -convertasa.

D: Factor D ; C_3 proactivador convertasa; GBGasa. Participante de la vfa alterna del complemento.

DMID: Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente

IgG, IgA, IgE: Inmunoglobulinas cuya clase depende de su cadena pesada.

FI: Factores de iniciación participantes en la vfa alterna del complemento.

GAG: Glicoprotefna alfa rica en glicina; fragmento "a" -- del Bf que no participa en la vfa de activación del complemento.

GGG: Glicoprotefna gama rica en glicina; fragmento "b" -- del Bf cuya función es la de activar al C₃ en la vfa alterna del complemento.

HLA: (Primer Sistema Leucocitario Humano). La mayor región de histocompatibilidad en el hombre localizada en el brazo corto del cromosoma seis.

P̄: Properdina activa, participante en la vfa alterna -- del complemento.

PBS: Solución reguladora de fosfatos.

Polimorfismo: Mezcla estable de diferentes genotipos.

BIBLIOSRAFIA

- 1.- Abramson, N; Alper, C. A; Lachman, P. J. Deficiency of C₃ inactivator in Man. *J. of Immunology* 107 19-27, 1971.
- 2.- Allen, F. H. Linkage of HL-A and GBG. *Vox. Sang.* 27 382-384, 1974.
- 3.- Alper, C. A. Alternative or Properdin Pathway of Complement Activation. 4th International Convocation on Immunology. Buffalo, New York, 1974.
- 4.- Alper, C. A; Böenisch, T. Genetic Polymorphismo in Human Glycine-rich Beta-Glycoprotein. *The J. of Exp. Med.* 135 68-80, 1972.
- 5.- Alper, C. A; Böenisch, T; Watson, L. Glycine-rich -Glycoprotein (GBG): Evidence for relation to the complement System and for Polymorphism in Man. *J. Immunology* 107 323, 1971.
- 6.- Alper, C. Añ Raum, D; Awdeh, Z. L. Studies of Hepatic Synthesis in Vivo of Plasma Proteins, Including Orosomucoid, Transferrin, α_1 -Antitrypsin, C₈ and Factor B. *Clin. Immunology and Immunopathology* 16 84-89, 1980.
- 7.- Arnason, A; Larsen, B; Marshall, W. H. Very Close Linkage between HLA-B and Bf inferred from Allelic Association. *Nature* 268 527-528, 1977.
- 8.- Arnason, A; Thorsteinsson, J. Ankylosing Spondylitis, HLA-B27 and Bf. *The Lancet* 1 339-340, 1978.

- 9.- Benacerraf, B. Textbook of Immunology vol.2. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1979.
- 10.- Bender, K; Mayarova, A; Frank, R. Haplotype Analysis of the Linkage group HLA-A: HLA-B: Bf and its Bearing on the Interpretation of the Linkage Disequilibrium. Hum. Genet 36 191-196, 1977.
- 11.- Bernal, J. E; Ellis, D. A; Haigh, J. Bf in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. The Lancet 2 961, 1979.
- 12.- Bertrams, J; Baur, M. P. Association of BfF₁, HLA-B18 and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. The Lancet, 2 98, 1979.
- 13.- Bitter-Suermann, D; Kröke, M; Brade, V. Inherited Polymorphism of Guinea Pig Factor B and C₄: Evidence for Genetic Linkage Between C₄ and Bf loci. Immunology 118 1822-1826, 1977.
- 14.- Böenisch, T; Alper, C. A. Isolation and Properties of a Glycine-rich -Glycoprotein of Human serum. Biochi. Biophys. Acta. 221 529-535, 1970.
- 15.- Brade, V; Fries, W; Bentley, C. Identification of Properdin, B. D and C₃ as Biosynthetic Products of Guinea Pig Peritoneal Macrophages and Influence of Culture Conditions on their Secretion. J. Immunology 128 1766, 1978.
- 16.- Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72 248-254, 1976.

- 17.- Curtis, A. W; Merrill, W. C. Methods in Immunology and Immunochemistry vol. 6. Academic Press, U.S.A., 1977.
- 18.- Davidson, I; Bernard, H. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Salvat, España, 1978.
- 19.- Fearon, D. Tñ Austen, D. F. Properdin: Binding to C_3b and Stabilization of the C_3b dependent C_3 convertase. J. Exp. Med. 142 856-863, 1975.
- 20.- Festenstein, H.; Demant, P. Inmunogenética Fundamental, Biología y Aplicaciones Clínicas del HLA y S-2. El Manual Moderno, México, 1981.
- 21.- Glass, D. N.; Litvin, D. A.; Schur, P. H. Serum Levels of Properdin Factor B segregate with HLA. J. Immunology 124 1522, 1980.
- 22.- Goodkofsky, I.; Lepow, I. H. Functional Relationship of Factor B in the Properdin System to C_3 proactivator of Human Serum. J. Immunology 107 1200-1201, 1971.
- 23.- Goodkofsky, I.; Stewart, A. H.; Lepow, I. H. Relationship of C_3 and Factor A of the Properdin System. J. Immunol. 111 287, 1973.
- 24.- Götze, O.; Muller-Eberhard, H. The C_3 activator system: An alternate pathway of Complement activation. J. Exp. Med. 134 90s-108s, 1971.
- 25.- Halbwach, L.; Lachman, P. J. Factor B of the Alternative Complement Pathway on Human Lymphocytes. Scand. J. Immunology 5 697-704, 1976.

- 26.- Hauptmann, G.; Sasportes, M.; Tongio, M. M. The Localization of the Bf Locus within the MHS region on Chromosome 6. *Tissue Antigens* 7 52-54, 1976.
- 27.- Hauptmann, G.; Tongio, M. M.; Klein, J. Change in Serum Factor B phenotype Following Human Orthotopic Liver Transplantation. *J. Immunology* 124 1524, 1980.
- 28.- Hudson, L.; Hay, F. C. Practical Immunology. Blackwell Scientific Publications, London, 1980.
- 29.- Kirk, R. L.; Serjeantson, G. W.; Theophilus, J. Age relationship between Insulin-Dependent Diabetes and rare Alleles of Properdin Factor B. *The Lancet* 2 537, 1979.
- 30.- Margni, R. A. Inmunología e Inmunología. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1977.
- 31.- Nerup, J. HLA Studies in Diabetes Mellitus. *Adv. Metabolic Dis.* 9 263-277, 1978.
- 32.- Ngan, B.; Minta, J. Analysis of the Peptide Maps of Human C₂ and Factor B: Evidence for Structural Homology and Common Ancestry. *J. Immunology* 120 1788.
- 33.- Niemann, M. A.; Mole, J. E. Preliminary Alignment and N-Terminal Amino Acid Sequence of the Cyanogen Bromide Peptides of Human Factor B. *J. Immunology* 124 1533, 1980.
- 34.- Pillemer, L.; Blum, L.; Lepow, I. H. The properdin System and Immunity. Demonstration and Isolation of a New Serum Protein, Properdin, and its role in Immune Phenomena. *Science* 120 279-285, 1954.

- 35.- Putnam, Frank. The Plasma Proteins. Structure, Function and Genetic Control. Academic Press, Copyright, 1977.
- 36.- Raum, D.; Alper, C. A.; Stein, R. Genetic Marker for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. The Lancet 1 1208-1210, 1979.
- 37.- Raum, D.; Donaldson, V.; Rosen, F. Genetics of Complement. Current Topics in Hematology 3 111-174, 1980
- 38.- Raum, D.; Glass, D.; Carpenter, C. The Chromosomal Order of Genes controlling the Major Histo-Compatibility Complex, Properdin Factor B, and Deficiency of the second Component of Complement. J. Clin. Invest. 58 1240-1248, 1976.
- 39.- Raum, D.; Sosenko, S.; Gabbay, K. Bf and C₂ Polymorphism in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. J. Immunology 124 1537, 1980.
- 40.- Rubinstein, P.; Rosenfield-Steele, P. Murine Factor B: Electrophoretic Polymorphism. Immunogenetics 5 363-366, 1977.
- 41.- Stewart, G. J.; Cann, H. M.; Grumet, F. C. Linkage Disequilibrium between HLA-B and the rarer Properdin Factor B alleles, BfF₁ and BfS₁. Human Immunology 1 31-36, 1980.
- 42.- Stewart, S. Immunology, Immunopathology and Immunity. Harper & Row, U.S.A., 1980.
- 43.- Stosser, T. P.; Alper, C. A.; Rosen, F. S. Opsonic activity in the newborn: Role of Properdin. Pediatrics 134 173-175, 1973.

- 44.- Weitkama, L. R.; Barbosa, J.; Guttormsen, S. A. Insulin Dependent Diabetes Mellitus and Properdin Factor B. *The Lancet* 2 369-370, 1979.
- 45.- Wells, L. J.; Edwards, J. H.; Webley, M. Ankylosing Spondylitis, HLA and Bf. *The Lancet* 1 104-105, 1979.
- 46.- Siegler, J. B.; Watson, L.; Alper, C. A. Genetic Polymorphism of Properdin Factor B in the rhesus: Evidence for single subunit structure in primates. *J. Immunolog* 114 1649-1653, 1975.