

## ENSAYOS PARA LA ESTANDARIZACION DE UNA TECNICA DE FENOTIPIFICACION DE C4 DEL COMPLEMENTO SERICO.



Liliana Yanet Suárez Contreras  
Lic. Biología Química - Msc. Genética  
Dpto. Biología U.F.P.S.

### RESUMEN

Como parte del proceso de caracterización genética de la población Colombiana, el Instituto de Genética Humana de la Universidad Javeriana, ha venido desarrollando investigaciones sobre diversos polimorfismos de proteínas séricas, tales como: Haptoglobinas, fosfoglucomutasa, componente del grupo específico, C3 (Sarmiento, P, 1993), Transferrina (Ortiz, R, 1993), enzimas eritrocitarias, proteínas de membrana y marcadores moleculares (Bernal, J, 1989). Como parte de este proceso, en este estudio se estandarizó la técnica de Electroforesis de alto voltaje e Inmunofijación de C4 lo que permitirá incluir esta proteína en los estudios de población en Colombia.

Además existen pocas investigaciones relacionadas con los fenotipos y genotipos de C4 en Colombia y Latinoamérica. También la existencia de defectos o carencias congénitas, condicionadas por trastornos genéticos, ponen de relieve la función primordial del Complemento en la supresión de las infecciones. Es así que enfermedades como: Esclerosis múltiple, Diabetes Mellitus insulino-dependiente, Lepromatosis lepra, artritis reumatoidea juvenil, etc., están relacionadas con alelos raros y niveles de deficiencia de esta proteína.

### INTRODUCCIÓN

La alteración de la estructura de una proteína puede tener efectos fisiológicos tan patentes que pueda detectarse por los cambios que produce en la anatomía o fisiología de su portador. Sin embargo, y puesto que la mayoría de dichos cambios serán deletéreos para la salud, podemos esperar que su frecuencia en la población baja. En efecto, tales cambios son raros: Constituyen ejemplo de enfermedades genéticas, más que de polimorfismos genéticos extendidos. No obstante, podría haber muchos polimorfismos proteínicos que no ejercieran efectos aparentes sobre la fisiología o el crecimiento. ¿Cómo detectar tales polimorfismos?

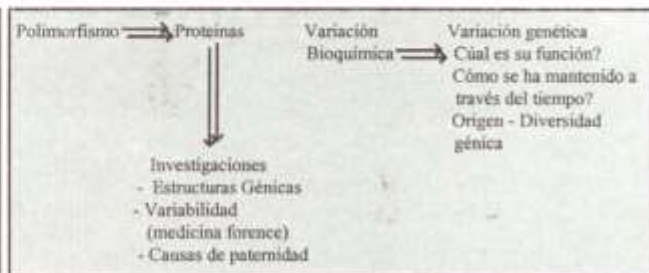
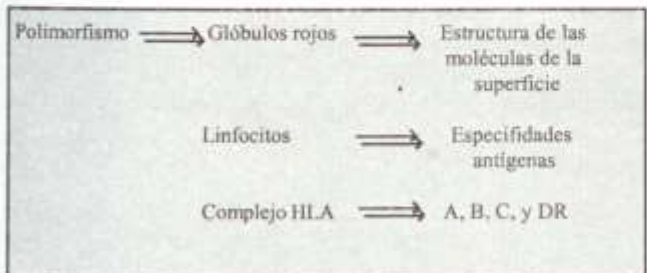
Existen dos métodos para la detección de polimorfismos:

1. Sistema Inmunitario: detecta cambios en la forma molecular. (Diagrama 1).
2. La Electroforesis: Detecta cambios en la carga molecular. (Diagrama 2).

El objetivo de este trabajo es la identificación de isotipos y algunos alotipos para el Cuarto Componente del Complemento Humano, a partir de la estandarización de la técnica de Electroforesis de alto voltaje e inmunofijación en geles de agarosa. Su importancia radica en que C4 es el que presenta el polimorfismo más elevado.

### 1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO HUMANO

El conocimiento de todo el sistema es necesario para entender la aproximación técnica al estudio del C4, ya que una de las técnicas hace uso de toda la cascada del Complemento para distinguir las variantes alélicas. El Complemento es un complejo grupo de enzimas del suero, colaboran con los anticuerpos y otros factores que intervienen como mediadores de reacciones tanto inmunes como alérgicas.



1. Sistema Inmunitario: Detecta cambios en la forma molecular

2. La Electroforesis: Detecta cambios en la carga molecular

### Metodos para la Detección de polimorfismos

Sus principales funciones biológicas son:

- a. Activación de las células especiales como fagocitos y mastocitos
- b. Producción de lisis celular.
- c. La acción de la opsonina que facilita la fagocitosis.

La acción del Sistema de Complemento se ejerce:

- a. A través de los anticuerpos que han reaccionado con el antígeno.
- b. Por medio de los receptores.
- c. Por mecanismo fisicoquímicos no muy claros, que por la vía alterna permiten cumplir una función de defensa no específica sin la participación de los anticuerpos.

## ACTIVACION DEL COMPLEMENTO

La activación puede tener lugar por dos vías diferentes: Vía Clásica y Vía Alterna.

**1. Vía Clásica:** Clq,Clr,Cls, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9. Activada por complejos inmunes, anticuerpos IgM, IgG. Actúan en tres grupos funcionales distintos.

**a. Unidades de reconocimiento:** Formada por tres subcomponentes del factor C1: Clq, Clr, Cls. El anticuerpo se modifica al reaccionar con el antígeno.

**b. Unidad de activación:** Activar el factor C3 es lo más importante dentro del proceso de activación del sistema. Diagrama 3.

**c. Unidad de ataque de Membrana:** C3b actúa sobre el factor C5 y lo fragmenta. (Diagrama 4-5).

**2. Vía alterna:** Se activa en ausencia de ACS; por polisacáridos bacterianos. Colabora con el complemento, en la estimulación del englobamiento de células y partículas extrañas (fagocitosis) y en la producción de reacciones inflamatorias. Requiere de la activación del factor A que, con B, activa D, por el E transforma y activa el properdín que actúa sobre el factor C3. El factor D es análogo al C1. El factor B es análogo al C2. Fracciona C3, C4 en la Vía Clásica. C3b interactúa

## ACTIVACION CLASICA

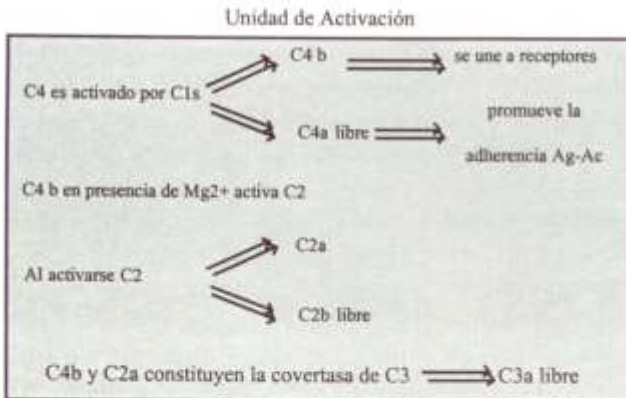


Diagrama 3

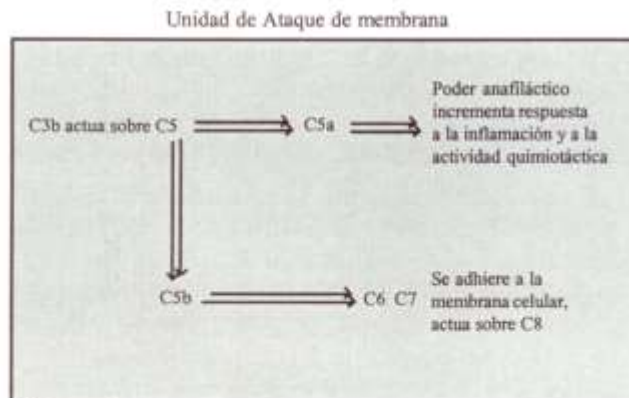


Diagrama 4

## VIAS DEL COMPLEMENTO

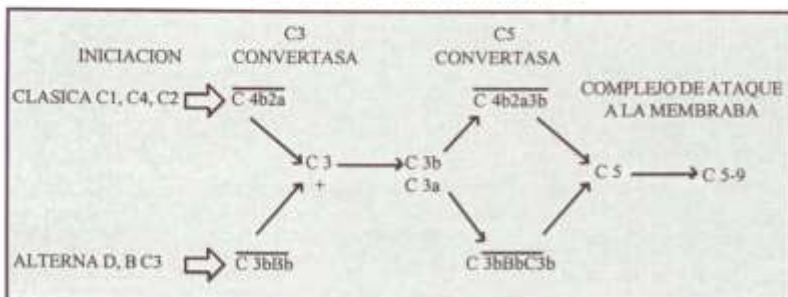


Diagrama 5

## PRODUCCION DE LOS FACTORES DEL COMPLEMENTO

- Hígado: C3, C6, C9, el inhibidor de C1, el properdín, el factor B (90% de las proteínas del complemento)
- Bazo: C6 y C8
- Macrófagos: C4 y C2
- Células epiteliales del intestino: C1

Diagrama 6



RESPUESTAS

con B y D formando el complejo C3bBb y Ba. C3Bb obra como convertasa del C3, ocurriendo reacciones iguales a las de la Vía Clásica a partir de C3. Esta vía es importante en las primeras etapas de la vida, antes de que se formen los propios anticuerpos y pueda suplir deficiencias de C1, C4, y C3. (Diagrama 5).

## PRODUCCIÓN DE LOS FACTORES DEL COMPLEMENTO

Los distintos factores del complemento se sintetizan en distintos órganos. (Diagrama 6).

## ENFERMEDADES ASOCIADAS AL COMPLEMENTO

El sistema del complemento juega un papel muy importante en la defensa contra infecciones. Por lo tanto hay que valorar el nivel de uno y otro de los

componentes del complemento como medio de que controle la actividad de un proceso patológico. Estos niveles pueden ser controlados como índices aproximados de la enfermedad. Las enfermedades más frecuentes son las presentadas en el Diagrama 7.

## 2. EL CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO HUMANO (C4)

La existencia del cuarto componente del complemento humano, fue postulada en 1926 por Gordon, Whitehead y Wormall. El C4 es una  $\beta$ -globina identificada electroforéticamente como  $\beta$ 1E. Su coeficiente de sedimentación es 10S. Peso molecular 200 Kdal. Y concentración Sérica 400  $\mu$ g/ml. Está formada por tres cadenas polipéptidicas:  $\alpha$ (PM, 93 KDa),  $\beta$ (PM, 78KDa),  $\gamma$ (PM, 33KDa).

## CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FÍSICAS DE C4

El C4 está presente en el suero como una proteína. C4A y C4B están localizados en el fragmento C4d en la zona  $\alpha$ 2 de dicha proteína. (Diagrama 8).

## ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN DEL GEN

El complejo mayor de la histocompatibilidad (MHC) en el hombre, entre la región HLA- B y HLA-D (2CM) es altamente polimórfica. En el brazo corto del cromosoma 6, éste contiene 3 clases mayores de genes: Clase I y II que codifican para las glicoproteínas de la superficie de la célula a quien concierne el reconocimiento de sí mismas, involucradas en la respuesta inmune y los de Clase III que codifican para algunas proteínas del complemento. Esto es interesante clínicamente en el

### COMPLEMENTO Y ENFERMEDAD

- Enf. Reumáticas:	Lupus eritematoso sistémico presenta niveles disminuidos de C3 y C4.
- Enf. Infecciosas:	Malaria
- Enf. Renales:	Lesiones glomerulares
- Enf. Dermatológicas:	Anemia hemolítica autoinmune, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)
- Artritis Reumatoideas, Esclerosis múltiples, Diabetes Mellitus	

Diagrama 7

### CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FÍSICAS DE C4

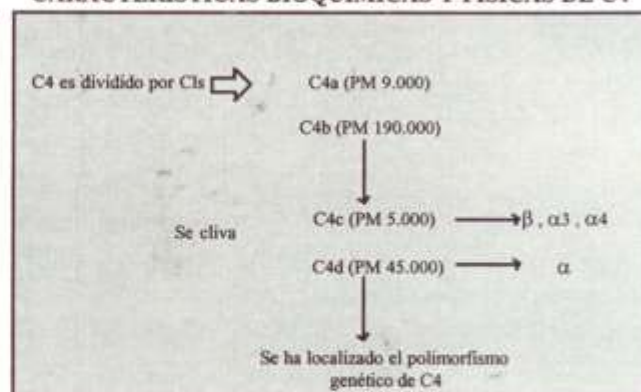


Diagrama 8

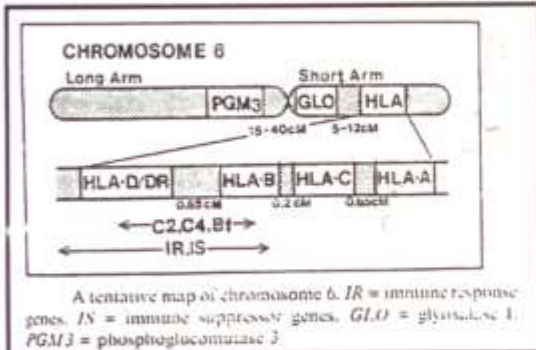


Diagrama 9

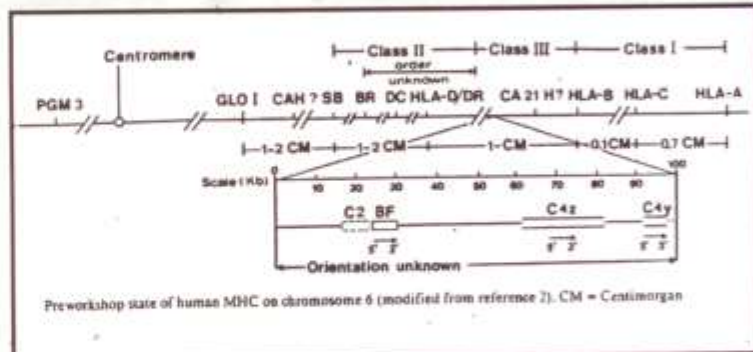


Diagrama 10

HLA, no sólo porque los productos de los genes de clase I y III son la mayor barrera en el trasplante de tejidos y susceptibles a muchas enfermedades autoinmunes, Los de Clase III, codifican para C2, C4 y Factor B.

Dos loci estructuralmente ligados C4A y C4B. Donde el locus C4A codifica para el isotipo C4A y el locus C4B codifica para el isotipo C4B, El loci del Complemento o Complotipo tiene el orden (BF) C2, C4A y C4B; en forma abreviada es SCO1. (Diagrama 9 y 10).

### POLIMORFISMO DE C4.

C4 es una proteína altamente polimórfica O'Neill, J, (1978) Está controlado por Loci cerrados ligados genéticamente; F(C4A) F-Fast, fo (ausencia banda anodal) y S(C4B) S-Slow, So (ausencia banda catodal).

### NOMENCLATURA

La propuesta es la del "Sistema Internacional para Nomenclatura de genes Humanos" (Whitehead, A., 1984).

**Alotipo:** En 1983, se reconocieron 12C4A, 20C4B, y unos alelos

silenciosos para cada locus, con un rango de C4A 5-15%, C4B 10-20%. Estos se designan con números arábigos de cátodo a ánodo por distancia de migración electroforética, Stever, M, (1989). Y a los alelos sólo se les asigna el prefijo "DA" o "DB" "DA\*33" para A\*3,3.

**Isotipos:** Son C4A y C4B, que muestran diferencias funcionales por transacilación a amino (NH<sub>2</sub>) vs hidróxido(OH), C4A que es de consistencia estructural diferente entre pro, cys, pro, val, leu, asp y en C4B: leu, ser, pro, val, ile, his. Estos residuos pueden ser responsables en parte o completamente de propiedades asociadas con isotipos. La región isotípica (aminoácido 1101-1106) de C4A y C4B actúa para seleccionar sitios sobre un complejo inmune, produciendo diferencias funcionales.

**Variantes:** La variante para el locus C4A, que controla la mayor parte del grupo ácido es designada F, la variante para el locus C4B que controla la mayor parte del grupo básico, es designada S.

**Haplotipo:** Es el producto de la recombinación de muchas formas

alélicas C4A3A2BQO.

**Complotipo:** Los genes del Complemento entre el MHC son heredados como unidades estables y estas combinaciones de variantes genéticas son descritas como complotipos. Un complotipo es descrito para indicar las variantes al factor B, la movilidad rápida (F) o lenta (S). Uno de los complotipos más comunes es SC31. (Factor B\*S, C2\*C; C4A3; C4B1). Da información útil en diferencias genéticas entre poblaciones y provee grupos de referencia para estudio de enfermedades asociadas.

**Fenotipos:** La determinación se obtuvo por las siguientes técnicas:

1. Electroforesis de agarosa de plasma tratado con EDTA, pretratamiento con Carboxipeptidasa B, seguida por Inmunofijación u Overlay hemolítico.
2. Inmunolectroforesis cruzada: desarrollo de una enzima ligada a ensayo inmunoabsorbente (Elisa), usando anticuerpo monoclonal de ratón. Los fenotipos se escriben con letras mayúsculas, con un espacio entre el símbolo del locus y su variante, Ej: C4B 1.



## ANTIGENOS RODGERS Y CHIDO

C4A y C4B se puede distinguir por antisuero específico anti-Rodgers, anti-Chido confirmando la diferencia en MW entre el locus A y B. C4A expresa los antígenos del grupo sanguíneo Chido (anti-Chido) y C4B expresa los antígenos del grupo sanguíneo Rodgers (anti-Rodgers).

## MATERIALES Y METODOS

La técnica en la cual se basan los protocolos utilizados es la electroforesis, la cual puede aplicarse a una gran variedad de enzimas. En el desarrollo de esta investigación se probaron cuatro protocolos; el propuesto por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, el de la Doctora White, Irene, el del Doctor Maüff, G, y por último del doctor Alarcón Gilberto.

Todos estos protocolos determinan la fenotipificación (poli-morfismo) del C4 mediante la técnica de electroforesis de alto voltaje en geles de agarosa e inmunofijación. (Tab. 1).

Se tomó como patrón el utilizado por Maüff (1990).

## RESULTADOS

Las muestras se analizan de acuerdo a las bandas observadas en el gel, con patrones previamente determinados, los cuales han sido analizados de acuerdo a su movilidad electroforética, encontrando

TABLA I. PROTOCOLOS

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA			
Instituto de Genética 10 µl (10) + 7 µl (10) Diluido 16 - 100 x 4 grados C Adicionar 5 µl EDTA - 0.2M	White, I 5 µl (10) + 1 µl (10) Diluido 16 - 100 x 4 grados C Adicionar 5 µl EDTA - 0.2M	Maüff, G 9 µl (10) + 1 µl (10) + 1 µl (10) + 1 µl (10) Diluido 16 - 100 x 4 grados C Adicionar 5 µl EDTA - 0.2M	Alarcón, G 10 µl (10) + 21 µl (10) Diluido 16 x 4 grados C Adicionar 1 - 10 µl
PREPARACION DEL GEL			
Instituto de Genética Solución de Agarosa en B.O. 0.45% Adicionar sobre la placa. Dejar a temperatura ambiente	White, I Solución de Agarosa en B.O. 1.0% Adicionar sobre la placa. Dejar a temp. ambiente 1h. Refrigerar	Maüff, G Solución de Agarosa en B.O. 1.5% Adicionar sobre la placa. (Inchubar) Dejar temp. ambiente	Alarcón, G Solución de Agarosa en Anestigolab de corchita 0.75% correr en medio de las dos placas. Escarificar y refrigerar
APLICACION DE LA MUESTRA			
Instituto de Genética Ranuras con papel filtro No. 3	White, I Ranuras con papel filtro No. 17	Maüff, G Ranuras con papel filtro No. 1	Alarcón, G Ranuras con aplicador para muestra
ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE			
Instituto de Genética Solución B.O. pH 8.7 Pantón Whattman No. 7 Corriente 300v, 40Hz, 100 mA. por 5 h a 4 grados C.	White, I Solución B.O. Pantón Whattman No. 1 Corriente 300v, 40Hz, 100 mA. por 5 h a 4 grados C.	Maüff, G Solución B.O. pH 8.7 Pantón Whattman No. 1 Corriente 370v, 40Hz, 100 mA. por 4 h a 4 grados C.	Alarcón, G Anestigolab de corchita. Pantón Whattman No. 1 Corriente 300-300v, 40 mA. por 4 h a 4 grados C.
INMUNOFIJACION			
Instituto de Genética Incubar 230 µl anti - C4 a 1h a 37 grados C. Pantón Whattman No. 1	White, I Incubar 0.5 ml anti - C4 + 0.5 ml Fijador para complementos a 1h temperatura ambiente Pantón Whattman No. 1	Maüff, G Incubar 0.5 ml anti - C4 + 0.5 ml (CFT) Luzero humedo a 2h temperatura ambiente Pantón Whattman No. 1	Alarcón, G Incubar 1 µl anti - C4 Cámara húmeda toda la noche
CONDICIONES INMUNOFIJACION			
Instituto de Genética Luzero, solución salina toda la noche Pantón Whattman 1p - 4kg Suav. Temperatura ambiente	White, I Luzero, solución salina toda la noche Pantón Whattman 1p - 4kg Suav. 40 grados C.	Maüff, G Luzero, solución salina toda la noche Suav. 70 grados C.	Alarcón, G Luzero, agua caliente Whattman 1 humedecido con agua destilada Suav. Temperatura ambiente
COLORACION			
Instituto de Genética 1% A.C. a 20° Decolorar tiempo necesario	White, I 2.5% A.C. a 10° Decolorar 20°	Maüff, G 0.1% A.C. a 10° Decolorar 5°	Alarcón, G 2.5% A.C. a 7° Decolorar tiempo necesario

isotipos y alotipos del C4. El número que acompaña al isotipo Ej: C4, A6, designa la posición obtenida Electroforesis. (Tabla II). Las bandas mejor observadas de C4 se pueden apreciar en las Fotografías 1 y 2.

## DISCUSIÓN

En la investigación se realizaron varios ensayos para la estandarización de la técnica de Electroforesis de alto voltaje de Inmunofijación en el gel de agarosa para C4; cabe destacar que por ser C4 altamente termolábil y sensible a cualquier tipo de cambio físico, resultó especialmente dispendiosa y demorada la estandarización.

Experimentalmente se ha demostrado, que los protocolos según White, I, y Alarcón G., nos permite identificar la presencia de

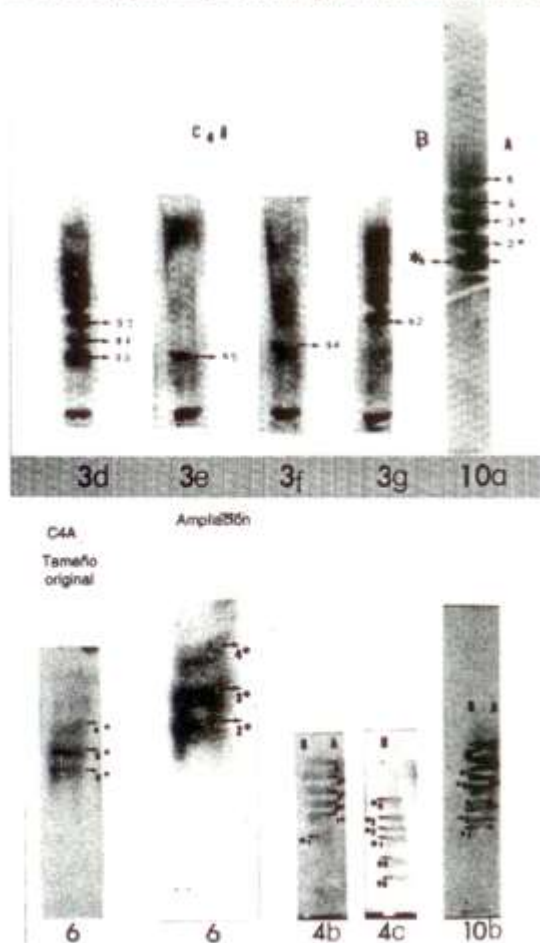
isotipos y alotipos, con resultados óptimos. La proteína no se visualizó cuando los plasmas se refrigeraron y congelaron por varios días. Al realizar los ensayos se variaron condiciones como tiempo cumplido de la Electroforesis, cantidad de muestra y de anti C4 concentración del gel de agarosa y pH del buffer, los resultados variaron hasta que finalmente pudimos obtener unos adecuados. Con respecto al protocolo del instituto de Genética, los ensayos para revelar los geles por "overlay" no presentaron buenos resultados.

El otro protocolo ensayado fue el recomendado por White, I, en el que las variaciones efectuadas fueron: Cantidad de muestra, 9 µl, de plasmas frescos, corridos el mismo día de su obtención, agaros al 1% puentes para unir el gel al buffer formados por 5

Tabla II. RESULTADOS

FIGURA No.	Alotipos observados		Protocolo	
	C4A	C4B		
1		96,95	Inst. Genética White, I	
2		1,11,92,94,95		
3a	91,1,22,35,1,12,2	92,11,12,13,2,22,3		
3b				
3c		92,94,95,1,12,2,3,4		
3d		92,94,95		
3e		95		
3f		94		
3g		92		Maüff, G
4a	91,1,12,2			
4b	1,2,3,4,6	95,92,1,3,6		
4c		94,92,1,11,12,13,2		
5	2,3,4	22,3,35,4		
6				
7a	91, 1, 12, 2, 3	96,1,11,12,13,2,22		
7b		3,35,4,45,5,6		
8		96,92,94,95		
9	Isotipo C4A	Isotipo C4B	Alarcón, G.	
10a	2,3,5,6	6		
10b	1,2,4,8	1,2,3		

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA  
Alotipos figuras 3d, 3e, 3f, 3g, 10a, 6, 6, 4b, 4c, 10b



hojas de papel Whatman N°1; ranuras para las muestras hechas con papel Whatman N°17; corrida de la Electroforesis de 3:30 a 4h; colorante al 2.5% de Azul de Comassie. (Tabla I y II).

Las condiciones comunes para estos protocolos fueron: plasma fresco, desialización (Neuraminidasa tipo VIII) diálisis 16-18 h. a 4 grados C, Buffer O'Neill pH8.8- 8.9. Indicándonos que estas condiciones son importantes para mantener la actividad de la proteína, evitando de este modo su denaturación. La variación para el protocolo de Maüff; G, fue adicionar Carboxipeptidasa- B (se remueve la arginina terminal C y los residuos de lisina, encontrándose una banda distinta para cada tipo de C4, existiendo un número superior de alelos expresados) y el anti- C4 se diluyó en fijador para el Complemento. Las demás condiciones permanecieron iguales a las propuestas por White, I, observándose los alotipos de C4, correspondientes a la Tabla I y II. Otro protocolo con el que se obtuvieron buenos resultados, fue el propuesto según Alarcón, G. Las modificaciones efectuadas fueron: secar el gel con papel de filtro antes de aplicar la muestra, usar aplicadores de plástico, correr la electroforesis por 4h y aplicar sobre el gel 1 ml de anti- C4. (tabla I y II).

### CONCLUSIONES

Podemos concluir que las técnicas de electroforesis de alto voltaje e Inmufijación en gel de agarosa para C4 más confiables, por presentar buenos resultados fueron las propuestas por White, I, y la de Alarcón G., pudiéndose identificar los isotipos C4A, y algunos alotipos para C4A, como: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A12, A91, y para C4B, como: B1, B2, B3, B4, B5 B6, B11; b12, B22, B35, B45, B92, B94, B95, B96. Los protocolos que se ensayaron y de los cuales no se obtuvieron resultados muy confiables en el laboratorio, fueron el propuesto inicialmente por el Instituto de Genética y la propuesta Maüff, G, 1983. Los mejores resultados se lograron al manipular muestras de plasma frescos, conservadas en



refrigeración por no más de 2h y no se encontraron buenos resultados al trabajar plasmas conservados por largos periodos de tiempo, en congelación o en refrigeración. Se notó también, mediante todos los ensayos realizados, que la prolongada

electroforesis en gel de agarosa y el uso del anti - C4 son necesarios para la tipificación del C4. Por último, cabe mencionar, que los ensayos propuestos son de gran importancia ya que pueden ayudar a profundizar en el conocimiento del C4 en nuestro

país, ampliando los estudios del polimorfismo del mismo; dar aportes al estudio de genética de poblaciones, de ciertas enfermedades y dar pie para poder realizar otras futuras investigaciones.

## BIBLIOGRAFIA

- ALPER, C. and JOHNSON A. Immunofixation electrophoresis . A technique for the study of protein polymorphism. *Vox Sang* 17. 1969. pp 445-452.
- ALVIN D. The efficiency of complement activation in MHC linked diseases *Immunology Today* . Vol 4, n9, 1983.
- ALARCON V. GILBERTO. Estudio inmunogenético de pacientes mestizos mexicanos con espondilocartropatías. *Mex.* 1988, pp 118-46.
- AVERILL, B. And BERNAL, J. Genetic and environmental influences on serum levels of human C4. *Annals of Human Biology*. Vol. 11 n2, 1984, 149-156.
- AVILA L. y ROMERO C. Manual Práctico de Inmunología clínica . I. M. Editores primera edición Bogotá, 1995.
- AWDER, Z. And ALPER C. Genetic polymorphism, of human complements C4 and detection of heterozygotes. *Nature* Vol 282, 1979, pp 205-207.
- AWDER, Z. And ALPER C. Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement. *Proc. Nat. Acad Sci USA* Vol 77, n6, 1980, pp 3576-3580.
- BECKER, P. *Genética Humana ediciones Toray*. Barcel. 1980, pp 214-235.
- BERG, S. Et al. Use of DNA amplification (PCR) and direct DNA sequencing in the characterization of C4 alleles. *Ann Hum Genet* 54, 1990. pp 183-189.
- BERNARD. H. Diagnóstico y tratamiento clínico por los laboratorio. Octava edición, editorial Salvat, Barcelona , 1988. pp 1081-1096.
- BERNAL, I. et al. Complement polymorphism in Colombia. *Annals of Human Biology* . vol 12, n3, 1985. pp 261-265.
- BERNAL, I, AVERILL, B and SARMIENTO, P. Genetic and environmental influences on serum levels of human complement components C4 and Bf in Colombian families. *Annals Human Biology*. 1984.
- BLAKE, N. and RADFORD. P. Detection of chromosome 6 Non-HLA gene products. *Human Disease*. 1984, pp 52-64.
- BRAUN, L. et al. Null alleles of human complement C4. *J. Exp. Med* 171, 1990, pp.129-140.
- BRUNN P., et al. Family studies of complement C4 and HLA in man . *Hum. Genet*, 58, 1981, pp. 260- 267.
- BRUNN, P. Et al. Genetics of complement C4. Two homoduplication haplotypes C4S and C4F in a family. *Hum Genet*. 61, 1982, pp. 36-38.
- BUETTNER J. *Antropología Física* Editorial Limusa, México 1980, pp 413-448.
- CAMERON P., et al. Major histocompatibility complex genes influence the outcome of HIV infection ancestral haplotypes with C4 null alleles explain diverse HLA associations *Human Immunology*: 29, 1990. pp 282-295.
- CARROLL, M. Et al. A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B . *Nature*, vol 307, 1984, pp 237-241.
- CHAKRAVORTI N, et al. The chemical structure of the C4d fragment of the human complement component C4. *Molecular Immunology*, vol 24, n 11, 1987. pp 1187-1197.
- CHAN, A. and ATKINSON , J. Oligosaccharide structure of human C4. *Journal of Immunology* , vol 134, n 3, 1985, pp 1790- 1798.
- CHRISPEELS, J. et al. sandwich enzymelinked immunosorbent assays for the quantification of the isotypes C4 (C4 and C4B) in human plasma. *Journal Immunological Methods*, 125. 1989, pp. 5-12.
- DODDS S. Et al. The purification and properties of some less common allotypes of the fourth component of human complement . *Immunogenetics* 24, 1986. pp 279-285.
- DOXIADIS, G. and GROSSE - WILDE H. C4 allotyping by prolonged gel electrophoresis an immunoblotting by prolonged gel electrophoresis and immunoblotting using monoclonal and polyclonal antibodies. *Complement Inflamm* 7, 1990. pp 269- 276.
- FRIEDEMANN N. Y otros *América Negra* . Pontificia Universidad Javeriana , n4, 1992. Bogotá.
- GILES, C. A new genetic variant for Chido. *Vox Sang* 1984-, pp 149-156.
- GILES C. et al Antigenic determinants expressed by human allotypes; a study of 325 families provides evidence for the structural antigenic model *Immunogenetics* 27, 1988. pp 442-448.
- GILES C. Et al C4 and HLA haplotypes associated with partial inhibition of anti - RG and anti - Ch *Journal of immunogenetics*, II, 1984, 305-317.
- GILES C. et al . The study of a French family with two duplicated C4A haplotypes *Human Genetics*, vol 77, 1987, pp. 359- 365.
- GORGL Y. et al. A new duplication C4B\*1.12 at the C4B locus associated with Bf\* SO7 in a tumisian population. *Tissue Antigens*, 35, 1990, pp 217-219.
- HARVEY , Colten. Molecular regulation of complement gene expression. *Progress in Immunology*, 1986. pp 314- 324.
- HELLMAN, U. et al. primary sequence differences between Chido and Rodgers variants of triptic C4d of the human complement system *FEB5*. Vol 170, n2, 1984, pp 254-258.
- HOLME, E. et al. Quantitation of human C4A and C4B , in serum and plasma by enzyme linked immunoabsorbent assay. *Immunogenetics* 27, 1988, pp 295- 297.
- INSEMAN, D. and YOUNG , J. The molecular basis for the difference in immune hemolysis activity of the Chido and Rodgers isotypes of human complement component C4. *The Journal of Immunology*, vol 132, n 6, 1984, pp 3019- 3027.
- KEYEUX, G. Poblaciones negras de Colombia: una primera aproximación a su estructura molecular. *América Negra* , n5, Bogotá, 1993. pp 21-33.
- KEYEUX, G. Molecular análisis of the IGHA and MHC class III region genes in one family with Ig-A and C4 deficiencies . *Experimental and Clinical Immunogenetics*, 7, 1990 pp 170-180.
- KYNOSHIA, Taroh . *Biology of complement the overture Immunology Today* , vol 12 n, 9. 1991, pp 291- 294.
- KOBAYASHI, K. et al. Associations between restriction fragment length polymorphisms detected with a probe for human C4 and allotyp of C4B5 allele *Human Immunology*, 29. 1990, pp 3-13.
- KRAMER, J. et al *Complement* , C2, C3, C4, and factor B allele distribution in the gypsy population in Hungary *Immunology Letters* 24, 1990, pp 11-12.

- LEWONTIN, R. La diversidad humana. Editorial Labor, Barcelona, 1984, pp 29-52.
- LUNDWALL A. Et al. Isolation of tryptic fragments of human C4 expressing Chido and Rodgers antigens. *Molecular Immunology*, vol 19, n12, 1982, pp 1655-1665.
- MARGNI R. *Inmunología e Inmunoquímica*. Editorial Panamericana, cuarta edición, Buenos Aires, 1989, pp 146-189.
- MAUFF, G. et al. C4 nomenclature stament C4. *Complement and Inflammation* 7, 1990, pp261-268.
- MAUFF, G. and BRAUN - STIL WELL M. Relative electrophoretic migration distances for the classification of C4 allotypes. *Complement and inflammation* 7, 1990, pp 277-281.
- MAUFF, G. et al. The C4 beta chain. Evidence for a genetically determined polymorphis. *Hum Genet* 64, 1983, pp186-188.
- MAUFF, G. et al. Revise nomenclature for human complement component C4 *Bulletin of the World Health Organization*. 70, 4, 1992, 531-532.
- MAUFF, G. Application of the MHC class III complement markers to population genetics 1987.
- MAYER, Manfred *Complement de overture Immunology Today*, vol 12, a 9, 1991, pp 291-294.
- MEYER O, et al. Genetic deficiency of C4, C2 or C1q and lupus syndromes. Association with anti- Ro (ss- a) antibodies. *Clin Exp. Immunology*, 62, 1985. 678-684.
- MAYER M. *inmunología*, segunda edición. Prensa Científica, Barcelona, 1973. 165-177.
- MCLEAN, R. et al. Characterization of two hibrid C4 allotypes and B\*3 by electrophoretic, serological and restriction fragment length polymorphysm analyse tissue antigens 35. 1990. pp 75-81.
- MEVAD, B. OLAISEN, D. and TEISBERG, P. Electroporetic of human C4 is due to charge differences in the alfa chain, presumably in the C4d fragment scand. *J. immunol.* 14, 1981, pp 303-307.
- MORGAN, P. and WALPPORT, M. Complement deficiency and disease, vol 12, n 9, 1991. pp 301-306.
- MOULDS, J. and DEJONGH, R. influence of C4B null genes on cytomegalovirus antibody titers in healthy blood donor. *Transfusion*, 32 1992, pp 145-147.
- MÜLLER, J. and BIRO, C. isolation and description of the fourth component of human complement. *J. Exp. Med.* 1963, pp 447-467.
- OLAISEN, B. et al. The C4 system human *Genet N* 50, 1979. pp 187-192.
- OLAISEN, B. et al. Human complement C4 locus is duplicated on some chromosomes nature, vol 279, 1979, pp 736-737.
- O'NEILL YOUNG YANG,S. and TEGOLI, J. Chido and Rodgers blood groups are distinct antigenic components of human complement C4 Nature ,vol 273, 1978,pp 668-670.
- O'NEILL,G. and DUPONT, B. Serun C4 levels Chido-Rodgers and allotypes of C4 component complement transplantation proceedings.
- O'NEILL, G. C4 Polymorphism usse of a monoclonal antibody to distinguis C4A and C4B locus products *vox sang* 47, 1984, pp 362-365.
- PALSDOTTIR A. Et al Gene organization of haplotypes expressing two diferent C4A allotypes *Hum Genet* 76, 1987, pp, 220-224
- PALSDOTTIR A. Et al . Correlation between a DNA restriction fragment length polymorphism and C4A6 protein Nature , vol 306 , 1983. pp, 615-616.
- PARTAMEN J. And KOSKIMIES S. Human MHC Clase III genes Bf and C4 polymorphism complotypes and association with MHC class I genes in the finnish population *Hum Hered* 36. 1986,pp 269-275.
- PARTAMEN J, and CAMPBELL, D. Restriction fragment analysis of non-deleted complement C4 and genes sugesis point mutations in C4A null alleles but gene conversions in C4B null alleles *inmunogenetics* 30 1989 pp 520-523.
- PORTER, R. Complement polymorphism the mayor bistocompatibility complement and associated diseases A speculation *Mot Biol Med* 1,1983,pp161-168.
- PRENTICE H, et al C4B gene polymorphism detected in a human cosmid clone *inmunogenetics* 23: 1986,pp 274-276.
- REDMANN,V. et al Quantitation of the human component C4 definition of C4QO alleles and C4A duplications *vox sang* 63 1992,pp 117-123.
- REILY,B,LEVINE, P. and SKANES V. *Journal of Immunology*. Vol 147, n9, 1991,pp 3018-3023.
- REID R et al Complement system proteins which interact with C3b *Immunology today*. Vol 7,n 7 , 8,pp230-234.
- REGUEIRO, J. And LOPEZ C *Inmunología,biología y patología del sistema inmune*, Editorial Interamericana , Madrid 1996,pp 25-30.
- REGUEIRO,J,ARNAIZ-VILLENA, A Human MCH class III (BF,C2,C4) genes and GLO; their association with other HLA antigens and extended haplotypes in the spanish population. *Tissue antigens*, 1987, 31, 14-25.
- RITTNER C. and BERTRAMS J. On the significance of C2, C4, and factor B polymorphism in disease *Hum Genet* vol 56, 1981, pp 235-247.
- RITTNER C. and MAÜFF G. C4 polymorphism *Histocompatibility*, 1984, pp 318-324.
- ROITT, Ivan *Inmunología, fundamentos*, séptima edición, Editorial Panamericana , Buenos Aires, 1994, pp 22 57-62.
- ROJAS W. *Inmunología*, Editorial colima ,tercera edición , Medellin, 1976,pp 64-78.
- ROJAS W. *Inmunología (CIB) Centro de investigaciones biológicas*, octava edición,Medellin 1990,pp184-200
- ROSS M et al A molecular basis for the two locus model of human complement C4.*Nature*, vol 298, 1982, pp 854-856.
- ROOS, M. Et al Rodger (Rg) and chido (Ch) determinants on human C4 Characterization of two C4,B5 Subtypes one of which cotains Rg and Ch determinants. *The journal of Immunology* vol133, n 5, 1984, pp. 2634-2640.
- SCHNEIDER P, et al polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-hidroxiylase genes *J. Clin invest* vol 78, 1986, pp650-657.
- SCHIFFERLI, J. et al. Complement. Mediated adherence of immune SCHEREIBER R and MÜLLER J fourth component of the interchain disulfide bonds of the fourth component of human complement (C4) evidence based on the liberation of fragments secondary to ,thiol-disulfide interchange reactions *journal of Immunology* vol 136, a 11, 1986, pp4152-4157.
- SILVE, J , et al structural polymorphism of human Dr antigens *Nature* 279, 1979,pp 436-437.
- SIM E and CROSS Phenotyping of human complement componet C4 class III HLA antigen *Biochem J* 239,1986,PP 763-767.
- STEVER M,et al An estimate on the frequency of duplicated haplotypes and silent alleles of human C4 protein polymorphism. Investigations in healthy Caucasoid families. *Tissue antigens*. 33, 1989, pp 501-510.
- TAROH, K. Biology of complement the overture *immunology today*. Vol 12, n9 1991, pp 291-294.
- TEISBERG, P. et al. The genetic polymorphism of the fourth component of human complement: Methodogical aspects and a presentation of linkage an association data relevant to its localization in the HLA region. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol 146, 1977, pp 1380-1389.
- TERTIA, K. et al. The structural basic of the multiple forms of human complement component C4. *Cell*, vol 36, 1984, pp 907-914.
- TIMOTHY, C. et al. Evolution of the complement system. *Immunology Today*. Vol 12, n 9, 1991, pp 295-299.
- TILLEY, C. ROMANS, D. CROOKSTON, M. Localization of Chide and Rogers determinants to the C4d fragment of human C4. *Nature*, vol 276, 1978, pp 713-71.
- TRÆDSSON, Lennart, et al. Quantitativa variation of C4 variant proteins associated whit many MHC haplotypes. *Inmunogenetics*, 30, 1989, pp 414-412.
- YUNG, YU. C. The complete exon-intron structure of a human complement component C4A gene. *Journal of immunology*. Vol 146, n 3, 1991, pp 1057-1066.



