

GAMMAPATIAS MONOCLONALES MALIGNAS EN VENEZUELA. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO, SEROLOGICO E INMUNOQUIMICO

María de L. Gallango

Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 1827, Caracas 1010-A.

RESUMEN

Se hizo un estudio en 332 muestras de suero o plasma y en 220 orinas de pacientes con gammapatías monoclonales malignas, utilizando métodos serológicos, bioquímicos e inmunoquímicos, cuyos resultados se presentan. El 87,4% de la muestra correspondía a mieloma múltiple monoclonal, el 6,3% a biclonal y el resto a gammapatías malignas no mielomatosas. Las clases de mieloma estaban distribuidas en la siguiente proporción: IgG 63,1%; IgA 23,8%; IgD 1,7%; IgE 0,3%; Bence Jones 10,3%; no secretor 0,7%. De las gammapatías malignas no mielomatosas, el 5,4% eran macroglobulinemia de Waldenström y el 0,9% eran casos de enfermedad de cadenas pesadas alfa. El 70% de las orinas examinadas tenían proteínas de Bence Jones, de las cuales el 65% era tipo kappa y el 35% tipo lambda.

Por ser un material seleccionado, la muestra no se consideró estadísticamente adecuada para la determinación de las tasas de incidencia de gammapatías monoclonales malignas en el país. Ante la inexistencia de un re-

gistro sanitario de morbilidad o de morboletalidad nacional sólo se determinaron las tasas de mortalidad por mieloma múltiple, haciendo uso del registro de mortalidad del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, en el período comprendido entre los años 1977-1981. Los valores obtenidos fueron bajos, siendo el promedio de mortalidad 0,45 para el sexo masculino y 0,41 para el femenino y los valores promedio de edad ajustada 1,61 y 1,36 respectivamente. Todos fueron expresados por 100.000 habitantes.

Se discute la posible influencia de factores raciales, genéticos y ambientales sobre la diferencia de frecuencias en la presentación de formas clínicas y características inmunológicas de clase de inmunoglobulina, así como la posibilidad de la existencia de algún defecto básico de los mecanismos de inmunorregulación de las funciones celulares en estos pacientes.

INTRODUCCION

Bajo la denominación de gammapatías monoclonales⁽⁵⁹⁾ se conoce un grupo de condiciones patológicas aparentemente relacionadas entre sí, asociadas con anormalidades de las inmunoglobulinas, que tienen en común algunas características como la proliferación excesiva de una sola línea celular productora de inmunoglobulinas, la producción excesiva de una sola inmunoglobulina, homogénea y frecuentemente, pero no invariablemente, lleva a una disminución en la producción de las inmunoglobulinas normales.

Las gammapatías monoclonales se conocen también como disglobulinemias monoclonales, discrasias de células plasmáticas⁽⁴⁶⁾, inmunoglobulinopatías⁽¹⁸⁾, paraproteinemias, disproteinemias, parainmunoglobulinopatías⁽⁵⁸⁾.

Para algunos autores⁽⁴⁶⁾, la denominación más adecuada debe ser discrasia ya que implica un desbalance o proliferación desproporcionada de un grupo de células productoras de inmunoglobulinas, que pueden ser benignas o malignas. Es importante la cantidad de disglobulinemias asociadas a infecciones crónicas y neoplasmas.

De acuerdo a las características clínicas y morfológicas además de la clase de proteína producida por las células neoplásicas, las gammapatías

monoclonales malignas se agrupan en las siguientes categorías: mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedades de cadenas pesadas y amiloidosis (30). Como ocurre con otros neoplasmas, la etiología de estos tumores es desconocida.

Según la mayoría de los autores la presencia simultánea de mas de un componente monoclonal ocurre en una frecuencia del 1%, lo que representa la actividad de mas de una línea celular y corresponde a lo que se llama gammapatía biclonal o multiclonal.

El diagnóstico de los casos típicos de gammapatías monoclonales, no ofrece gran dificultad, pero diferenciar los principales tipos de gammapatías monoclonales, puede no ser tan sencillo y directo ya que cada vez, con más frecuencia, se reconocen formas transicionales, así como la asociación con diferentes clases de moléculas aberrantes cuya existencia sólo se conoce a través del estudio inmunoquímico y estructural de la molécula de la inmunoglobulina involucrada. El entendimiento del defecto estructural contribuye a la comprensión del control genético y del ensamblaje de las cadenas de polipéptidos.

Una característica importante de la distribución de alguna de estas gammapatías monoclonales, es la variación en cuanto a su incidencia en diferentes grupos raciales y en grupos raciales iguales que ocupan áreas geográficas distintas.

Los objetivos principales del presente trabajo son:

1. Hacer un análisis de las características inmunológicas y distribución de las gammapatías monoclonales en un grupo importante de casos referidos a nuestro laboratorio y estudiados en el transcurso de varios años. Estas características podrían ser diferentes a las de otras series reportadas en la literatura mundial, tomando en cuenta que la nuestra es una población genéticamente diferente, con un ambiente geográfico diverso.
2. Obtener datos epidemiológicos y estadísticos sobre las gammapatías monoclonales malignas en Venezuela.

MATERIAL Y METODOS

El material de este estudio estuvo constituido por: 330 sueros o plasmas y 220 orinas de pacientes con diagnóstico clínico o sospecha de gammapatía monoclonal maligna, proveniente de varios hospitales del país,

principalmente del área metropolitana de Caracas (Hospital Universitario de Caracas, Hospital General "Miguel Pérez Carreño", Hospital Central Fuerzas Armadas Nacionales, Hospital "Simón Bolívar" de El Algodonal, Hospital Vargas, Hospital Central de Maracay, Hospital de Cumaná, Hospital "Ruiz y Páez" de Ciudad Bolívar)

El diagnóstico clínico se hizo en cada hospital siguiendo las normas y criterios establecidos para estos casos: 1. Presencia de plasmocitos anormales en médula ósea (punción o biopsia) o plasmocitos en una proporción mayor del 20%. 2. Evidencia radiológica de lesiones osteolíticas. 3. Presencia de paraproteínas en suero y/o en orina.

Las muestras de suero y orina fueron sometidas a electroforesis microzonal en acetato de celulosa utilizando un amortiguador de barbital 0,05 M pH 8,6 y membranas de poliacetato de celulosa Sephaphore III.

Igualmente se hizo inmunodifusión e inmunoelectroforesis del suero y de la orina usando antisueros contra IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, Kappa, lambda y fragmentos Fab y Fc, además de antisuero completo. Algunos antisueros se obtuvieron comercialmente, otros se obtuvieron en nuestro laboratorio por inmunización de conejos albinos adultos de la especie Nueva Zelândia. Para ello generalmente se inyectaban subcutáneamente en múltiples sitios con 2 mg de la proteína purificada en emulsión con adyuvante de Freund completo, seguido de una inyección intravenosa del antígeno en solución salina tamponada, durante las siguientes 3 semanas. Los conejos inmunizados se sangraban una semana después de la última inyección y los antisueros obtenidos se absorbían en forma apropiada para hacerlos monoespecíficos. Para la cuantificación de las inmunoglobulinas G, A, M y D se utilizaron placas de agar con anticuerpo incorporado obtenidas comercialmente y la IgE fué cuantificada por radioinmunoanálisis (Phadebas IgE, PRIST) usando controles conocidos.

Las subclases de IgG se aislaron siguiendo el método de Shakib (56) que usa cromatografía en DEAE celulosa (Whatman DE52) equilibrada completamente con solución tampón de fosfato de sodio 0,01 M a pH 6,5.

Para la determinación de las subclases de las inmunoglobulinas se usaron anticuerpos monoclonales comerciales, y para detectar la presencia de cadenas pesadas libres en el suero, en la orina y en el líquido yeyunal de los pacientes se usó inmunoselección por electroforesis en agar o agarosa al 2% (16), teniendo especial cuidado en incorporar al agar antisueros con alto título de anticuerpos.

Las tasas de mortalidad por mieloma múltiple se determinaron en una muestra comprendida entre los años 1977 y 1981, utilizando para ello la

población de Venezuela a mitad de año, o sea para el 1° de julio del año correspondiente. Se calcularon las tasas de mortalidad cruda, de edad específica, de edad ajustada (método directo), para la cual se usó la población censal de 1971 como estándar, ya que las cifras de la población censal de 1981 no se conocen todavía. Los datos se obtuvieron del Anuario de Epidemiología y Estadística Vital que edita el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Se usaron grupos de edad de 5 años y se calcularon las tasas por 100.000 habitantes de acuerdo a De Shelly Hernández (15) y a Bogue (10).

RESULTADOS

La clasificación de acuerdo al diagnóstico de las gammapatías malignas estudiadas puede verse en la Tabla I. El 93,7% de los casos correspondía a mieloma múltiple y el resto a gammapatías malignas no mielomatosas. De los 311 casos de mieloma, 2 fueron clasificados como no secretores (0,6%) y 21 (6,3%) como biclonales; ambos grupos serán considerados en forma detallada en otra publicación.

TABLA I

DISTRIBUCION DE SUBTIPOS CLINICOS EN 332 CASOS DE GAMMAPATIAS MALIGNAS

| | N° | % |
|--|-----|--------|
| Mieloma múltiple | 311 | 93,7 |
| Monoclonales (290 casos) | | (87,4) |
| Biclonales (21 casos) | | (6,3) |
| Macroglobulinemia de Waldenström | 18 | 5,4 |
| Enfermedad de cadenas pesadas α | 3 | 0,9 |
| Total | 332 | 100,0 |

La distribución de los componentes monoclonales de acuerdo a la clase de inmunoglobulina y tipo de cadena liviana se muestra en la Tabla II. La Tabla III presenta la distribución por sexos de gammapatías monoclonales malignas, correspondiendo el 54% al sexo masculino. El 70% de las muestras de orina examinadas tenían proteínas de Bence Jones y de ellas el 65% era tipo kappa y el 35% tipo lambda. Todos los casos de mieloma IgD tenían Bence Jones tipo lambda y en el caso de IgE, el tipo

antigénico de la proteína de Bence Jones fue kappa. La distribución del mieloma múltiple tomando en consideración los grupos de edad mostró su mayor frecuencia entre los 60 y 64 años.

TABLA II
DISTRIBUCION DE CLASES, TIPOS Y GRUPOS CLINICOS EN
GAMMAPATIAS MONOCLONALES MALIGNAS

| | Total | Clase | N° | % | Kappa % | Lambda% | κ/λ razón |
|-------------------------------------|-------|------------------|-----|--------|------------|-----------|---------------------------|
| Mieloma múltiple | 290 | G | 183 | (63,1) | 130 (71,0) | 53 (29,0) | 2,45 |
| | | A | 69 | (23,8) | 39 (57,0) | 30 (43,0) | 1,3 |
| | | D | 5 | (1,7) | 0 (0,0) | 5 (100,0) | — |
| | | E | 1 | (0,3) | 1 | | |
| | | B.J. | 30 | (10,3) | 14 (47,0) | 16 (53,0) | 0,9 |
| | | No se- cretor | 2 | (0,7) | | | |
| Macroglobulinemia de Waldenström | 18 | M | 18 | | 10 (56,0) | 8 (44,0) | 1,25 |
| Enfermedad de cadenas pesadas | 3 | A | 3 | | | | |
| Total | 311 | | | | | | |

TABLA III
DISTRIBUCION POR SEXOS DE GAMMAPATIAS MONOCLONALES
MALIGNAS

| | Clase | N° | Sexo | | | |
|-------------------------------------|--------------------|-----|-----------|-------|----------|------|
| | | | Masculino | | Femenino | |
| | | | N° | % | N° | % |
| Mieloma múltiple | G | 183 | 98 | 53,5 | 85 | 46,5 |
| | A | 69 | 33 | 47,8 | 36 | 52,2 |
| | M | | | | | |
| | D | 5 | 3 | 60,0 | 2 | 40,0 |
| | E | 1 | 1 | 100,0 | — | — |
| | B.J. | 30 | 17 | 56,6 | 13 | 43,3 |
| | No secre- tores | 2 | | | 0,7 | — |
| Macroglobulinemia de Waldenström | M | 18 | 12 | 66,6 | 6 | 33,4 |
| Enfermedad de ca- denas pesadas | A | 3 | 1 | 33,3 | 2 | 66,7 |

En las Tablas IV y V se puede ver la distribución de las clases de gammapatías monoclonales en varios países, incluyendo el nuestro, con el fin de hacer una comparación.

TABLA IV

DISTRIBUCION DE CLASES DE INMUNOGLOBULINAS MONOCLONALES EN VARIAS SERIES DE PACIENTES

| Autor(es) | | Nº de casos | IgG % | IgA % | Bence Jones % | Macroglobulinemia de Waldenström | Otros |
|-----------------------------|------------|-------------|-------|-------|---------------|----------------------------------|-------|
| Aggio (1) | Argentina | 56 | 47,8 | 13,0 | 21,8 | 13,0 | 4,4 |
| Ameis y Pruzanski (5) | Canadá | 677 | 57,0 | 18,0 | 15,6 | 6,6 | 2,8 |
| Fine y Lambin (20) | Francia | 604 | 41,6 | 23,7 | 7,4 | 27,3 | 0 |
| Hobbs (22) | Inglaterra | 212 | 53 | 25 | 19 | — | 3 |
| Jeri (27) | Perú | 29 | 45 | 38 | 10 | 7,0 | 0 |
| Osserman y Farhangi (47) | EE.UU. | 351 | 52,1 | 21,6 | 25,0 | — | 1,2 |
| Ruiz Reyes y col (53) | México | 168 | 40,4 | 28,6 | 22,6 | 4,8 | 3,6 |
| Gallango (presente trabajo) | Venezuela | 311 | 58,8 | 22,2 | 9,7 | 5,8 | 3,5 |

TABLA V

DISTRIBUCION DE CLASES DE INMUNOGLOBULINAS ANORMALES EN VARIAS SERIES DE PACIENTES

| Autor(es) | | Nº de casos | IgG % | IgA % | IgD % | Bence Jones | Otros % |
|-------------------------|-----------|-------------|-------|-------|-------|-------------|---------|
| Jacobson y Shulman (26) | Suráfrica | 49 | 55,0 | 24,0 | — | 20,0 | — |
| Kanoh (28) | Japón | 128 | 68,8 | 19,5 | 1,6 | 9,4 | 0,7 |
| Kyle (29) | USA | 869 | 59,0 | 23,0 | 1,0 | 17,0 | 0,2 |
| Ohtani (45) | Japón | 131 | 51,9 | 22,9 | 6,1 | 18,3 | 0,8 |
| Outeriño y col. (48) | España | 100 | 47,0 | 27,0 | 3,0 | 18,0 | 5,0 |
| Pruzansky (51) | Canadá | 632 | 60,9 | 19,3 | 1,9 | 16,8 | 1,1 |

En la macroglobulinemia de Waldenström y en el mieloma múltiple, con excepción de los casos clasificados como Bence Jones y los no secretores, los niveles séricos de las inmunoglobulinas monoclonales estuvieron dentro de límites normales en algunas oportunidades y llegaron a límites 10 o más veces por encima de los valores máximos normales establecidos para la población venezolana (IgG = 1406 ± 413 mg/dl; IgA = 261 ± 98 mg/dl; IgM = 86 ± 31 mg/dl; IgD = $0,3$ a $0,40$ mg/dl; IgE = $0,012 + 0,008$ mg/dl. Determinados por Páez y Arends 1971, (sin publicar). El resto de las inmunoglobulinas estaban generalmente deprimidas en forma notable, detalle éste que algunos autores consideran muy significativo en la separación y distinción entre gammapatías benignas y malignas.

La distribución de los tipos de cadenas livianas en relación a las clases de cadenas pesadas en las diferentes gammapatías malignas se encontró en la misma proporción observada en otros estudios (20, 32, 33, 53).

La producción de inmunoglobulinas con cadenas pesadas incompletas, desprovistas de cadenas livianas se observó en 3 casos. Esta es una característica de los desórdenes inmunoproliferativos conocidos como enfermedades de cadenas pesadas (ECP). La ECP α (55) es la más común y notable de este grupo y es la única clase que encontramos en nuestra casuística (Tabla I). La electroforesis de estos tres casos no dio mucha información, sólo mostró un aumento moderado de las globulinas α_2 , disminución de las otras proteínas y moderada hipogammaglobulinemia. La técnica de inmunoselección combinada, con inmunoelectroforesis, permitió detectar las cadenas alfa libres en el suero y en el contenido yeyunal de los pacientes, pero no en sus orinas concentradas. La prueba de termoestabilidad para investigar proteínas de Bence Jones en la orina fué en todo caso negativa y la cantidad de proteínas excretadas fué siempre muy baja. Las cadenas alfa se clasificaron como subclase A $_1$, con ayuda de anticuerpos monoclonales.

En 21 de los 332 sueros de pacientes con gammapatías malignas estudiados, se encontró una cantidad anormalmente grande de dos distintas poblaciones homogéneas de inmunoglobulinas, o sea gammapatías biclonales en combinaciones homotípicas y heterotípicas. De los 21 individuos, sólo 5 eran de sexo masculino, representando por tanto el 23,8% del total.

No se determinaron las tasas de incidencia general, por edad específica y tasas de edad ajustada, debido a que la muestra es en gran parte seleccionada y no correspondería probablemente a la incidencia real del mieloma múltiple en el país o en la ciudad de Caracas.

Debido a la inexistencia de un registro adecuado de morbilidad por parte de las autoridades sanitarias del país, se hizo uso del registro de mortalidad por esta enfermedad, que al mismo tiempo da idea de la incidencia y permite comparar resultados con los obtenidos en otras poblaciones.

La determinación de las tasas de mortalidad total por mieloma múltiple, entre los años 1977-1981 da cifras promedio de 0,45 por 100.000 habitantes, para el sexo masculino, 0,41 para el sexo femenino y 0,43 para el total de ambos sexos (Tabla VI). Los raros casos de muerte por esta enfermedad ocurridos antes de los 30 años de edad se computaron conjuntamente con el grupo de 30-34 años.

Las tasas de edad ajustada pueden verse en la Tabla VII, y la Figura 1 muestra gráficamente una comparación de nuestras tasas de mortalidad

(edad específica) por mieloma múltiple, las de las poblaciones blanca y no blanca de los Estados Unidos y la del Japón, durante un período determinado de varios años.

TABLA VI

TASAS DE MORTALIDAD POR MIELOMA MULTIPLE
EN VENEZUELA*
(Años 1977 - 1981)

| Años | Total | Varones | Hembras |
|----------|-------|---------|---------|
| 1977 | 0,54 | 0,58 | 0,50 |
| 1978 | 0,43 | 0,35 | 0,50 |
| 1979 | 0,33 | 0,28 | 0,39 |
| 1980 | 0,43 | 0,55 | 0,32 |
| 1981 | 0,42 | 0,49 | 0,35 |
| Promedio | 0,43 | 0,45 | 0,41 |

* Por 100.000 habitantes

TABLA VII

MORTALIDAD POR MIELOMA MULTIPLE
TASAS DE EDAD AJUSTADA
(Años 1977 - 1981)

| Años | V | H |
|----------|------|------|
| 1977 | 2,06 | 1,64 |
| 1978 | 1,29 | 1,68 |
| 1979 | 1,03 | 0,92 |
| 1980 | 1,94 | 1,07 |
| 1981 | 1,71 | 1,17 |
| Promedio | 1,61 | 1,30 |

DISCUSION

Los resultados presentados constituyen la única información hasta el momento, sobre las gammapatías monoclonales malignas en nuestro país; al compararlos con otras series, se observa que la distribución del orden de la frecuencia es igual, correspondiendo al mieloma IgG la mayor proporción, ya que siempre estas alteraciones van en relación a la proporción en que la inmunoglobulina se encuentra normalmente en la sangre (9, 33). La incidencia de macroglobulinemia de Waldenström es baja, 5,4% siguiendo

un mismo patrón de frecuencias junto con otras poblaciones americanas, como Canadá, Perú y Méjico (5, 27, 53).

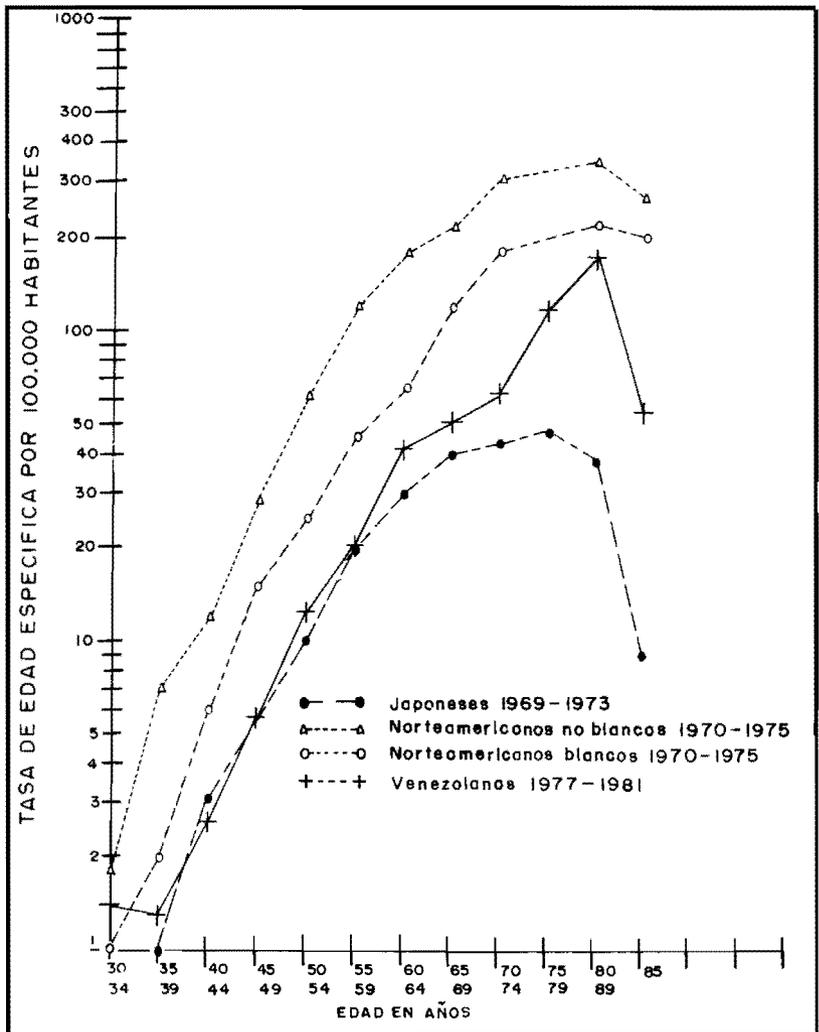


Fig. 1.— Tasas de mortalidad (edad específica) por mieloma múltiple en varias poblaciones.

En la distribución por sexos se encontró siempre mayor frecuencia en el sexo masculino que en el femenino, siendo este predominio más marcado en las macroglobulinemias. Un punto de interés en esta serie y con significación desconocida, es la mayor frecuencia de mieloma IgA en el sexo femenino.

No se conoce la razón o la base fisiológica por el cual el mieloma múltiple predomine en el sexo masculino, aunque en estudios experimentales hechos en ratones, se han encontrado resultados que sugieren algún papel de las hormonas masculinas en la inducción del plasmocitoma del ratón (23). Realmente las diferencias en la distribución por sexo que se reportan en la actualidad no son muy grandes, como ocurría en épocas anteriores (26).

En los países de América Central y del Sur, la información sobre incidencia de mieloma es escasa; en El Salvador (7) se ha encontrado una forma peculiar de plasmocitoma en cuya etiología se considera influye la existencia de infecciones nasales crónicas con *Klesbiella rhinoscleromatis* que predisponga al plasmocitoma localizado, y su posterior transformación en leucemia de células plasmáticas. Mas Martin (38) en un estudio hecho en Cuba publicó cifras que corresponden a 59% en blancos, 20% en negros y 20% en mestizos. Como la población blanca no es mayoría, Blattner (9) ha estimado que haya diferencia en la prestación de servicios de salud pública que pueden considerarse como determinantes de estas cifras. En Brasil (Sao Paulo) (37), se ha reportado una frecuencia de mieloma múltiple que representa el 3,4% de los tumores linforreticulares, siendo predominante en el sexo masculino. El archivo de Cali, Colombia (61), reportó 18 casos de mieloma múltiple entre 1967 y 1971, en una población total de aproximadamente 77.000. La frecuencia en varones (tasas de edad estandarizada), se consideró igual a 1,1/100.000 habitantes. El 15% de los tumores linforreticulares es la cifra encontrada en el Perú como frecuencia de mieloma, entre los años 1952 y 1970 y corresponde a 70 casos observados (42). En Argentina (1) en un estudio de 56 individuos, el 87% correspondió a mieloma múltiple y el 13% a macroglobulinemia de Waldenström.

En alrededor del 15 al 20% de los casos de mieloma múltiple, salvo algunas excepciones (20) según estadísticas obtenidas en varias poblaciones de otros países (Tablas IV y V) y en el 10,3% de los mielomas monoclonales en la población venezolana o en 9,7% si tomamos en cuenta todo el grupo de gammapatías monoclonales malignas estudiadas, las células plasmáticas sólo sintetizan cadenas livianas de inmunoglobulinas, dando lugar a la forma poco frecuente de la enfermedad, conocida como mieloma Bence Jones o enfermedad de cadenas livianas (62), que es bioquímicamente más indiferenciada y de curso clinicopatológico más grave.

En los 30 individuos de nuestra casuística, como es común en estos pacientes, la enfermedad cursó generalmente con hipoproteinemia en grado variable, depresión marcada de las inmunoglobulinas, intensa proteinuria de Bence Jones, ausencia de anormalidades electroforéticas im

portantes o evidentes en el suero. Generalmente se observó aumento de la globulina α_2 , hipogammaglobulinemia e hipoalbuminemia. La frecuencia del 10,3% baja en relación a las observadas en otras poblaciones, la distribución aproximadamente igual en ambos sexos y una mayor proporción del tipo de cadena lambda (53%) que la del tipo de cadena kappa (47%), son las características del mieloma Bence Jones en la muestra estudiada. Estos resultados difieren de los reportados en la literatura mundial en los cuales la frecuencia mayor corresponde siempre a las cadenas kappa (20, 32, 63).

Llama la atención la proporción de mielomas biclonales presentes en la población estudiada, y su notable frecuencia en las mujeres, ya que de 21 casos encontrados, 16 (86,2%) correspondieron a personas de sexo femenino. La proporción de 6,4% de todos los mielomas estudiados, es alta, tomando en cuenta las cifras reportadas en numerosas oportunidades en la literatura mundial (14, 19, 31) con un rango entre 0,14% (52) y 3,2% (14), aunque muchas de ellas corresponden a publicaciones de años atrás cuando no se tenía el conocimiento actual sobre las inmunoglobulinas, ni la metodología avanzada para estudiarlas.

La variante de mieloma múltiple conocida como no secretor no presenta inmunoglobulinas monoclonales detectables en el suero o en la orina, aún cuando la destrucción ósea y la plasmocitosis en médula ósea, son síntomas verdaderamente importantes en la mayoría de los pacientes con esta variedad de mieloma. No es esta una forma común de presentación de la enfermedad, por lo cual se conoce poco sobre su evolución y las causas que determinan la falta de secreción de alguna inmunoglobulina anormal en el torrente circulatorio.

Nuestros dos pacientes clasificados como mieloma múltiple no secretor, nunca presentaron proteínas anormales en el suero ni en la orina durante la evolución de la enfermedad, que tuvo las características generales antes mencionadas. No se hizo inmunofluorescencia, ni citotóxica, razón por la cual no se pudo conocer si la falta de secreción de la inmunoglobulina era debida a problemas relacionados con la síntesis de la proteína o a un bloqueo del proceso mismo de secreción.

La proporción del mieloma no secretor en nuestra serie es de 0,7% cifra baja en relación a la frecuencia de 4,7% publicada por Dreicer y Alexanian (17), probablemente por falta de referencia a nuestro laboratorio ya que la mayoría de los casos son enviados por tener un componente monoclonal en suero.

Los 3 pacientes observados con diagnóstico de enfermedad de cadenas pesadas eran adultos jóvenes, pertenecientes a un nivel socio-económico

bajo de la población venezolana, siendo ésta una peculiaridad encontrada en la mayoría de los pacientes con diagnóstico de enfermedad de cadenas pesadas, y que abunda además en los países subdesarrollados de este continente. Estos países tienen una alta proporción de su población, viviendo en condiciones higiénicas deplorables, sufriendo parasitosis y desnutrición; factores que han sido considerados profundamente involucrados en la etiología de esta enfermedad. Sin embargo, sólo un número limitado de casos de enfermedad de cadenas pesadas alfa, se ha reportado hasta el momento, en individuos provenientes de estas regiones (54, 55).

Diferencias de áreas geográficas, de grupos raciales, así como factores ambientales, podrían ser las causas de esta observación; también por la complejidad inmunológica de esta enfermedad, la falta de un estudio sistemático de las inmunoglobulinas del líquido yeyunal, así como de estudios de biosíntesis a partir de biopsias de individuos con enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado, cuya proteína anormal no se detecta en el suero, son causas de que la enfermedad no se diagnostique. De allí que las frecuencias basadas en estudios de poblaciones no se conocen y que los casos conocidos deben ser una proporción muy por debajo de la realidad.

La edad tardía de comienzo es una característica importante del mieloma múltiple, siendo de todas las neoplasias, con excepción de la leucemia linfocítica crónica, la que muestra mayor dependencia de la edad.

Además de la edad considerada como el mayor factor indicador de riesgo en el desarrollo del mieloma múltiple y otras discrasias de células plasmáticas, la raza se considera como otro determinante importante, habiéndose correlacionado el riesgo con las diferencias raciales en cuanto a niveles de inmunoglobulinas (13, 41, 57) estimándose que los altos niveles de estas proteínas en poblaciones negras deben corresponder a mayor carga antigénica o a mayor reactividad a una carga antigénica determinada. Quizás esto pudiera explicar la susceptibilidad innata de las poblaciones negras a padecer la enfermedad.

Los niveles séricos de las inmunoglobulinas determinados por Páez y Arends (1971, sin publicar) en nuestra población mestiza normal son más altos que los establecidos como normales en otras áreas geográficas y grupos raciales, como las poblaciones norteamericanas antes mencionadas (13, 57).

Los reportes sobre incidencia de cáncer, al hacer comparación internacional de las tasas de edad ajustada (estándar internacional) señalan que la incidencia de mieloma múltiple en las diferentes poblaciones reportadas

en el mundo (9), está entre 0,1 y 9,9 por 100.000 habitantes y enfatizan que la ocurrencia de mieloma múltiple en los negros americanos es predominante (36, 39, 49, 61). Blattner y col. (8), han publicado tasas estandarizadas de mieloma múltiple altas en negros africanos, demostrando que la observación no es limitada a las poblaciones negras de Norteamérica. Para Oettlé (43, 44), sin embargo, el mieloma en Bantus y en poblaciones blancas fué igualmente común.

Por el contrario, las poblaciones orientales tienen en general baja frecuencia de mieloma múltiple, con marcada tendencia hacia las formas menos diferenciadas y un aumento de edad específica por encima de los 50 años, mucho menos marcado que en otras poblaciones (2, 6). Nuestra población mestiza es producto de la mezcla de tres razas: caucasoides, negroides y amerindios, con niveles séricos de inmunoglobulinas más altos que los establecidos como normales para las poblaciones norteamericanas, puede incluirse entre los grupos de baja incidencia de mieloma múltiple, ésto se comprueba al comparar gráficamente las tasas de mortalidad (1977-1981) por grupos de edad específica como las de los japoneses (1969-1973) y americanos blancos y no blancos (1970-1975). Las tasas de mortalidad de nuestra población son intermedias entre la población blanca norteamericana y la japonesa (Fig. 1). Sin embargo se debe tener presente que el porcentaje de omisión en la denuncia de los casos, tan frecuente todavía en nuestro medio y la mejoría en la supervivencia debido al mejor manejo de estos pacientes, en la época actual, son factores que modifican la relación frecuencia-mortalidad.

Varios factores confluyen para considerar la existencia de un defecto básico en el cual está involucrada la inmunorregulación de las funciones celulares en las discrasias de células plasmáticas. Consideramos importantes las siguientes: 1) la coexistencia de inmunodeficiencia y autoinmunidad, principalmente en la macroglobulinemia de Waldenström (60); 2) las diferencias observadas en algunos estudios *in vitro* relativamente recientes (21), en cuanto al tipo de respuesta celular a mitógenos (pokeweed) en negroides y caucasoides, expresada por la generación de células para la síntesis de IgM en caucasoides y de la síntesis de IgG en negroides, lo que ha sugerido la existencia de diferencias raciales en la regulación de la respuesta inmune, que pudiera estar genéticamente determinada; 3) las diferencias de presentación, de formas clínicas y características inmunológicas de clase, observadas en numerosos estudios epidemiológicos y clínicos del mieloma múltiple y otras gammapatías malignas, de las cuales sirve de ejemplo en latinoamérica la población de El Salvador (7) con la ocurrencia de una forma peculiar de plasmocitoma extramedular de los tractos respiratorio y gastrointestinal, con posterior transformación en leucemia de células plasmáticas; 4) la frecuencia del mieloma múltiple o del mieloma

óseo solitario, en Nigeria y Uganda, en grupos de edad menor que la usual en estos casos y en áreas donde el linfoma de Burkitt es endémico, lo que hace pensar en factores etiológicos comunes en la patogenia de ambos tipos de tumores de células B (25); 5) la frecuencia con que ocurren en distintos grupos raciales, la leucemia linfocítica crónica y el linfoma de Hodgkin, y quizás también la frecuencia que hemos encontrado de gammapatías biclonales en la población venezolana, sugieren que los patrones de malignidad de las células B, en las distintas razas corresponden a diferencias de inmunoregulación que serían las que influyen sobre el tipo de enfermedad linfoproliferativa maligna que ocurre con mayor frecuencia en un grupo poblacional en un ambiente determinado. En relación a esto algunos autores han sugerido la conveniencia de hacer estudios de las subpoblaciones inmunorreguladoras de linfocitos, considerando que esto podría ayudar a delinear qué factores controlan la regulación normal y patológica de la diferenciación de los linfocitos B (8, 11, 12).

Las células B malignas pueden quizás responder a señales de regulación provenientes de células no tumorales. Se han descrito poblaciones de linfocitos T portadores de receptores Fc para el isotipo de las proteínas del mieloma, tanto en el ratón como en el hombre (24, 35, 50). Estas células se unen a la proteína del mieloma *in vivo*, haciéndose reactivas con el suero antiidiotipo. Además los resultados obtenidos con ayuda de anticuerpos monoclonales que indican una depresión de las células T cooperadoras y un aumento de las células T supresoras en el mieloma múltiple (40) pueden significar o representar una regulación anormal de las células B y T en esta enfermedad.

La existencia de factores genéticos ha sido considerada como posible determinante en la susceptibilidad a las discrasias de células plasmáticas. No se tuvo conocimiento de relación alguna de parentesco entre los individuos incluidos en este estudio, ni de la existencia de historia de la misma enfermedad entre sus familiares. Se conocen casos de familias con alta incidencia de mieloma múltiple en su seno (3, 4), también de macroglobulinemia de Waldenström, pero la demostración de susceptibilidad genéticamente determinada es realmente difícil, ya que además de las diferencias raciales, hay múltiples diferencias ambientales y es casi imposible tener poblaciones con características idénticas para hacerlas realmente comparables.

Dos complejos de genes considerados relevantes en la regulación inmune, como son el sistema HLA del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y el sistema Gm que codifica los alotipos de cadenas pesadas de IgG, han sido investigados recientemente (34), buscando asociación de los mismos con estas enfermedades linfoproliferativas, pero como resul-

tado final, solo se encontró una débil asociación del HLA B5 con susceptibilidad a mieloma múltiple y fué completamente negativo para los sistemas Gm y Km. Estos resultados del HLA conjuntamente con los datos epidemiológicos (9, 33), sugieren la existencia de factores genéticos y su influencia sobre la susceptibilidad al mieloma múltiple. En el momento actual adelantamos una investigación sobre otros polimorfismos genéticos de las proteínas séricas y su relación con las inmunoglobulinopatías.

Finalmente, es indudable la importancia de la influencia de los factores ambientales, incluyendo entre otros, agentes físico-químicos que pueden actuar como estimulantes antigénicos o supresores de la función reguladora inmune.

La casuística presentada contiene información útil, desconocida hasta el momento, sobre la frecuencia de las gammapatías malignas en Venezuela y las tasas de mortalidad por mieloma múltiple que es la entidad clínica más común. Demuestra la heterogeneidad clínica, inmunológica, etiológica y evolutiva de estas neoplasias y señala la influencia probable de factores geográficos y ambientales en esta población que presenta un patrón epidemiológico un tanto distinto al esperado a pesar de su mezcla racial con negroides y sus niveles séricos altos de inmunoglobulinas, factores éstos que han sido correlacionados con el riesgo a algunas neoplasias de células B.

La planificación, coordinación y desarrollo de estudios multidisciplinarios en esta área de investigación sería la forma de obtener mejor información y soluciones a los problemas de las gammapatías malignas, todavía tan complejos en múltiples aspectos.

Agradecimiento

Mi agradecimiento a los colegas médicos de los diferentes hospitales que me refirieron las muestras de sus pacientes, muy especialmente al Dr. José M. Guevara I., del Hospital Universitario de Caracas y a las bioanalistas Rosario Suinaga y Luz Magaly Ramírez por su excelente colaboración técnica.

ABSTRACT

Malignant monoclonal gammopathies in Venezuela. A serologic, and immunochemical study. Callango M.L. (*Centro de Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado Postal 1827, Caracas 1010-A, Venezuela*). *Invest Clín* 25(3): 155-176, 1984.— The results of a serological, biochemical and immunochemical study of 332 samples of either serum or plasma and 220 urine samples from 332 pa-

tients with malignant monoclonal gammopathies, are presented. Eighty-four per cent of the cases corresponded to monoclonal multiple myeloma, 6.3% to biconals and the remaining were non-myelomatous malignant gammopathies. The distribution of immunoglobulin classes was the following: IgG 63.1%; IgA 23.8%; IgD 1.7%; IgE 0.3%; Bence Jones 10.3%; non-secretors 0.7%. Other malignancies were 'Waldenström's macroglobulinemia 5.4% and α -chain disease, 0.9%. Seventy per cent of the urines examined contained Bence Jones proteins, 65% of which were kappa type and 35% were lambda type. Due to its selected nature, the sample was considered inadequate for estimating the incidence rates of multiple myeloma and related malignancies for Venezuela. In absence of a national registry of morbidity or morbolethality, only the mortality rates for multiple myeloma were determined, using the mortality registry of the Ministry of Health for the years 1977-1981. Low frequencies were obtained, being the age adjusted mean values, 1.61 for males and 1.36 for females, both per 100.000 inhabitants. The influence of racial, genetic and environmental factors, on the frequency of clinical types and immunological class characteristics, is discussed. The possibility of the existence of a basic defect in the immunoregulatory mechanisms of these patients, is also considered.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- AGGIO M.: Tomado de Ruiz Reyes y col. *Rev Invest Clín (Méx)*, 30: 359-365, 1978.
- 2- AKASAKI K., WASAKA H.: Frequency of lymphoreticular tumours and leukaemias in Japan. *J Natl Cancer Inst* 52: 339-343, 1974.
- 3- ALEXANDER LL., BENNINGHOFF DL.: Familial multiple myeloma. *J Natl Med Assoc* 57: 471-475, 1965.
- 4- ALEXANDER LL., BENNINGHOFF DL.: Familial multiple myeloma: final pathological finding in two brothers and a sister. *J Natl Med Assoc* 59: 278-281, 1967.
- 5- AMEIS A., KO SH., PRUZANSKI W.: M-components. A review of 1.242 cases. *Canad Med Ass J* 114: 889-895, 1976.
- 6- ANDERSON RE., ISHIDA K., LIY., ISIMARU T., NISIMAYA H.: Geographic aspects of malignant lymphoma and multiple myeloma. Select comparisons involving Japan, England, and the United States. *Am J Pathol* 61: 85-97, 1970.
- 7- ASTACIO JN., POUBLEAU V., ALFARO DA.: Plasmocitomas extramedulares de los tractos respiratorios superior y gastrointes-

tinal. Relación escleroma-plasmocitoma. Arch Coleg Med El Salvador 18: 213-248, 1965.

- 8- BLATTNER WA., JACOBSON R.J., SHULMAN G.: Multiple myeloma in South African blacks. Lancet 1: 928-929, 1979.
- 9- BLATTNER WA.: Epidemiology of multiple myeloma and related plasma cell disorders. An analytical review. In: Progress in Myeloma. Biology of Myeloma. (Michael Potter, ed.) p. 1-65, Elsevier, North Holland, Inc. New York-Oxford-Amsterdam, 1980.
- 10- BOGUE DJ.: Principles of Demography. (John Wiley and Sons, ed) p. 114, New York, Sydney, Toronto, 1969.
- 11- BRODER S., WALDMANN TA.: The suppressor cell network in cancer. N Engl J Med 299: 1281-1284, 1978.
- 12- BRODER S., WALDMANN TA.: The suppressor cell network in cancer. N Engl J Med 299: 1335-1341, 1978.
- 13- BUCKLEY CE., DORSEY FC.: Serum immunoglobulin levels throughout the life-span of healthy man. Ann Int Med 75: 673-682, 1971.
- 14- CORDIER JF.: Les gammopathies monoclonales: Etude biologique et nosologique de 1564 cas personnes. Thèse Doctorat 384 Lyon 1977.
- 15- DE SHELLY HERNANDEZ R.: La estadística aplicada a las ciencias biológicas. Editora Grafos, Caracas 1959.
- 16- DOE WF., DANON FM., SELIGMANN M.: Immunodiagnosis of alpha chain disease. Clin Exp Immunol 36: 189-197, 1979.
- 17- DREICER R., ALEXANIAN R.: Nonsecretory multiple myeloma. Am J Haemat 13: 313-318, 1982.
- 18- ENGLE RL Jr., WALLIS LA.: Immunoglobulinopathies: immunoglobulins, immune deficiency syndromes, multiple myeloma and related disorders. Charles C. Chomas, Eds. Springfield, Ill. 1969.
- 19- FAIR DS., KRUEGER RG.: Analysis of biclonal immunoglobulins and their contribution to understanding the developmental aspects of the antibody response. Contemporary Topics in Molecular Immunology 2: 51-93, 1978.
- 20- FINE JM., LAMBIN P.: Distribution of heavy chain classes and light chain types in 757 cases of monoclonal gammopathies. Biomedicine 23: 323-327, 1975.

- 21- GINSBERG WW., FINKELMAN FD., LIPSLY PE.: Circulating and mitogen induced immunoglobulins-secreting cells in human peripheral blood. Evaluation by a modified reverse hemolytic plaque assay. *J Immunol* 120: 33-39, 1978.
- 22- HOBBS JR.: Immunochemical classes of myelomatosis. *Brit J Haemat* 16: 599-606, 1969.
- 23- HOLLANDER VP., TAKAKURA K., YAMADA H.: Endocrine factors in the pathogenesis of plasma cell tumors. *Recent Prog Horm Res* 24: 81-137, 1968.
- 24- HOOVER RG., GEBEL HM., DILCKGRAEFE BK., HICKMAN S., REBBE NF., HIRAYAMA N., OVARY Z., LYNCH RG.: Occurrence and potential significance of increased number of T cells with Fc receptors in myeloma. *Immunol Review* 56: 115-139, 1981.
- 25- JACOBSON RJ., SHULMAN G., DE MOOR NG.: Solitary myeloma. A study of 10 black patients during an 8 year period. *S Afr Med J* 49: 1347-1351, 1975.
- 26- JACOBSON RJ., SHULMAN G.: Plasma cell myeloma and Waldenström macroglobulinemia in black and white South Africans. In: *Progress in Myeloma. Biology of Myeloma*. M. Potter, ed. p. 81, Elsevier-North Holland Inc. New York-Oxford-Amsterdam, 1980.
- 27- JERI A.: Tomado de Ruiz Reyes et al. *Rev Invest Clín (Méx.)* 30: 359-365, 1978.
- 28- KANO H.: Significance of M-components in plasma cell myeloma and related disorders. *Tohoku J Exp Med* 102: 341-367, 1970.
- 29- KYLE RA.: Multiple myeloma. Review of 869 cases. *Mayo Clinic Proc* 50: 29-40, 1975.
- 30- KYLE RA.: Classification and diagnosis of monoclonal gammopathies. In: *Manual of Clinical Immunology*. p. 135. Rose, N.R., Friedman, H., eds. Am Soc for Microbiol, Washington, 1980.
- 31- KYLE RA., ROBINSON RA., KATZMANN JA.: The clinical aspects of biclonal gammopathies. Review of 57 cases. *Am J Med* 71: 999-1008, 1981.
- 32- LAURELL CB., SNIGUROWICZ J.: The frequency of kappa and lambda chains in pathologic serum YG, YA, YD, YM immunoglobulins. *Scand J Haemat* 4: 46-52, 1967.
- 33- LUDWIG H., FRITZ E., FRIEDL HP.: Epidemiology and aged dependent data on multiple myeloma in Austria. *J Nat Cancer* 68: 729-733, 1982.

- 34- LUDWIG H., MAIR W.: Genetic aspects of susceptibility to myeloma. *Blood* 59: 1286-1291, 1982.
- 35- LYNCH RG., ROHRER JW., ODERMATT B., GEBEL HM., AUTRY JR., HOOVER BJ.: Immunoregulation of murine myeloma cell growth and differentiation: A monoclonal model of B cell differentiation. *Immunological Review* 48: 45-80, 1977.
- 36- MacMAHON B., CLARK DW.: The incidence of multiple myeloma. *J Chronic Dis* 4: 508-515, 1956.
- 37- MACHADO JC., JAMRA M., OKUYAMA MH., MARIGO C.: Lymphoreticular tumors in Sao Paulo. Brazil. *J Natl Cancer Inst* 50: 1651-1655, 1973.
- 38- MAS MARTIN JC.: 321 multiple myelomas studied in relation to age, race and sex in Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 30: 3-8, 1978.
- 39- McPHERDRAN P., HEATH CW Jr., GARCIA J.: Multiple myeloma incidence in Metropolitan Atlanta, Georgia: racial and seasonal variations. *Blood* 39: 866-873, 1972.
- 40- MELLSTEDT H., HOLM G., PETTERSON D., PEEST D.: Idiotype-bearing lymphoid cells in plasma cell neoplasia. *Clin Haematol* 11: 65-86, 1982.
- 41- MILNER LV., CALITZ F.: Serum immunoglobulin levels in white, asiatic, and bantu blood donors. *S Afr Med J* 45: 683-685, 1971.
- 42- MISAD O., BRANDON JG., ALBUJAR P.: Lymphoreticular tumors in Perú *J Natl Cancer Inst* 50: 1663-1668, 1973
- 43- OETTLE AG.: Lymphoreticular malignant neoplasms of the lymphoreticular tissues (200, 203, 205): a histopathological series from white, and bantu races in the Transvaal, 1949-1953. In: *Symposium on the Lymphoreticular Tumor in Africa*. p 24, Poulet, F.C., ed. S. Karger, New York, 1964.
- 44- OETTLE AG.: Lymphoreticular malignant neoplasms in South African races; mortality and morbidity studies. In: *Symposium on the Lymphoreticular Tumor in Africa* p 36, Poulet, F.C., ed. S. Karger, New York, 1964.
- 45- OHTAMI H.: Myeloma and immunoglobulins. *Jpn J Clin Path* 24: 287-293, 1976.
- 46- OSSERMAN EF.: Multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. In: *Immunological Diseases*. p. 520, Santer M., Talmage, D.W., Rose B., eds. Little Brown and Co., Boston, 1971.

- 47- OSSERMAN EF., FARHANGI M.: Plasma cell myeloma. In: Hematology. p 962, Williams, W.J., ed. McGraw-Hill, Inc., New York, 1972.
- 48- OUTERIÑO J., SANCHEZ FJ., ORTIZ MF., CALMUNTA MJ., VILLALOBOS E., CALLEJAS JL., ALVAREZ SB., LOPEZ VJ., PANIAGUA G.: Discrasia plasmocitaria no macrolulinicas. I. Análisis hematológico de 100 casos. Sangre (Barc.) 2: 296-310, 1976.
- 49- PARKER D., MALPAS JS.: Multiple myeloma. J Royal College of Physicians (London) 13: 146-153, 1979.
- 50- PREUD-HOMME JL., KLEIN M., LABAUME S., SELIGMANN M.: Idiotypic bearing and antigen binding receptors produced by blood T lymphocytes in a case of human myeloma. Europ J Immunol 7: 840-846, 1977.
- 51- PRUZANSKY W.: Clinical manifestations of multiple myeloma: relation to class and type of M' components. Can Med Assoc J 114: 896-897, 1976.
- 52- RITZMANN SE., LOUKAS D., DANIELS JC., LEVIN WC.: Idiopathic (asymptomatic) monoclonal gammopathies. Arch Int Med 135: 95-106, 1975.
- 53- RUIZ-REYES G., LANDERO de RUIZ N., ARMENTA OLVERA T., SANCHEZ FERNANDEZ M., PEREZ-SANCHEZ CL., GAMBOA OJEDA I.: Gammopatías monoclonales. I. Distribución de clases y tipos de cadenas pesadas y ligeras en 182 casos. Rev Invest Clín (Méx.) 30: 359-365, 1978.
- 54- SELIGMANN M., DANON F., HUREZ D., MIHAESCU E., PREUD' HOMME JL.: Alphachain disease: a new immunoglobulin abnormality. Science 162: 1396-1397, 1968.
- 55- SELIGMANN M., MIHAESCU E., PREUD'HOMME JL., DANON F., BROUET IC.: Heavy chain diseases: Current findings and concepts. Immunological Rev 48: 145-167, 1979.
- 56- SHAKIB F.: A quantitative study of the distribution of IgG subclass in a group of normal human sera. J Immunol Methods 8: 17-28, 1975.
- 57- SHULMAN G., STEVENS K., BERNARD DB., BOTHWELL TH., BEZWODA WR., LYNCH SR.: Serum immunoglobulins G, A and M in white and black adults of the Witwaters rand. S Afr Med J 48: 1023-1026, 1974.

- 58- STANWORTH DR.: Immunoglobulinopathies. In: Immunochemistry: an advanced Text book. p 183, Glynn LE., Stewart MW., eds. John Wiley & Sons Sussex, 1977.
- 59- WALDENSTROM JG.: Monoclonal and polyclonal hypergammaglobulinemia: Clinical and biological significance. The 1965 Abraham Flexner Lectures. Vanderbilt University Press, Nashville, 1968.
- 60- WARNER NL.: Autoimmunity and the pathogenesis of plasma cell tumor. Induction in NZB inbred and hybrid mice. Immunogenetics 12: 1-20, 1975.
- 61- WATERHOUSE JA., MUIRO O., CORREA P., POWELL J.: Cancer incidence in five continents. Vol III. Lyon, IARC Publication N° 15, 1976.
- 62- WILLIAMS RC Jr., BRUNNING RD., WOLLHEIM FA.: Light chain disease: An abortive variant of multiple myeloma. Ann Intern Med 65: 471-478, 1966.
- 62- WOLLHEIM F., SMIGUROWICZ J.: Studies on the macroglobulin of human serum. IV. The frequency of light chains types κ and λ in polyclonal and monoclonal M Scand J Haemat 4: 111-117, 1967.
-