



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**RELACION DE METODOS DE DETERMINACION  
DE COMPLEJOS INMUNES UTILIZANDO Clq**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a

**IRMA MERCEDES ROSAS MIRANDA**

México, D. F.

1 9 7 9



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LAB. TESIS 1979

ADA M. T. 309

FECHA 309

ORDEN \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

RELACION DE METODOS DE DETERMINACION  
DE COMPUESTOS INMISOS UTILIZADOS EN



F E S I S  
QUIMICO  
INMA MENDIETA RODRIGUEZ

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: Profra. Magdalena Oliva González

VOCAL: Prof. Rafael Santana Mondragón

SECRETARIO: Profra. Ma. Dolores Lastra Azpilcueta

1er. SUPLENTE: Prof. Salvador Martín Sosa

2o. SUPLENTE: Profra. Nohemí Monroy Nova

Sitio donde se desarrolló el tema: Facultad de Química

Nombre del Sustentante: Irma Mercedes Rosas Miranda

Firma del Sustentante: 

Nombre del asesor del Tema: Q.F.B. Ma. Dolores Lastra Azpilcueta

Firma del asesor: 

A MI MADRE

Profra. Estela Miranda Vda. de Rosas  
con amor y gratitud por su dedicación,  
apoyo y guía que siempre me brindó pa  
ra lograr esta meta.

A LA MEMORIA DE MI PADRE

Dr. Lorenzo Rosas Núñez

A MIS HERMANOS

Alejandro, Patricia y Blanca Estela  
quienes me brindaron apoyo y entu-  
siasmo para seguir adelante.

**A MIS ABUELITAS**

**Sra. Antonia Poblano Vda. de Miranda**

**Sra. Teodora Núñez Vda. de Rosas**

**A MI MADRINA**

**Profra. Rosa María Miranda Poblano  
con cariño**

**A MIS TIOS Y TIAS**

**Quienes me alentaron para  
seguir adelante**

**A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS**

A LA FACULTAD DE QUIMICA

A TODOS MIS PROFESORES

A LA PROFRA. Q.F.B. Ma. Dolores Lastra A.

Por la ayuda que me brindó para realizar esta tesis.

AL HONORABLE JURADO

## I N D I C E

|  | Pág.   |
|--|--------|
| CAPITULO PRIMERO . . . . .   | 1      |
| GENERALIDADES . . . . .  | 2      |
| I. Enfermedad Autoinmune. . . . .  | 2      |
| II. Patogénesis de Enfermedades Autoinmunes. . . . .   | 4      |
| III. Complejo Inmune . . . . .   | 7      |
| IV. Importancia de la Determinación de Complejos Inmunes. . . . .                                  | 9      |
| <br>CAPITULO SEGUNDO . . . . .   | <br>11 |
| PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DEL SUBCOMPONENTE Clq DEL COMPLEMENTO HUMANO. . . . .                | 12     |
| I. Estructura, Composición Química y Actividad Biológica. . . . .                                  | 13     |
| II. Métodos de Purificación. . . . .   | 20     |
| III. Fundamentos para la Utilización de Clq en la Determinación de Complejos Inmunes . . . . .     | 23     |
| <br>CAPITULO TERCERO. . . . .  | <br>28 |
| METODOS DE DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES QUE UTILIZAN Clq . . . . .                           | 29     |
| I. Difusión en Gel (Método de Agnello). . . . .  | 29     |
| II. Enlazamiento a Clq en Fase Sólida. Usando diferentes moléculas como sistema indicador. . . . . | 32     |

|   | Pág.           |
|---|----------------|
| i) Agregados de IgG-I <sup>125</sup> . . . . .  | 32             |
| ii) Proteína A-I <sup>125</sup> . . . . .   | 37             |
| III. Precipitación Selectiva con Polietilen-<br>glicol. . . . .   | 40             |
| IV. Enlazamiento a Clq por Inhibición Compe-<br>titiva. Prueba de Desviación . . . . .                          | 46             |
| i) Eritrocitos de carnero sensibilizados.   | 46             |
| ii) Agregados insolubles de IgG. . . . .  | 52             |
| <br>CAPITULO CUARTO. . . . .  | <br>55         |
| DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES SOLUBLES<br>UTILIZANDO LATEX CUBIERTO DE GAMMA GLOBULINA<br>HUMANA . . . . . | <br><br><br>56 |
| I. Fundamento. . . . .  | 56             |
| II. Materiales y Métodos. . . . .   | 60             |
| III. Condiciones del Ensayo . . . . .   | 66             |
| IV. Determinación de Complejos Inmunes.. . . .  | 69             |
| V. Cálculos. . . . .  | 71             |
| <br>CONCLUSIONES. . . . .   | <br>76         |
| RESUMEN. . . . .  | 79             |
| BIBLIOGRAFIA . . . . .  | 80             |

C A P I T U L O   P R I M E R O  
GENERALIDADES

- I. ENFERMEDAD AUTOINMUNE
- II. PATOGENESIS DE ENFERMEDADES  
AUTOINMUNES
- III. COMPLEJO INMUNE
- IV. IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE  
COMPLEJOS INMUNES

## GENERALIDADES

En la Inmunología Fundamental, durante la última década, se han presentado gran cantidad de descubrimientos. Una de las áreas clínicas que se ha estudiado con amplitud, es la relacionada a las enfermedades asociadas con errores inmunológicos. Existen varias enfermedades de etiología desconocida a las cuales la moda actual de diagnóstico ha designado como condiciones de autoinmunidad o infecciones por virus lentos. Estos estados patológicos se interpretan como condiciones en las que el tabú normal de la acción inmunológica contra células u otros componentes normales del cuerpo, se altera. (4) Ejemplos donde el fenómeno autoinmune es notable, incluye enfermedades tales como artritis reumatoide, anemia perniciosa, tiroiditis de Hashimoto, diabetes, lupus eritematoso diseminado, etc.

### I. ENFERMEDAD AUTOINMUNE

Una enfermedad autoinmune se ha definido como -- aquella, en la cual un autoanticuerpo (anticuerpos formados contra componentes propios) o linfocitos sensibilizados reaccionan contra tejidos propios. (11)

Generalmente el término de enfermedad autoinmune

se aplica a aquellos casos donde puede ser demostrado que el proceso autoinmune contribuye a la patogénesis de la enfermedad, a diferencia de aquellas situaciones donde aparentemente los autoanticuerpos son formados después de que el tejido ha sido dañado. (24)

Las reacciones autoinmunes pueden ser mediadas - tanto por anticuerpos como por células. Todos los mecanismos que causan reacciones alérgicas a antígenos extraños - pueden participar en las enfermedades autoinmunes.

a). Autoanticuerpos que actúan directamente sobre células con o sin actividad del complemento.

b). Complejos inmunes que forman agregados, los cuales se localizan depositados en las membranas o circulando en los fluidos biológicos, contribuyendo así a los procesos inflamatorios por activación del complemento.

c). No se ha demostrado que los linfocitos sensibilizados sean causa de enfermedad en humanos, pero están presentes en infiltrados mononucleares muy notables en muchos desórdenes autoinmunes (gastritis atrófica en anemia perniciosa, tiroiditis, encefalomiелitis alérgica, etc.).- (6, 24).

## II. PATOGENESIS DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Estudios recientes indican que los mecanismos de patogénesis en enfermedad autoinmune, se deben a deficiencias generalizadas o selectivas de la respuesta inmune, -- más que a una hiperactividad de la misma. También se sabe que el factor genético tiene un papel importante. (11,24).

Se piensa que los mecanismos que modifican la -- respuesta inmune sustituyen el paso de cooperación entre - células T y B, por medio del cual las células B son estimu ladas para la formación de anticuerpos. (24).

Los mecanismos aceptados actualmente como modifi cadores de la respuesta inmune implican los fenómenos si-- guientes:

### a) Modificación de la molécula.

Este es un mecanismo que postula la aparición de determinantes potencialmente antigénicos sobre un nuevo -- acarreador. Lo cual se debe a defectos en la síntesis o en la degradación lisosomal obteniéndose productos que exponen nuevos grupos. Esta modificación, puede producirse también a través de la combinación con drogas. Por ejemplo, en ane mia hemolítica se ha visto que la administración de alfa - metil dopa contribuye a la modificación de la superficie - de los glóbulos rojos, de tal manera que provee un acarrea dor que estimula células B, las cuales reconocen el antíge no Rheusus e.

b) Reacciones Cruzadas

La presencia o ausencia de antígenos de reacción cruzada puede ser determinada por mecanismos genéticos.

Este tipo de antígenos, presentes en algunos microorganismos favorecen la formación de anticuerpos que -- reaccionan contra el tejido del huésped. Lo cual puede -- constituir una forma importante para inducir autoinmunidad.

Un ejemplo de determinantes autoantigénicos presentes en antígenos exógenos, se tiene en la colitis ulcerativa, donde los anticuerpos contra colón reaccionan también contra Escherichia coli 014.

c) Interacción de microorganismos con el complejo mayor de histocompatibilidad.

Los microorganismos que no presentan reacciones cruzadas podrían crear nuevos acarreadores para antígenos potenciales en la superficie celular por interacción con el complejo mayor de histocompatibilidad sobre la membrana. Se ha notado que el desarrollo de virus en asociación con este complejo provoca una respuesta vigorosa de las células T del huésped, promoviendo una reacción contra componentes celulares preexistentes.

d) Microorganismos como adyuvantes.

Algunos microorganismos pueden actuar como adyuvantes, ya que poseen constituyentes tales como glicolípi-

dos y endotoxinas, los cuales pueden actuar suministrando la señal inductiva para la estimulación de células B, ignorando la cooperación de células T, por interacción directa con el linfocito B e indirectamente estimulando la secreción de factores no específicos de células T o macrófagos.

e) Sistema Linfoide anormal.

La generación de linfocitos autoreactivos se presentaría si fallara el mecanismo de inducción de tolerancia. Esto puede ocurrir en algunos casos a través de la mutación somática o infección del sistema linfoide por un virus.

Si la mutación somática se presenta, debe afectar algunos de los aspectos generales de la fisiología celular linfoide a nivel de células precursoras más que a nivel de células T y B específicas, ya que las respuestas de anticuerpos no son monoclonales y frecuentemente se presentan en el mismo individuo afectando antígenos no relacionados. (24)

Se sugiere que estos mecanismos pueden explicar la patogénesis de enfermedad autoinmune, ya sea debida a deficiencia generalizada o selectiva de la respuesta inmune o a su hiperactividad.

La evidencia epidemiológica sugiere también que-

estas anomalías pueden presentarse en cada caso de enfermedad y los defectos producidos pueden variar de una enfermedad a otra.

### III. COMPLEJO INMUNE

La introducción de material extraño (antígeno) - en el cuerpo induce la formación de proteínas específicas (anticuerpo), las cuales se unen a los antígenos con el fin de eliminarlos. La combinación del antígeno con el anticuerpo forma lo que se conoce como complejo inmune.

Estos complejos antígeno-anticuerpo o complejos-inmunes son eliminados rápidamente de la circulación por el sistema fagocítico, pero si permanecen circulando, pueden depositarse en membranas basales vasculares, iniciando una reacción inflamatoria, involucrándose así, en la patogénesis de enfermedad autoinmune, inflamatoria y en procesos malignos.

Para determinar si los complejos inmunes participan en la patogénesis de estas enfermedades se consideran varios criterios.

- a) Conocer el antígeno involucrado.
- b) Demostrar que los complejos inmunes están presentes en el suero.

- c) Demostrar que los antígenos y los anticuerpos circulantes son idénticos a los presentes en el tejido involucrado.
- d) Dar evidencias de que los complejos inmunes son patogénicos.
- e) Demostrar que las condiciones clínicas varían con la concentración de complejos inmunes circulantes.

Los complejos inmunes circulantes son generalmente solubles, mayores de 19S, con peso molecular de  $10^6$  daltones, no son fagocitados rápidamente y circulan en exceso ligero o moderado del antígeno.

La eliminación de los complejos inmunes depende de la concentración de complemento con que se cuente sobre la región intacta de la inmunoglobulina en el complejo y de su adherencia al endotelio vascular, ya que esto influye para el reconocimiento por el sistema fagocítico mononuclear. Debido a que los complejos inmunes no se adhieren rápidamente al endotelio vascular, permanecen en la circulación, lo que les permite volverse patogénicos. La sedimentación de los complejos inmunes en las membranas basales es consecuencia de su permanencia prolongada en la circulación y de la anatomía de la circulación local, de tal manera, sitios como glomérulos, plexos coroides, piel, membranas sinoviales, tienen en común un flujo sanguíneo alto

por unidad de masa, lo que produce un ultrafiltrado que le da el potencial para atrapar grandes cantidades de complejos inmunes implicando un alto riesgo de desórdenes autoinmunes en el hombre. Así el depósito de complejos inmunes en membranas basales aumenta la permeabilidad local vascular por efecto de aminas vasoactivas liberadas, causando daño endotelial, produciendo isquemia, trauma, inflamación, etc. (2)

#### IV. IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES

La importancia de los complejos inmunes en enfermedades autoinmunes, ha llevado a la búsqueda de métodos para su cuantificación. Una variedad de métodos de sensibilidad y confianza variables se han usado para detectarlos y cuantificarlos en fluidos biológicos. Desafortunadamente los métodos hasta ahora diseñados presentan ciertas dificultades, ya que una sola técnica no serviría para detectar complejos inmunes de diferentes tipos y comportamiento con respecto a la activación de complemento, enlazamiento a Clq y receptores celulares.

La presencia de crioglobulinas, factor reumatoide y complejos específicos antígeno-anticuerpo, (ADN-anti-ADN) son evidencia de la presencia de complejos inmunes. Pero no los demuestran cuantitativamente.

Los métodos que se han utilizado para determinar complejos inmunes se basan en sus propiedades específicas, e incluyen, consumo de complemento hemolítico total o de uno de sus componentes individuales, actividad anticomplementaria, enlazamiento a Clq, enlazamiento a factor reumatoide, unión a receptores celulares C3, receptores Fc y la inhibición de fagocitosis. (2)

Estos métodos solamente se han utilizado en laboratorios de investigación, pero existe la necesidad de llevarlos al laboratorio clínico.

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión de los métodos existentes para la determinación de complejos inmunes donde se ha utilizado la propiedad de éstos para unirse al subcomponente Clq del complemento humano y presentar el diseño de un método que creemos puede ser realizable y aprovechable para la detección de dichos complejos.

C A P I T U L O     S E G U N D O

PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DEL SUBCOMPONENTE  
C1q DEL COMPLEMENTO HUMANO

- I. ESTRUCTURA, COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.
- II. METODOS DE PURIFICACION.
- III. FUNDAMENTOS PARA LA UTILIZACION DEL SUBCOMPONENTE C1q EN LA DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES.

PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DEL SUBCOMPONENTE  
C1q DEL COMPLEMENTO HUMANO

Existen en la sangre de los vertebrados sistemas enzimáticos esenciales para su sobrevivencia; cuyo funcionamiento depende de la activación secuencial de una serie de enzimas proteolíticas. De estos sistemas, uno de los más importantes y complejos es el Complemento. (22)

El sistema complemento comprende un grupo complejo de proteínas, que actuando junto con anticuerpos y otros factores, tiene un papel importante como mediador tanto de respuesta inmune como alérgica. (17)

Cerca de veinte proteínas séricas participan en este sistema, la mayoría son parte de la secuencia de activación en sus dos vías (clásica y alterna), pero además se incluyen proteínas de control, las cuales inhiben diferentes pasos o inactivan a algunos de los componentes. (21,22)

Las proteínas del sistema complemento son designadas con la letra C y por los números: C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9. La proteína C1 se considera actualmente, como un conjunto de subunidades designadas C1q, C1r, C1s, cuya integridad depende de la presencia del ión  $Ca^{++}$ . Se ha mencionado la existencia de un cuarto subcomponente de C1,

al cual se ha llamado Clt, (20,30), pero recientemente se descubrió que esta substancia no contribuye a la actividad lítica del sistema complemento. (21,19)

Los números designados a las proteínas, reflejan la secuencia en la cual son activados, con excepción de la proteína C4, la cual reacciona después de C1 y antes de -- C2. (17)

Para el presente trabajo, la proteína que nos interesa conocer es el subcomponente Clq.

## I. ESTRUCTURA, COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD BIOLOGICA

El subcomponente Clq es una glicoproteína termolábil, se encuentra en el suero a una concentración de -- 190µg/ml, tiene un coeficiente de sedimentación 11S, peso molecular 400 000 daltones y movilidad electroforética en la región gamma lenta. (24,6)

### Estructura

La estructura y composición química de la molécula de Clq se determinó por microscopía electrónica y por -- diferentes técnicas de análisis como electroforesis y cromatografía.

Se encontró que está formada por tres tipos de -

cadenas peptídicas, seis de cada tipo, designadas como A, B, C. Cada cadena tiene una porción, cuya secuencia peptídica y glucosídica es similar a la que presenta la molécula de la colágena, proteína principal del tejido conectivo.

Estas cadenas se unen por enlaces disulfuro, para formar 6 subunidades A-B y 3 subunidades C-C. Una triple hélice se forma por unión no covalente de la región colágena de una cadena del dímero C-C y la región colágena de un dímero A-B; de esta manera se forman tres pares de triple hélice. La asociación de estos tres pares, unidos por enlaces no covalentes, dan la estructura hexamérica de seis cadenas y seis cabezas globulares. Estas cabezas globulares se forman a partir de la mitad terminal de cada triple hélice. Este arreglo coincide con la estructura vista con microscopía electrónica, donde la molécula de Clq, semeja un ramo de seis tulipanes con la mitad inferior del tronco unida y la mitad superior ramificada, para dar seis ramas separadas, cada una de las cuales esta unida a una flor. (21, 22, 15, 23).

Las dimensiones de la molécula estimada por estudios de microscopía electrónica son las siguientes: subunidad central  $45\overset{\circ}{\text{Å}} \times 112\overset{\circ}{\text{Å}}$ ; subunidades periféricas, cabezas globulares  $50\overset{\circ}{\text{Å}} \times 70\overset{\circ}{\text{Å}}$ , cadenas conectantes  $15\overset{\circ}{\text{Å}} \times 115\overset{\circ}{\text{Å}}$ ; la altura de la molécula vista lateralmente es de  $300\overset{\circ}{\text{Å}}$  y su diámetro total se calcula entre  $350\overset{\circ}{\text{Å}} - 400\overset{\circ}{\text{Å}}$ . (figura 1). (22, 15)

Cadenas 6A + 6B + 6C

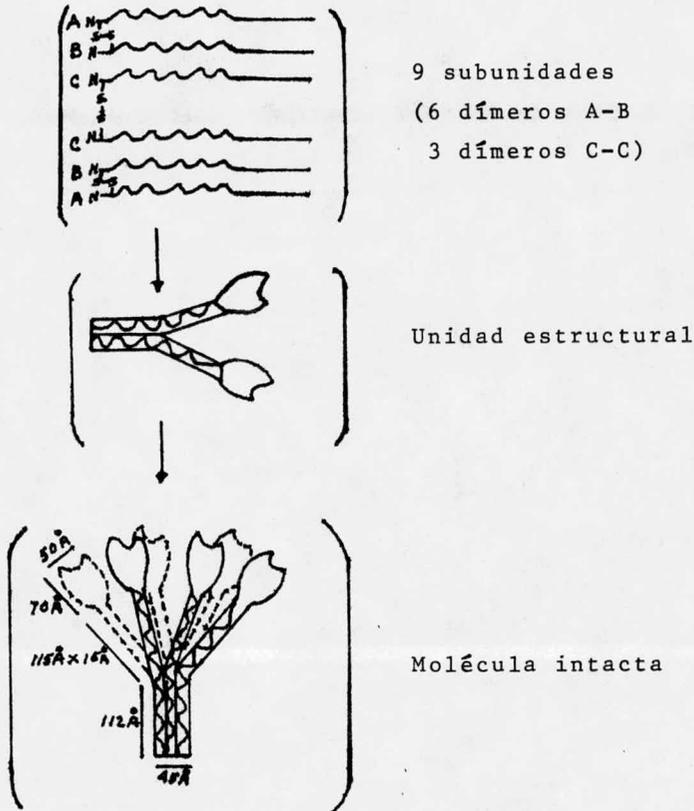


Figura 1. Estructura de la molécula de Clq. Las dimensiones son promedios tomados de la literatura, estimados por estudios de microscopía electrónica. (22)

### Composición Química

Estudios analíticos muestran que cada una de las cadenas peptídicas A, B, C, contienen cerca de 190 residuos aminoácidos; 12, 8, 4% de carbohidratos respectivamente y un peso molecular aproximado a 23 000 daltones. (23)

El Clq tiene una constitución peptídica muy singular; la cual está determinada por concentraciones altas de glicina, hidroxiprolina e hidroxilisina. En su contenido de carbohidratos posee cantidades equimoleculares de glucosa y galactosa.

La secuencia de aminoácidos en los tres tipos de cadenas es similar y cada una tiene cerca de 80 residuos aminoácidos, cuya secuencia es semejante a la que presenta la molécula de la colágena. Esta porción está situada entre el extremo N-terminal y la parte media de cada cadena. La similaridad a la molécula de la colágena se ve incrementada por la presencia del disacárido glucosil-galactosil que sustituye residuos de hidroxilisina en la secuencia peptídica. Esta porción también tiene la característica de ser inactivada por la colagenasa. (22)

Las tablas 1 y 2 muestran una relación del contenido peptídico y de carbohidratos, encontrados para la molécula de Clq, obtenida por diferentes métodos de purificación y una recopilación de datos obtenidos en la literatura. (15)

TABLA 1. Composición de aminoácidos del Clq humano.

A: Clq purificado por el método del ADN.

B: Clq purificado por el método de precipitación a fuerza iónica baja.

C: Promedio de datos reportados en la literatura. (15)

---

| Aminoácidos<br>(residuos por 1000) | A     | B     | C     |
|------------------------------------|-------|-------|-------|
| Lisina                             | 37.9  | 33.2  | 37.9  |
| Hidroxilisina                      | 25.2  | 25.7  | 18.9  |
| Histidina                          | 19.5  | 17.1  | 14.6  |
| Arginina                           | 43.0  | 41.8  | 43.5  |
| Prolina                            | 57.6  | 62.3  | 65.0  |
| Hidroxiprolina                     | 50.2  | 48.6  | 44.9  |
| Acido aspártico                    | 77.3  | 82.5  | 80.7  |
| Treonina                           | 62.3  | 50.5  | 53.9  |
| Serina                             | 58.8  | 50.6  | 51.0  |
| Acido glutámico                    | 96.2  | 99.0  | 90.1  |
| Glicina                            | 175.5 | 175.6 | 174.9 |
| Alanina                            | 41.1  | 42.8  | 43.7  |
| Cistina                            | 13.4  | 14.4  | 19.2  |
| Valina                             | 43.0  | 59.2  | 57.0  |
| Metionina                          | 18.3  | 17.0  | 20.0  |
| Isoleucina                         | 40.0  | 41.4  | 40.8  |
| Leucina                            | 64.7  | 60.8  | 62.3  |
| Tirosina                           | 30.6  | 33.8  | 33.2  |
| Fenilalanina                       | 45.3  | 44.1  | 43.5  |

---

TABLA 2. Composición de Carbohidratos del Clq humano purificado por el método del ADN y analizado por cromatografía gas-líquido. (15)

| Carbohidratos          | % (p/p) |
|------------------------|---------|
| Fucosa                 | 0.6     |
| Manosa                 | 0.53    |
| Galactosa              | 2.3     |
| Glucosa                | 2.5     |
| N-acetil-glucosamina   | 1.0     |
| N-acetil-galactosamina | 0.63    |
| Acido siálico          | 0.4     |
| TOTAL                  | 7.96    |

### Actividad Biológica

El componente Cl se encuentra en el suero como una asociación débil de Clq con un complejo tetramérico --  $Clr_2-Ca^{++}-Cl_s_2$ . La unión a este complejo tetramérico se efectúa a través de la subunidad central de Clq y es estabilizada por el ión  $Ca^{++}$ .

La interacción entre Cl y las inmunoglobulinas de complejos antígeno-anticuerpo, a través del Clq, es el evento que activa la secuencia del sistema complemento. -- (21, 22)

El Clq se une por medio de sus fragmentos globulares a la porción Fc de la región no variable de la cade-

na H de la inmunoglobulina. Esta unión se favorece por el cambio conformacional que sufre la molécula de anticuerpo al combinarse con su antígeno. (3)

La molécula de Clq es multivalente para unirse a inmunoglobulina G (IgG) (5 moléculas de IgG por molécula de Clq) y monovalente para inmunoglobulina M (IgM). Se ha demostrado que para el caso de IgG se requieren dos moléculas como número mínimo para activar Clq. (6,14). Esta diferencia en el número de sitios enlazantes de Clq sobre la molécula de inmunoglobulina sugiere que las regiones múltiples Fc de la molécula de IgM inducen una conformación más apropiada para generar el sitio de fijación de Clq. (3,13)

Sobre bases moleculares se sabe que IgM es 18 veces más efectiva para unir Clq, pero en humanos se cuenta con que el 70% de las inmunoglobulinas presentes en suero normal son IgG. Por lo cual en el sistema biológico IgG tiene una mejor captación de Clq, ya que se encuentra en mayor concentración (26). Existen clases y subclases de inmunoglobulinas que no reaccionan con Clq. Solamente IgM y las subclases IgG-1, IgG-2, IgG-3, pueden activar la secuencia completa del sistema complemento; mientras que anticuerpos de las clases IgA, IgD, IgE y subclase IgG-4, no activan los pasos iniciales de la cascada del complemento, ya que no reaccionan con Clq, aunque se cree que IgA e IgE

pueden activar este sistema por su vía alterna. (6, 3).

El Clq posee actividades antigénicas que dependen de la estructura intacta de la molécula, esta propiedad ha servido para la preparación de suero anti Clq, el cual ha sido de gran utilidad para estudios bioquímicos. - (32)

## II. METODOS DE PURIFICACION DEL SUBCOMPONENTE Clq.

Entre los métodos utilizados para la purificación del subcomponente Clq, dos de los más comunmente utilizados son: el método del ADN (Agnello, 1969) y el método de precipitación a baja fuerza iónica (Yonemasu y Stroud, 1971).

### Método del ADN. (1)

Con este método se aísla el Clq de suero humano-normal o de plasma recalificado por precipitación con ADN.

El suero se dializa durante una noche contra solución amortiguadora EDTA 0.01M, veronal o TRIS 0.025M, pH 8.6. La cantidad óptima de ADN utilizada es de 25µg/ml de suero, la cual se adiciona al suero dializado, con agitación continua a temperatura ambiente durante una hora. Se deja en reposo a 4°C durante 24 horas y se centrifuga a --

1000g durante 30 minutos, el precipitado obtenido se lava-cuatro veces con amortiguador veronal sódico 0.025M, pH --8.6 y finalmente se resuspende en amortiguador fosfatos --0.025M, NaCl 0.05M, MgCl<sub>2</sub> 0.003M. El pH se ajusta a 6.9 - con HCl 1N y se adicionan 100 µg de DNAsa/ml de suspensión, la cual se agita durante 3 horas a temperatura ambiente y se dializa contra el amortiguador de resuspensión hasta --que se disuelve la mayor parte del precipitado. La solu--ción se centrifuga a 100 000g durante 30 minutos. El so--brenadante contiene aproximadamente 70% de Clq; éste se pu-rifica por cromatografía en columna usando Sephadex G-200-en amortiguador de fosfatos 0.3M, pH 5.3, con lo cual se -separa la DNAsa y los productos de la digestión. El mate-rial purificado en la columna contiene más del 90% de Clq.

#### Método de Precipitación a Baja Fuerza Iónica. (32)

Este método aprovecha la solubilidad mínima que-presenta el Clq en soluciones de baja fuerza iónica, para-aislarlo y purificarlo. Las precipitaciones repetidas en presencia de agentes quelatantes, eliminan el Clr y el Cls, con lo cual el Clq es aislado del complejo Cl.

El suero fresco se dializa contra amortiguador -EGTA 0.026M, pH 7.5, fuerza iónica 0.03; durante 4 horas a 4°C.- El amortiguador se cambia y la diálisis se continúa por 11 horas más. Después de la diálisis, se separa el precipita

do, se lava una vez con el mismo amortiguador EGTA y se disuelve en amortiguador acetado 0.02M, NaCl 0.75M conteniendo EGTA 0.01M, pH 5.0, fuerza iónica 0.08. Los agregados-insolubles se eliminan por centrifugación. La solución -- clara se dializa contra amortiguador EDTA 0.06M, pH 5.0, - fuerza iónica 0.065, durante 4 horas a 4°C. El contenido- de la bolsa de diálisis se centrifuga, y el precipitado se lava y disuelve en amortiguador fosfatos 0.005M, NaCl - 0.75M conteniendo EDTA 0.01M, pH 7.5, fuerza iónica 0.080, se centrifuga otra vez para eliminar agregados insolubles. La solución clara se dializa contra amortiguador EDTA -- 0.035M, pH 7.5, fuerza iónica 0.069, durante 5 horas a 4°C. Después de la diálisis el precipitado se separa por centrifigación y se lava una vez con la misma solución de EDTA y entonces se redisuelve en amortiguador acetato 0.025M, NaCl 0.75M conteniendo EDTA 0.01M, pH 7.5, fuerza iónica 0.080. El rendimiento de esta última preparación es de un 68% de- Clq puro.

Este método lo recomiendan sus autores, ya que - no requiere purificación en columna, procedimiento en el - cual puede producirse cierta pérdua de la actividad biológica de la proteína.

### III. FUNDAMENTOS PARA LA UTILIZACION DEL Clq EN LA DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES

Los primeros estudios que se realizaron acerca de las interacciones entre el sistema complemento y complejos antígeno-anticuerpo, mostraron que un componente termolábil, era el causante de la precipitación de tales complejos, debido a que aumentaba su insolubilidad. Posteriormente se descubrió que el causante del comportamiento de estas moléculas era el subcomponente Clq.

Se sabe que la eficiencia relativa de fijación a Clq de anticuerpos IgM es mayor que para anticuerpos IgG. Esta unión se ve afectada por el estado físico del antígeno presente en el complejo antígeno-anticuerpo.

Estudios sobre esta fijación utilizando antígenos solubles (substancia A), antígenos particulados (eritrocitos humanos tipo A) y el componente Cl revelan que los complejos antígeno soluble-IgM, presentan menor fijación a Cl al compararse sobre bases molares con la fijación obtenida con complejos antígeno soluble-IgG. Este hecho no parece depender de la actividad de Cl sino más bien, de los cambios estructurales o distorsión en la porción Fc de la molécula de anticuerpo al interactuar con el antígeno. Debido a que la unión de Cl a los complejos antígeno soluble-IgM se presenta en la zona de exceso de an-

ticuerpo, esto mismo puede impedir la estructuración adecuada de la porción Fc para dicha unión. En cambio para complejos antígeno soluble -IgG, la fijación óptima se presenta en la zona de equivalencia de la relación antígeno-anticuerpo. De aquí se ha estimado que la cantidad de anticuerpos en forma de complejo, representa el porcentaje de anticuerpo que fija Cl.

También se tiene evidencia de que la actividad para fijar Cl por anticuerpos IgG es comparable para los dos sistemas utilizados, mientras que los anticuerpos IgM sobre la superficie celular son más efectivos que aquellos combinados con antígenos solubles. (13)

Otro conocimiento importante es la capacidad relativa de diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas en diferentes estados de agregación para enlazar el subcomponente Clq. Lo cual sugiere que el grado de polimerización es un factor importante para el comportamiento de estas proteínas.

El mecanismo aceptado para explicar el incremento en la fijación de Clq por Ig agregadas, implica que al agregarse, se aumenta el número y la proximidad de las regiones Fc de estas moléculas, creando condiciones más favorables para el enlazamiento.(3,26). Esto se ha inferido en base al conocimiento de que el hecho de agregar Ig por

calentamiento involucra la formación de enlaces disulfuro- y enlaces no covalentes, en la región Fab y no altera las propiedades enlazantes de la región Fc. (26)

Se ha reportado que el subcomponente Clq reacciona en forma muy favorable con agregados de gran tamaño - - (19S - 22S). Una temperatura para agregar de 61°C y un -- tiempo prolongado de incubación (40 minutos), produce preparaciones homogéneas de agregados de gran tamaño y en -- cierto grado reduce la avidez de estas moléculas por el -- Clq, lo cual para ciertas condiciones prácticas es de utilidad. (29).

Entre los factores de importancia que influyen - en la fijación de Clq están también la temperatura y la -- fuerza iónica.

Experimentos de fijación de Cl por complejos antígeno-anticuerpo (eritrocitos cubiertos con DNP (dinitrofenilo)-IgG anti DNP), muestran que a una temperatura de - 37°C, solamente se efectúa un enlazamiento débil y que datos de utilidad práctica se obtienen en un rango de temperatura entre 0°C y 19°C. Además este comportamiento está en función de la fuerza iónica.

Para estas temperaturas se ha reportado que un - rango de fuerza iónica entre 0.09 y 0.15 es válido para la unión de Cl a complejos antígeno-anticuerpo.

Estos estudios indican también que la disminución en la fijación de Cl, al aumentar la fuerza iónica, se produce por la disminución del número de sitios enlazantes en los complejos, pero sin alterar la constante de afinidad de Cl.(31). En esto hay discrepancia, ya que recientemente se reporta que el enlazamiento del subcomponente - Clq a complejos albúmina DNP-IgG anti DNP aumenta en forma significativa al reducir la fuerza iónica del medio, pero esto se debe a un incremento en el valor de la constante de afinidad sin afectar el número de sitios enlazantes sobre los complejos.(12). Los autores no dan una explicación a esta discrepancia.

Se sabe además que los enlaces primarios de la interacción Clq-anticuerpo son de carácter iónico, por lo cual es necesario que estos factores se mantengan en niveles bajos, para el mejor desarrollo de la unión.

El Clq tiene la característica de unirse a polianiones y policationes y se ha demostrado que el complemento es activado a través de la vía clásica cuando estos polianiones (sulfato de dextrán, polilisina, ácido poliglutámico, ADN, lipopolisacáridos), se adicionan al suero.(12) Por el hecho de reaccionar tanto con aniones como con cationes se postula que Clq tiene cargas negativas y positivas en sus sitios de enlace y los polianiones deben tener -

sitios de enlace muy similares a los sitios de las inmunoglobulinas.

El conocimiento de estas propiedades del subcomponente Clq, han servido como base en la utilización de esta molécula para la detección de inmunoglobulinas alteradas y de complejos solubles antígeno-anticuerpo, en fluidos biológicos de pacientes con enfermedades donde estas moléculas parecen ser las responsables de lesiones inflamatorias severas y daño de tejidos.

## C A P I T U L O    T E R C E R O

### METODOS DE DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES QUE UTILIZAN C1q

- I. DIFUSION EN GEL (METODO DE AGNELLO).
- II. ENLAZAMIENTO A C1q EN FASE SOLIDA. USANDO DIFERENTES MOLECULAS COMO SISTEMA INDICADOR.
  - i) Agregados de IgG-I<sup>125</sup>
  - ii) Proteína A-I<sup>125</sup>
- III. PRECIPITACION SELECTIVA CON POLIETILENGLICOL.
- IV. ENLAZAMIENTO A C1q POR INHIBICION COMPETITIVA. PRUEBA DE DESVIACION.
  - i) Eritrocitos de carnero sensibilizados.
  - ii) Agregados insolubles de IgG.

MÉTODOS DE DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES  
QUE UTILIZAN Clq

El interés en la determinación de complejos inmunes solubles, ha traído como consecuencia, el diseño de métodos con un fin diagnóstico y hasta ahora solamente con aplicación en investigación.

Son varios los métodos propuestos que utilizan la propiedad de subcomponente Clq del complemento de unirse a complejos inmunes solubles. Mencionaremos aquí, los métodos representativos de este tipo de unión.

I. DIFUSION EN GEL (METODO DE AGNELLO). (1)

Este método está basado en la reacción de precipitación que se efectúa entre el subcomponente Clq y agregados de inmunoglobulinas o entre Clq y complejos inmunes solubles.

La precipitación óptima se presenta en placa de agarosa 0.6% en EDTA 0.01M, pH 7.2, fuerza iónica 0.09, -- temperatura 22°C y 0°C, tiempo 48 y 72 horas respectivamente. (Tabla 3, figura 2).

Las condiciones de la placa se deben a la mayor-

TABLA 3. PRECIPITACION DE COMPLEJOS INMUNES CON Clq

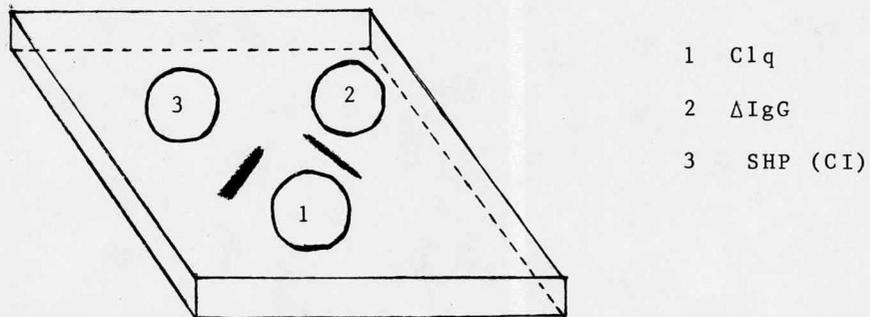


FIGURA 2. Placa agarosa al 0.6% en EDTA 0.01M a 22°C, 48 horas

---

|          |  |
|----------|--|
| Clq      | subcomponente del complemento                  |
| ΔIgG     | inmunoglobulina G agregada                     |
| SHP (CI) | suero humano problema con<br>complejos inmunes |

difusibilidad que presenta el Clq en agarosa y al mejoramiento de la precipitación en presencia de EDTA. La reacción se efectúa solamente con agregados de inmunoglobulinas mayores de 19S y con complejos inmunes formados con 2 a 20 veces el antígeno en exceso. Además no se produce precipitación con inmunoglobulinas monoméricas de ninguno de los subgrupos.

Para la realización de este método se han utilizado complejos inmunes ASH (albúmina sérica humana)-IgG anti ASH, agregados de inmunoglobulinas, sueros de pacientes con lupus eritematoso diseminado (LED) y flúidos articulares de pacientes hipocomplementémicos con artritis reumatoide (AR).

La reducción y alquilación (2-mercaptoetanol y yodoacetamida) de flúidos articulares activos y de agregados de IgG eliminan la posibilidad de que precipiten con Clq. Se presentan interferencias en la reacción de precipitación cuando existen concentraciones altas de ADN, las cuales pueden ser eliminadas por tratamiento con DNAsa (desoxirribunocleasa). En flúidos articulares de interferencia por ADN, puede ser diferenciada de aquellas que presentan los agregados de inmunoglobulinas, por persistencia de la reacción positiva, después de reducción y alquilación.

La precipitación inespecífica de agregados de inmunoglobulinas, no se pueden diferenciar de las que producen complejos inmunes. En pacientes con LED se ha encontrado que además de complejos inmunes, existen otras sustancias desconocidas que también interactúan con Clq.

En vista de estos inconvenientes, los autores -- del método, proponen, que éste debe ser usado en conjunto con otros procedimientos que ayuden a definir las propiedades de las sustancias activas involucradas. Sin embargo, este método ha probado su utilidad en la selección de sueros y otros fluidos biológicos, para determinar la presencia de complejos inmunes de carácter desconocido. La sensibilidad del método, para complejos inmunes, es de 50 a -- 100µg/ml de suero.

## II. ENLAZAMIENTO A Clq EN FASE SOLIDA

### i) Agregados de IgG-I<sup>125</sup> como molécula indicadora

Este método describe un radioinmunoensayo basado en la competencia por enlazamiento de complejos inmunes y agregados de IgG-I<sup>125</sup> al subcomponente Clq humano purificado.

Para la preparación de la fase sólida, el Clq purificado se adsorbe y fija a la superficie de tubos de poliestireno por incubación durante una hora a 22°C, en amor

tiguador TRIS HCl pH 8.1, fuerza iónica 0.15.

Una vez preparada la fase sólida, se añaden 5µl de suero humano problema (SHP), IgG agregada o complejos - antígeno-anticuerpo, diluïdos 1:10 en solución NaCl-Tw-BSA (NaCl 0.05M, Tween 20 al 1.5%, albúmina sérica bovina al 0.1%), fuerza iónica 0.05. En seguida, los tubos se incuban durante 3 horas a 22°C, con agitación continua, después se lavan y se añade a cada uno 5 ó 10 µg de IgG-I<sup>125</sup> agregada, de actividad específica conocida; se incuba nuevamente durante 2 horas a 22°C, se lava y se determina la radioactividad en cada tubo. La muestra se desarrolla por triplicado. Otros tubos son utilizados como controles: -- control (NaCl-Tw-BSA, IgG-I<sup>125</sup> agregada); control Clq (Clq, NaCl-Tw-BSA, IgG-I<sup>125</sup> agregada). (Tabla 4, figura 3).

El porcentaje de inhibición del indicador IgG-I<sup>125</sup> agregada unido a Clq se calcula como:

$$100 - \frac{100c}{a - b} = \% \text{ inhibición de unión de IgG-I}^{125} \text{ agregada}$$

donde:

- a representa el valor del control Clq
- b representa el valor del control
- c representa el valor obtenido de la muestra probada.

Este método se ha probado con sueros de pacientes con LED, AR, vasculitis y hepatitis crónica.

TABLA 4. RADIOINMUNOENSAYO EN FASE SOLIDA PARA UNION DE Clq A COMPLEJOS INMUNES

- 1 Clq adsorbido en tubos de poliestireno - sol
- 2 Agregar SHP (CI), 22°C, 180'
- 3 Agregar  $\Delta\text{IgG-I}^{125}$ , 22°C, 120'. Se establece competencia entre CI del SHP e  $\Delta\text{IgG-I}^{125}$  por Clq.
- 4 Lavar y contar radioactividad

$$\% \text{ Inhibición de unión de } \Delta\text{IgG-I}^{125} = 100 - \frac{100c}{a - b}$$

donde

- a control Clq (Clq, sol,  $\Delta\text{IgG-I}^{125}$ )
- b control (sol,  $\Delta\text{IgG-I}^{125}$ )
- c problema (Clq, sol, SHP (CI),  $\Delta\text{IgG-I}^{125}$ )

---

Clq                    subcomponente del complemento

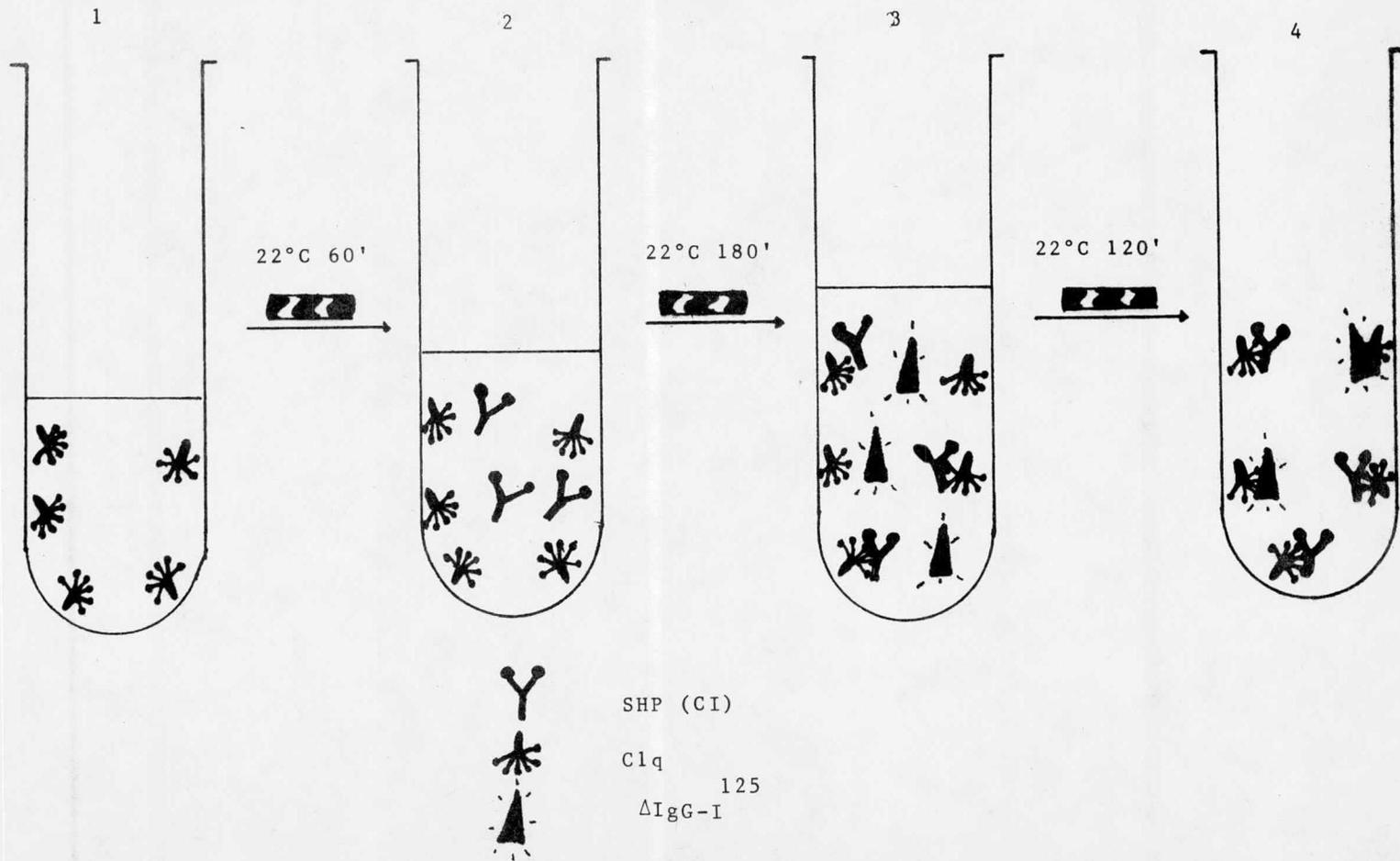
sol                    NaCl-Tw-BSA

$\Delta\text{IgG-I}^{125}$             agregados de inmunoglobulina G marcados con I<sup>125</sup>

SHP (CI)            suero humano problema con complejos inmunes

                         56°C, 30'

FIGURA 3. RADIOINMUNOENSAYO EN FASE SOLIDA PARA UNION DE C1q A COMPLEJOS INMUNES



Al usar este método con sueros de pacientes con AR hubo un aumento en la unión de agregados de IgG-I<sup>125</sup>, - particularmente cuando el suero presentaba una actividad - alta de factor reumatoide. Una explicación a esto se da en el sentido de una probable unión a Clq de complejos inmunes que poseen valencias libres de factor reumatoide, las cuales compensan su efecto bloqueante por su enlazamiento a los - agregados IgG-I<sup>125</sup>.

Este método requiere de concentraciones pequeñas de Clq (50-200µg) para saturar la fase sólida; en almacenamiento a 4°C la estabilidad de Clq adsorbido se mantiene - hasta 50 días después de su preparación. Las condiciones - de tiempo de incubación, temperatura y fuerza iónica se de - terminaron para cada paso de la reacción y se utilizaron - en su desarrollo las consideradas como óptimas.

Un problema que ha tenido poca atención es el - concerniente a la diferenciación de complejos inmunes y -- agregados de inmunoglobulinas formados durante el almacenamiento o manipulación de los sueros, por lo que se reco - mienda utilizar sueros frescos o almacenados a -70 y -90°C, evitando la descongelación repetida.

Una limitación de este ensayo, se relaciona a la tendencia de la molécula de Clq para formar complejos mole - culares con ADN, con glicoproteínas de peso molecular bajo presentes particularmente en sueros de pacientes con LED y

con ciertas endotoxinas bacterianas. Sin embargo como ya se mencionó anteriormente, algunas de estas interferencias pueden evitarse por tratamiento con DNAsa y por reducción y alquilación de los fluidos biológicos. Otra solución a este problema, es usar anticuerpos IgG-I<sup>125</sup>, dirigidos contra cadenas  $\gamma$  y  $\mu$ , como indicador, en lugar de IgG-I<sup>125</sup> agregada. Ya que en este sistema, la presencia de complejos se ha manifestado también por una unión elevada de anticuerpos IgG-I<sup>125</sup>.

La sensibilidad del método es de 2 a 5 ng/ml para IgG agregada y de 50 ng/ml para complejos inmunes formados en exceso de anticuerpo.

ii) Proteína A-I<sup>125</sup> como molécula indicadora  
(9,8)

En 1958, Jensen descubrió una sustancia que precipitaba al reaccionar con suero humano (16). Este material correspondía a una proteína estafilocócica llamada A. La cepa productora de dicha proteína es el Staphylococcus aureus Cowan I.

Posteriormente se descubrió que la proteína A, reaccionaba con la porción Fc de las inmunoglobulinas de los tipos G-1, G-2, G-3. Esta propiedad ha servido para utilizar la proteína A como molécula indicadora en la detección de complejos inmunes solubles, que contienen IgG -

como anticuerpo.

El ensayo se basa en el enlazamiento simultáneo de complejos inmunes a Clq en fase sólida y de proteína A radiomarcada a IgG presente en los complejos inmunes.

Inicialmente el método utilizaba a las células estafilocócicas conteniendo en su pared celular la proteína A marcada con P<sup>32</sup>. Con este sistema se tenía perdida en la estabilidad de asociación de las células al P<sup>32</sup> por la destrucción parcial de la pared celular después de 48 horas a partir de su preparación. También la densidad alta de Clq en la fase sólida no era recomendada, ya que esto causaba la liberación de las células por parte de los complejos inmunes enlazados a Clq, induciendo así, índices de enlazamiento disminuidos. Este comportamiento se debe probablemente a que el Clq en alta densidad puede actuar como factor bloqueante, enlazando excesivamente la porción Fc de la molécula de IgG, evitando de esta forma, el enlazamiento efectivo subsecuente de la proteína A. Otra causa probable es que por razones estéricas se bloquee la capacidad enlazante de Clq.

Recientemente se reporta (8), que utilizando la proteína A aislada y marcada con I<sup>125</sup>, la sensibilidad es 10 a 20 veces mayor que en las condiciones iniciales.

Para el desarrollo del ensayo, la fase sólida se

prepara adsorbiendo proteína Clq purificada a tubos de poliestireno; a estos tubos se les añade 10µl de SHP diluido 1:20 y 1.0 ml de solución NaCl-Tw-BSA, se incuban durante 18 horas a 22°C. Después se lavan 3 veces con solución -- NaCl-Tw-BSA. Enseguida se adicionan 5µl de proteína A-I<sup>125</sup> (actividad específica conocida), se incuba nuevamente durante 3 horas a temperatura ambiente, se lava y se determina la radioactividad. La solución utilizada como blanco -- es NaCl-Tw-BSA. Para la evaluación, los resultados se comparan con los obtenidos de suero humano normal (SHN) tratado en la misma forma que el SHP. Los resultados se expresan en índices de enlazamiento.

Indice de enlazamiento igual a:

$$\frac{\text{cuentas problema (SHP)} - \text{cuentas NaCl-Tw-BSA}}{\text{cuentas NaCl-Tw-BSA}}$$

Este método se ha utilizado para detectar IgG -- agregada y complejos inmunes en sueros de pacientes con infarto agudo al miocardio. La formación de complejos inmunes se ha determinado en pacientes con infarto agudo al -- miocardio por ésta y por otras técnicas (29) de detección de complejos inmunes. Se ha observado que existe una relación entre la producción de complejos inmunes y el tamaño del infarto. La frecuencia de reacciones positivas en la determinación de complejos inmunes, se incrementa entre --

los 10 y 15 días después del infarto y disminuyen paulatinamente después de este período.

El ensayo está limitado para reaccionar solamente con las subclases de IgG, antes mencionadas. Sin embargo, puede usarse como un suplemento más selectivo al compararse con otros sistemas que detectan complejos inmunes -- que contienen tanto anticuerpos IgG como IgM.

La cantidad de Clq utilizada es de 2µg/tubo, debido a que en este sistema, la detección de complejos inmunes se ve afectada por la cantidad de Clq en la fase sólida.

Este método tiene similitud con el método que -- utiliza IgG-I<sup>125</sup> agregada como molécula indicadora. La manipulación de los sueros es igual en ambas técnicas.

La sensibilidad del método para IgG agregada es de 50ng/ml.

### III. PRECIPITACION SELECTIVA CON POLIETILENGLICOL. (18,25)

Este método está basado en el tamaño molecular -- de los complejos inmunes y de la propiedad de unirse a Clq que los caracteriza. Una precipitación selectiva con polietilenglicol (PEG) permite la separación de Clq-I<sup>125</sup> libre y Clq-I<sup>125</sup> unido a complejos inmunes.

Esta técnica utiliza 0.2ml de suero problema sin diluir. Las muestras problemas se colocan en tubos que -- contengan la misma cantidad de amortiguador veronal salino y se añade Clq-I<sup>125</sup> de concentración y actividad específicas conocidas. Se incuba durante una hora a 4°C. Se centrifuga a 1000g durante 20 minutos, el sobrenadante se des-- carta y se mide la radioactividad en el precipitado lava-- do. Los resultados se expresan como el porcentaje de -- Clq-I<sup>125</sup> precipitado y son calculados en base a la radioac-- tividad de proteína unida, precipitable con ácido tricloro-- acético al 10% (TCA 10%), la cual se determina para cada -- análisis efectuado. (Tabla 5, figura 4).

$$\frac{(\text{cpm Clq-I}^{125} \text{-problema}) - (\text{fondo})}{(\text{cpm Clq-I}^{125}, \text{TCA 10\%}) - (\text{fondo})} \times 100 = \% \text{ de Clq-I}^{125} \text{ unido}$$

Para el diseño de este método se usó suero de un modelo experimental de enfermedad autoinmune, posteriormen-- te la técnica se aplicó al estudio de sueros de pacientes-- con LED y recientemente se ha utilizado en la investiga-- ción de complejos inmunes en pacientes con diferentes ti-- pos de cáncer. (25).

Se sabe que el PEG en concentraciones bajas, pue-- de usarse para precipitar complejos antígeno-anticuerpo, -- en condiciones a las cuales tanto el antígeno como el anti

TABLA 5. CUANTIFICACION DE COMPLEJOS INMUNES POR UNION A Clq-I<sup>125</sup> UTILIZANDO PEG

- 1 SHP (CI) - Clq-I<sup>125</sup> - A, 25°C, 60'; 4°C, 60'
- 2 Agregar PEG, 4°C, 120'
- 3 Precipitación selectiva de Clq-I<sup>125</sup> unido a CI por centrifugación a 1000xg, 20'. Descartar sobrenadante y contar radioactividad en el precipitado.

$$\% \text{ de Clq-I}^{125} \text{ unido} = \frac{(\text{cpm Clq-I}^{125}, \text{ problema}) - (\text{fondo})}{(\text{cpm Clq-I}^{125}, \text{ TCA 10\%}) - (\text{fondo})} \times 100$$

---

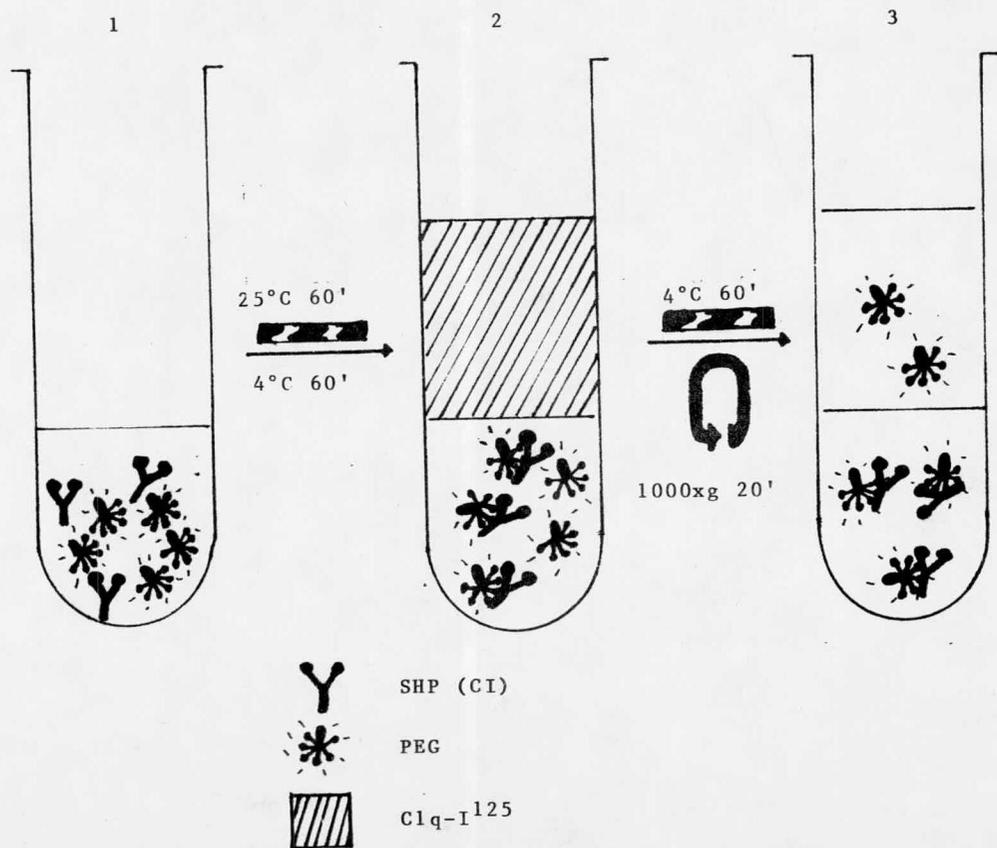
Clq-I<sup>125</sup> subcomponente del complemento marcado con I<sup>125</sup>

A amortiguador veronal salino

PEG polietilenglicol al 2.5%

SHP (CI) suero humano problema con complejos inmunes  
56°C, 30'.

FIGURA 4. CUANTIFICACION DE COMPLEJOS INMUNES POR UNION A  $C1q^{125}$  UTILIZANDO PEG



cuerpo libres son solubles (31). Este conocimiento se ha utilizado para las bases teóricas del método. El mecanismo de acción de PEG es desconocido, pero se cree modifica la solubilidad de las proteínas. El efecto de precipitación en este sistema de detección de complejos inmunes (CI) se explica por la exclusión estérica del complejo macromolecular (CI-Clq-I<sup>125</sup>) en el solvente por influencia del PEG. (5, 18).

Un hecho importante de este ensayo es que el porcentaje de Clq-I<sup>125</sup> precipitado está relacionado principalmente a la cantidad absoluta de complejos circulantes más que al tamaño relativo de los mismos.

La fijación inespecífica de Clq a ADN nativo, ADN de cadena simple y a lipopolisacáridos bacterianos (LPS) no se puede detectar en las condiciones de ensayo, debido a que tanto el ADN como los LPS no muestran actividad enlazante fuerte sobre Clq, además estas moléculas son completamente solubles en PEG, por lo tanto la fijación de Clq en ellas no induce precipitación del subcomponente del complemento en presencia de PEG al 2.5%. (33).

Una modificación de este método señala que no es necesaria la inactivación del suero antes de su utilización en el ensayo, e indica que el proceso de inactivación por calentamiento puede producir inmunoglobulinas agrega-

das, pero que el efecto mayor que se produce es disminuir la habilidad de los complejos inmunes preexistentes para fijar Clq, debido a la disociación de ellos por involucrar antígenos termolábiles. (33).

Para evitar la pérdida de Clq-I<sup>125</sup> por incorporación al componente Cl, cuando el suero no es inactivado, se efectúa un tratamiento con EDTA en concentraciones altas. En estas condiciones el Clq intrínseco del suero ejerce una competencia mínima en la unión de Clq-I<sup>125</sup> a complejos inmunes.

La cantidad de suero requerida para el ensayo es pequeña, lo cual indica alta sensibilidad. También esta técnica permite resultados cuantitativos y puede ser utilizada en la investigación de estudios progresivos en pacientes durante y después de la terapia.

La reproducibilidad de la prueba es buena, solamente se aconseja la centrifugación del Clq antes de utilizarlo, para mantener una concentración conveniente de proteína y estabilizar el Clq-I<sup>125</sup>, puesto que en solución tiende a agregarse.

Las limitaciones que tiene este método son: ---  
a) solamente se pueden detectar complejos inmunes que contengan anticuerpos enlazantes de Clq; b) utilizar sueros frescos o de congelamiento reciente para evitar la forma---

ción espontánea de inmunoglobulinas agregadas; c) la prueba no da indicación directa para la identificación del antígeno en el complejo.

La sensibilidad del método es de 10  $\mu\text{g/ml}$  para IgG agregada y de 3  $\mu\text{g/ml}$  para complejos solubles IgG-anti IgG. (26).

#### IV. ENLAZAMIENTO A Clq POR INHIBICION COMPETITIVA.

##### PRUEBA DE DESVIACION

##### i) Eritrocitos de carnero sensibilizados. (28,27)

Este método está basado en la inhibición de la fijación de Clq-I<sup>125</sup> a eritrocitos de carnero sensibilizados (EA), por la presencia de complejos inmunes circulantes en el suero.

El ensayo consiste en diluir 50  $\mu\text{l}$  de suero en 100  $\mu\text{l}$  de solución salina y 100  $\mu\text{l}$  de amortiguador veronal sacarosa pH 7.2. El suero diluido es inactivado a 56°C durante 30 minutos. Después de la inactivación, se añaden 10  $\mu\text{l}$  de Clq-I<sup>125</sup> (1  $\mu\text{g}$ ) y se incuba a 20°C durante 15 minutos, en seguida se adicionan 200  $\mu\text{l}$  de EA ( $4 \times 10^8$  células) y se continúa la incubación durante 15 minutos. Al terminar ésta, una alícuota de 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción se pasa a través de 150  $\mu\text{l}$  de solución de sacarosa al

40% en amortiguador de fosfatos 0.05M, pH 7.0, contenidos en un microtubo. Se procede a centrifugar a 15 000 rpm -- (aproximadamente 13 000 g) durante 5 minutos. Después se cuenta la radioactividad de las dos fases. La fijación de Clq-I<sup>125</sup> por EA se calcula en porcentaje de radioactividad total recuperada. (Tabla 6, fig. 5).

$$\% \text{ de fijación de Clq-I}^{125} = \frac{\text{cpm del botón}}{\text{cpm del botón} + \text{cpm del sobrenadante}} \times 100$$

Para determinar la inhibición de enlazamiento de Clq-I<sup>125</sup> a EA por el suero problema, la fijación de Clq -- por EA en presencia de suero humano normal se cuantifica simultáneamente.

El porcentaje de inhibición de la fijación o porcentaje de desviación de Clq-I<sup>125</sup> para el problema se calcula como:

% de desviación de Clq-I<sup>125</sup> igual a

$$\frac{\% \text{ fijación control (SHN)} - \% \text{ fijación problema}}{\% \text{ fijación control}} \times 100$$

Este ensayo se ha efectuado con complejos inmunes preparados in vitro y en casos de nefropatías glomerulares (principalmente glomerulonefritis aguda y glomerulonefritis membranosa).

TABLA 6. PRUEBA DE DESVIACION DE Clq PARA DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES

1 SHP(CI)-A - Clq-I<sup>125</sup>, 20°C, 15'

2 Agregar ES, 20°C, 15'

3 Centrifugar en S, 13 000xg, 5'

4 Separar y contar radioactividad en ambas fases

$$\% \text{ de Fijación} = \frac{\text{cpm del botón}}{\text{cpm del botón} + \text{cpm del sobrenadante}} \times 100$$

$$\% \text{ de Desviación de Clq} = \frac{\% \text{ de fijación del control} - \% \text{ de fijación del problema}}{\% \text{ de fijación del control}} \times 100$$

donde

control SHN - Clq-I<sup>125</sup>-ES

problema SHP(CI) - Clq-I<sup>125</sup> - ES

---

Clq subcomponente del complemento marcado con I<sup>125</sup>

A amortiguador sacarosa veronal

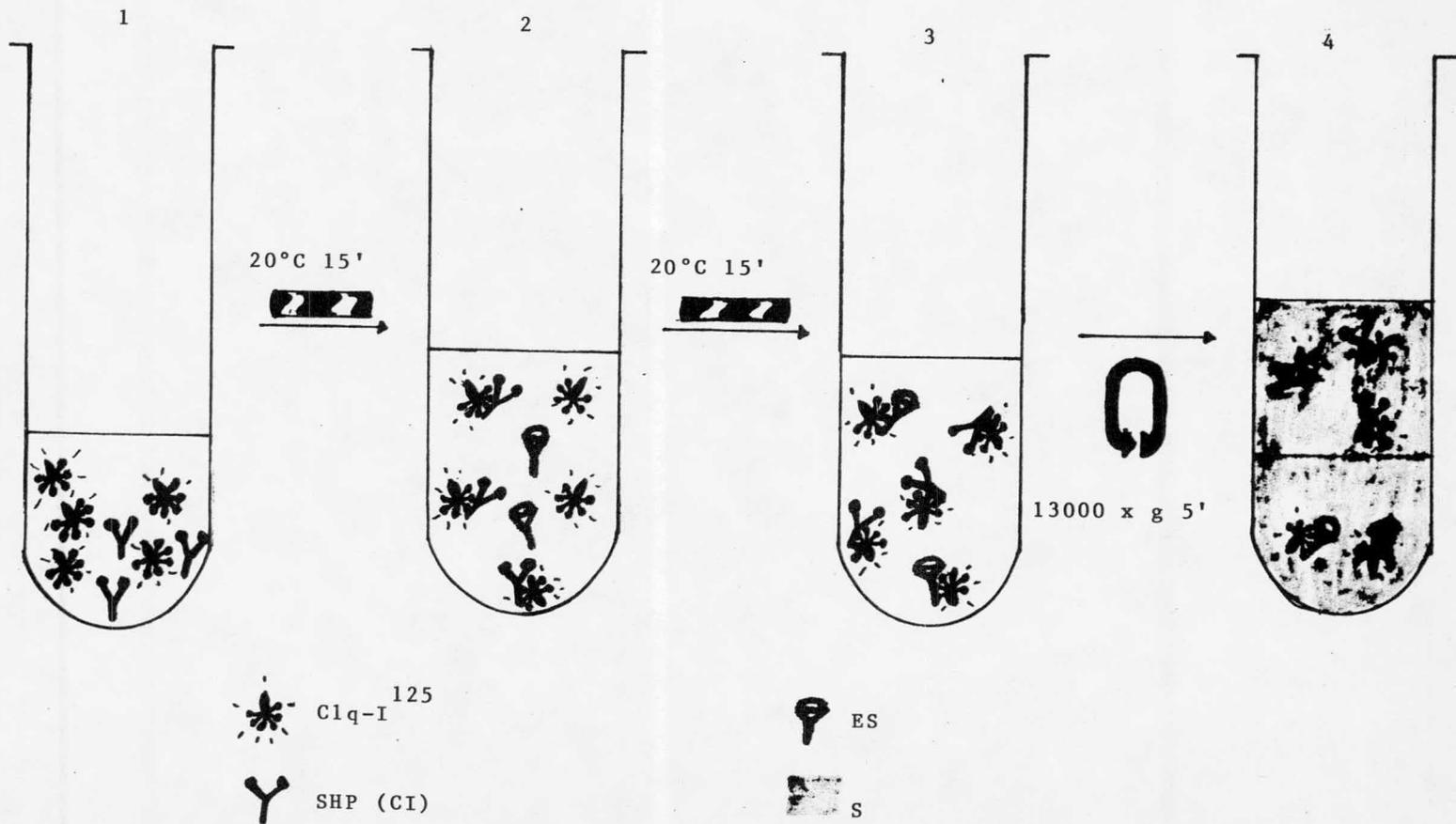
ES eritrocitos de carnero sensibilizados

SHP(CI) suero humano problema con complejos inmunes, 56°C, 30'

SHN suero humano normal

S sacarosa al 40%

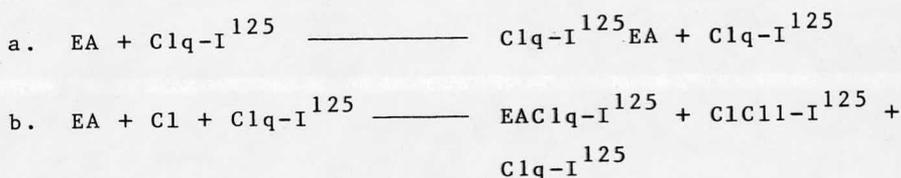
FIGURA 5. PRUEBA DE DESVIACION DE C1q PARA DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES



Para la evaluación de la interferencia en la fijación a Clq por complejos inmunes, el complejo EA constituye el blanco de activación o de fijación de Clq.

En una mezcla EA, complejos inmunes y  $\text{Clq-I}^{125}$ , una cierta cantidad de Clq es desviada de su blanco normal y fijada por complejos inmunes. Esta cantidad es proporcional a la concentración y reactividad de los complejos inmunes presentes, así la fijación de Clq sobre EA en presencia de complejos inmunes es menor al ser comparada a la fijación observada en el suero normal.

La representación esquemática de la reacción es:



La radioactividad medida en las fracciones a y b permite determinar la desviación de  $\text{Clq-I}^{125}$ . Para mayor reproducibilidad de la prueba, el  $\text{Clq-I}^{125}$  fijado a los eritrocitos sensibilizados se separa del resto del  $\text{Clq-I}^{125}$  en la fase fluída, sea o no fijado a los complejos inmunes solubles.

Para obtener una sensibilidad óptima, la cantidad de hemolisina utilizada para preparar EA, es crítica, ya que la variación de la dosis sensibilizante modifica la

reactividad con respecto al enlazamiento de Clq. Así también, al estar las células cubiertas de anticuerpos adecuadamente, limitan la posibilidad de interferencia debida a anticuerpos heterófilos antimembrana glomerular, presentes en los sueros problema. En las condiciones del ensayo, la dosis sensibilizante permite una fijación de Clq-I<sup>125</sup> del 50 al 70%, para sueros normales, sin causar aglutinación y hemólisis de los eritrocitos.

La sensibilidad de la prueba de desviación de Clq es mayor que la de otros métodos. Mientras que la precipitación en gel y la prueba de precipitación de Clq-I<sup>125</sup> detectan IgG agregada a concentraciones mínimas de 100µ/ml y 50µ/ml respectivamente.

La prueba de desviación permite detectar 5 µg/ml, y como cantidad menor absoluta detectable 250 ng/ml.

La prueba de desviación tiene una sensibilidad similar a la de métodos con fundamentos teóricos diferentes como es la prueba que emplea células linfoblastoides cultivadas para el enlazamiento de complejos inmunes, cuya sensibilidad es alta.

La reproducibilidad de la prueba indica que una desviación superior al 15% se considera como positiva. (28)

Esta prueba detecta también otras sustancias fijadoras de complemento, como ADN y endotoxinas bacterianas

las cuales inhiben la fijación sobre las células sensibilizadas. En el caso del ADN, al igual que en los métodos antes mencionados la interferencia se elimina por tratamiento con DNAsa.

Los autores del método indican que para este sistema, la inactivación por calentamiento del suero problema, aparentemente limita el enlazamiento de complemento a complejos inmunes y los hace más accesibles a  $\text{Clq-I}^{125}$  (27).- Se recomienda también el uso de sueros frescos o de congelamiento reciente.

El lavado de las fracciones antes del conteo de radioactividad no es factible debido a la reversibilidad de la fijación de Clq, además en la fracción fluída produce cuantificaciones inexactas o imposibles de efectuar.

Dada la estabilidad de las células sensibilizadas y del  $\text{Clq-I}^{125}$ , la prueba puede ser practicable en el laboratorio clínico.

ii) Agregados insolubles de IgG. (10)

Este ensayo está basado en la competencia de sustancias enlazantes de Clq con agregados insolubles de IgG-(IIA).

El procedimiento se desarrolla incubando  $\text{Clq-I}^{125}$

con cantidades en aumento progresivo de suero problema (inactivado a 56°C, durante 30 minutos) o de agregados solubles de IgG, hasta un volumen total de 50 µg de IIA (5 µl) y se continúa la incubación por 30 minutos más. Se separan dos fases por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, y se mide la radiactividad. La diferencia de ambas cuentas se considera como la cantidad de Clq unido a complejos inmunes. Los controles consisten en reemplazar el suero humano problema con suero humano normal inactivado.

Esta técnica se ha utilizado con agregados solubles de IgG y sueros de pacientes con AR. En las condiciones descritas los agregados solubles revelan una inhibición de enlazamiento lineal hasta un nivel del 50%. Esta misma relación lineal, se ha obtenido con sueros de pacientes con AR.

Se reporta que para este sistema, el suero de pacientes con AR muestra la presencia de un material desconocido, el cual enlaza competitivamente Clq en grandes cantidades. Para disminuir la concentración de este material, en el suero, se utiliza D-penicilamina, de la cual se sabe que facilita la depolimerización de ciertas clases de microglobulinas patológicas.

Este ensayo al igual que todos los ensayos basados en el enlazamiento de Clq, tiene las limitaciones re-

sultantes de la presencia de sustancias como ADN, lipopolisacáridos y glicoproteínas de peso molecular bajo.

Los reactivos para el análisis son de preparación fácil y su estabilidad se mantiene por congelamiento. Se recomienda también la utilización de sueros frescos.

La sensibilidad del ensayo es de 1  $\mu$ g de agregados de IgG contenidos en 50  $\mu$ l de suero y es comparablemente mejor que técnicas como la precipitación en gel.

C A P I T U L O    C U A R T O

DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES SOLUBLES  
UTILIZANDO LATEX CUBIERTO DE GAMMA GLOBULINA HUMANA

I. FUNDAMENTO

II. MATERIALES Y METODOS

III. CONDICIONES DEL ENSAYO

IV. DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES

V. CALCULOS

DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES SOLUBLES  
UTILIZANDO LATEX CUBIERTO DE GAMMA GLOBULINA HUMANA

I. FUNDAMENTO

En el presente capítulo se explicarán los fundamentos y técnicas sobre los cuales está basado este proyecto.

Reacción de Aglutinación

La reacción de aglutinación se ha usado ampliamente como un ensayo semicuantitativo de alta sensibilidad. Esta reacción se presenta por la unión de células o partículas grandes a anticuerpos dirigidos contra sus antígenos de superficie; a diferencia de la reacción de precipitación, la cual se efectúa entre proteínas antigénicas multivalentes y sus anticuerpos.

La reacción de aglutinación se considera generalmente de mayor sensibilidad que la reacción de precipitación, ya que las partículas relativamente voluminosas cubiertas con una capa delgada de antígeno parecen amplificar la reacción.

Se ha demostrado que el diluir los sueros ensayados favorece la observación de la aglutinación a diferen-

cia de la reacción de precipitación que se ve disminuída -- cuando se desarrolla con sueros diluídos. Esto puede estar relacionado con el número de partículas necesarias para hacer visible la reacción.

La presencia de un electrolito así como su fuerza iónica, son importantes para que las cargas de superficie estén amortiguadas adecuadamente antes que las partículas se acerquen lo suficiente para que las moléculas de anticuerpos formen uniones específicas entre ellos. De este modo aunque los anticuerpos esten enlazados específicamente a la superficie de las partículas puede no presentarse la aglutinación si la concentración salina es baja. Contrariamente, la adición excesiva de sales puede inducir -- aglutinación aun en ausencia del anticuerpo.

Este método rápido y simple se ha extendido a -- una amplia variedad de antígenos solubles, al unirlos a la superficie de partículas. La aglutinación pasiva, como se denomina esta reacción, utiliza polímeros sintéticos tales como poliestireno o minerales coloidales como la bentonita, como soporte de los antígenos. Ordinariamente estas partículas adsorben por medio de enlaces no covalentes a los antígenos, sobre su superficie.

La aglutinación es una prueba de alta sensibilidad, la cual mide los niveles de anticuerpos en términos --

relativos, no en unidades de peso. Así mismo la inhibición de esta reacción, provee un ensayo sensible, el cual puede efectuarse al adicionar al medio de reacción un ligando libre que inhiba específicamente la reacción, al competir por el antígeno adsorbido sobre la superficie de las partículas. (14, 6).

El látex (poliestireno) cubierto de IgG, es un reactivo útil en pruebas de aglutinación, por lo cual hemos pensado utilizarlo como indicador en el sistema de reacción que nos interesa. Sabemos que este reactivo se utilizó en estudios de interacción entre complemento humano e inmunoglobulina G, observándose que el subcomponente Clq del complemento era el responsable del efecto aglutinante sobre las partículas de látex. Esta reacción de aglutinación se efectúa en forma lineal, lo cual indica que depende y se incrementa en forma proporcional a la concentración de Clq. (7).

Del Clq sabemos que es la proteína de reconocimiento de la vía clásica del complemento, tiene gran avidez por los complejos inmunes y ha servido como detector sensible de éstos y otros materiales que reaccionan con el complemento. (1, 3).

En base a las características del subcomponente Clq, así como del reactivo látex cubierto de IgG (Lá-IgG)-

tratamos de diseñar el proyecto de una técnica que nos fuera útil en la determinación de complejos inmunes solubles y que no requiera de aparatos costosos y sofisticados.

Este diseño está basado en la inhibición de la aglutinación de látex cubierto de IgG, por la presencia de complejos inmunes que compiten con estas partículas por la fijación de Clq.

En teoría los complejos inmunes no reaccionan -- con el látex cubierto de IgG ya que la porción activa Fc -- del anticuerpo expuesta por la formación del complejo solamente enlaza Clq y no una inmunoglobulina como la que se encuentra cubriendo las partículas de látex.

La secuencia de la reacción que se propone, consiste en hacer reaccionar complejos inmunes (CI) con el -- subcomponente Clq humano purificado y hacer detectable la reacción por medio de partículas de látex cubiertas de IgG, las cuales, al unirse con Clq libre de la primera reacción producen una aglutinación.

La aglutinación será de mayor o menor grado de -- dependiendo de la inhibición ejercida por la presencia de -- complejos inmunes.

En forma esquemática la reacción puede expresarse de la siguiente manera:



Así, se espera que al reaccionar cantidades conocidas de complejos inmunes (preparados in vitro) con Clq - purificado, haya una fijación de Clq por los complejos inmunes y al añadir látex cubierto de IgG se presente competencia entre complejos inmunes y la IgG de las partículas de látex por la fijación a Clq, produciendo una inhibición de la aglutinación proporcional a la concentración de los complejos inmunes presentes. Si se compara esta inhibición de la aglutinación con la producida por un suero problema tratado en la misma forma que los complejos inmunes - preparados in vitro, podemos evaluar la cantidad de complejos inmunes o de sustancias fijadoras de Clq. De tal manera que la concentración de complejos inmunes esté determinada por el grado de inhibición de la aglutinación.

## II. MATERIALES Y METODOS

La preparación de las sustancias que se proponen para este proyecto pueden prepararse en el laboratorio o adquirirse de marcas comerciales.

### Proteína Clq purificada

Esta proteína puede obtenerse de sueros normales,

haciendo la purificación por el método del ADN (1) o por el método de precipitación a baja fuerza iónica (32).

Una vez obtenida la proteína se requerirá estandarizarla, para lo cual se proponen las siguientes pruebas: determinación de proteínas, pureza y actividad biológica.

Estas pruebas pueden efectuarse por métodos muy utilizados en laboratorios clínicos. La determinación de proteínas puede efectuarse por la modificación al método de Lowry (14), se pensó en esta técnica, ya que permite la cuantificación rápida de concentraciones pequeñas de proteína (1 a 5  $\mu\text{g/ml}$ ).

La prueba de pureza consiste en electroforesis en gel de acrilamida, efectuándose por el método modificado de Davis. (32).

La actividad biológica de la proteína puede determinarse en placas de gel de agarosa 0.6% (1) y midiendo las unidades aglutinantes (29).

#### Complejos Inmunes Solubles.

La reacción de precipitación cuantitativa de complejos antígeno-anticuerpo indica que para sistemas monoespecíficos, el anticuerpo que reacciona es esencialmente equivalente a la cantidad de antígeno adicionada.

En una curva de precipitación antígeno-anticuerpo se observan tres zonas de reacción; exceso de anticuerpo, equivalencia y exceso de antígeno.

La relación anticuerpo-antígeno en la zona de exceso de anticuerpo de muchos sistemas monoespecíficos, varía en forma muy cercana a la linealidad, cuando se añaden cantidades crecientes de antígeno. En esta zona la relación molar excede grandemente a 1.0, indicando que varias moléculas de anticuerpo se combinan con una molécula de antígeno. En la zona de exceso de antígeno, esta relación - tiende a formar una curva con un valor limitante ligeramente mayor de 1.0. Esto se ha explicado con la teoría del enrejado (Heidelberger y Marrack), la cual sugiere que la precipitación es una consecuencia de la formación de agregados de anticuerpo-antígeno, de tal manera que cada molécula de anticuerpo se une a más de una molécula de antígeno y viceversa, formando una red, y cuando los agregados - exceden del volumen crítico se produce la precipitación. - Así mismo, cuando los complejos precipitan en las zonas - de exceso, se forma un agregado lineal con moléculas de antígeno y anticuerpo alternantes (Ag. Ac. Ag. Ac. Ag. Ac).- En la región de exceso de antígeno se han encontrado relaciones anticuerpo/antígeno menores de 1.0, pero los agregados formados en esta zona permanecen en el sobrenadante -- porque son pequeños y determinan la rama descendente de la

curva de precipitación.

Se ha demostrado que las relaciones molares de los complejos solubles varían considerablemente; 0.75 ( $\text{Ac}_3\text{Ag}_4$ ) en ligero exceso de antígeno, 0.67 ( $\text{Ac}_2\text{Ag}_3$ ) en exceso substancial de antígeno y en exceso extremo del antígeno la relación se aproxima a 0.5 ( $\text{AcAg}_2$ ), como se espera de la bivalencia de la molécula de anticuerpo. (6).

El procedimiento para efectuar la reacción de precipitación cuantitativa de complejos anticuerpo-antígeno se efectúa de la siguiente manera:

Se preparan 10 diluciones progresivas a partir de 1 ml de solución de albúmina sérica humana (ASH) (1 mg/ml). Utilizando amortiguador de boratos 0.05M pH 8.2 como diluyente.

En una serie de 9 tubos colocar 0.5 ml de la dilución correspondiente del antígeno (ASH). Adicionar a cada tubo 0.5 ml de suero anti ASH. Mezclar e incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Agitar los tubos y mantenerlos en reposo a  $4^\circ\text{C}$  durante 24 horas, agitar nuevamente, y dejarlos en reposo a  $4^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Centrifugar a 2400 rpm,  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Decantar cuidadosamente el sobrenadante, lavar dos veces el precipitado con 0.5 ml y 1 ml de solución amortiguadora fría, centrifugando a 2400 rpm,  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Diluir el precipitado

en 5 ml de ácido acético 0.25N. Leer la absorbancia de la solución contenida en cada tubo a 280 nm. Graficar (concentración del antígeno en las abscisas y absorbancia en las ordenadas).

En otra serie de tubos, los cuales se utilizan para determinar la densidad óptica del antígeno, colocar 0.5 ml de la dilución correspondiente del antígeno (ASH) y añadir 5 ml de ácido acético 0.25N, mezclar completamente y leer la absorbancia a 280 nm. (14).

Cantidad de anticuerpo precipitado:

$$M = \frac{D_{sp} - D_x}{E_{1\%}^{1cm} (Ac)} \times V \times 10$$

donde

M cantidad de anticuerpo en el precipitado (mg)

D<sub>sp</sub> absorbancia del precipitado

V ml de ácido acético añadidos para disolver el precipitado

E<sub>1%<sup>1cm</sup></sub> coeficiente de extinción del anticuerpo

D<sub>x</sub> absorbancia del antígeno en el precipitado

Para llevar a cabo este proyecto se ha pensado utilizar complejos inmunes solubles del sistema ASH-anti-ASH. Preparándolos con 10, 20 y 50 veces el antígeno en exceso. El suero anti ASH deberá obtenerse de conejos inmunizados y se determinará el punto de equivalencia previa

mente a su uso por medio de una curva de precipitación.

#### Preparación de Complejos Inmunes Solubles

Colocar en tubos de ensayo 0.5 ml de ASH (concentración adecuada para el exceso de antígeno correspondiente) y adicionar 0.5 ml de suero anti ASH, cubrirlos y colocarlos en baño de agua a 37°C durante 30 minutos, agitar y mantenerlos a 4°C durante 16 horas, centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos, salvar el sobrenadante. (24)

#### Suero Humano Normal (SHN)

El suero humano normal se requiere para la preparación de controles. El suero deberá ser inactivado (56°C 30 min.) y diluído (1:6) en amortiguador de boratos 0.05M, pH 8.2 antes de usarse. Este tratamiento es necesario para eliminar el Clq endógeno y además la posibilidad de encontrar reacciones positivas falsas por sustancias inespecíficas.

Se sabe que algunos sueros normales presentan actividad aglutinante de látex cubierto de IgG (baja incidencia), sobre todo cuando han sido almacenados por largo tiempo. (7).

### Látex cubierto de IgG (LáIgG)

Este se obtiene de reactivos comerciales utilizados en la prueba del factor reumatoide. (Lab. Hyland, Lab. Lafón, Lab. Hoecht).

### Solución Amortiguadora

El amortiguador que se utiliza es una solución de NaCl 0.15M, boratos 0.05 M, pH 8.2, fuerza iónica 0.20; ya que sabemos esta solución es de utilidad para la reacción Clq-LáIgG. (23).

Por tratarse de una microtécnica debemos considerar que los recipientes sean adecuados para volúmenes pequeños, para lo cual se requerirán placas de poliestireno con pozos de fondo redondo (0.250 ml), ya que esta configuración es la más conveniente para identificaciones de tipo serológico y se adapta para la mejor observación de la reacción de aglutinación, (24).

Para efectuar las diluciones serán necesarias micropipetas calibradas (25  $\mu$ l/gota) y microdilutores (25  $\mu$ l).

### III. CONDICIONES DEL ENSAYO.

Las condiciones de volumen, temperatura y fuerza iónica para la determinación de complejos inmunes, se han-

considerado a partir de la información obtenida de la bibliografía consultada y de pruebas preeliminares.

La determinación de unidades aglutinantes del subcomponente Clq nos ha servido como base principal para considerar las condiciones de este proyecto.

#### Determinación de Unidades Aglutinantes (UA).

Se preparan en placas de poliestireno diluciones seriadas de proteína Clq purificada (25  $\mu$ g), utilizando como diluyente amortiguador de boratos 0.05M, NaCl 0.15M, pH 8.2 (25  $\mu$ l). Una vez efectuadas, se añade a cada pozo 25  $\mu$ l de reactivo látex cubierto de IgG diluído 1:4 (Lag.-Hyland). Se mezclan los reactivos y la reacción de aglutinación se registra después de 20 horas de incubación a temperatura ambiente. Una unidad aglutinante corresponde a 200 ng de la preparación de Clq. (23).

El control negativo se prepara con solución amortiguadora y látex cubierto de IgG diluído 1:4.

Interpretación.- La reacción positiva se observa por una capa de aglutinación que cubre la base del pozo de reacción. La reacción negativa se observa por la formación de un botón blanco sedimentado en el fondo del pozo.

### Volumen

En pruebas preeliminares hemos determinado que en un volumen total de 75  $\mu$ l/pozo, se tiene una observación buena, tanto de la reacción positiva como de la negativa. Por lo que se ha determinado utilizar un volumen de 25  $\mu$ l para cada uno de los reactivos utilizados para el ensayo.

Para cada lote del reactivo látex cubierto de -- IgG es necesario comprobar que mantiene la misma actividad a la dilución indicada por la determinación de unidades -- aglutinantes. Si esto no ocurre será necesario determinar la dilución adecuada y el volumen total del pozo, para que la reacción sea visible sin ningún problema.

### Temperatura

Los métodos descritos en el capítulo anterior, - desarrollan la reacción Clq-complejos inmunes a temperaturas en un rango de 20°C a 25°C, independientemente de las condiciones específicas de cada ensayo. Además en experimentos de asociación entre el componente Cl y complejos inmunes (31), se observó que en un rango de temperatura entre 0°C y 20°C se obtienen constantes de asociación que indi--can enlazamiento efectivo entre estas moléculas. Por lo - tanto se tratará que la primera fase de la reacción (com--

plejos inmunes-Clq) se efectúe en este rango y la segunda fase (Clq-LáIgG) a temperatura ambiente como lo indica la determinación de unidades aglutinantes.

#### Fuerza iónica

Se sabe que la reacción LáIgG-Clq se efectúa a las condiciones del amortiguador utilizado. Sin embargo, para la primera fase (complejos inmunes-Clq) del ensayo se propone probar el mismo amortiguador (boratos -NaCl), variando únicamente la fuerza iónica a un rango entre 0.09 y 0.15, debido a que la unión entre estas dos unidades se efectúa con mayor facilidad en rangos bajos de fuerza iónica, por la naturaleza misma de las interacciones iniciales del enlace. (31).

#### IV. DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES SOLUBLES

Una vez determinadas las unidades aglutinantes del Clq, podemos determinar la cantidad de complejos inmunes que reaccionan con esta proteína, lo cual hemos pensado desarrollar de la siguiente manera:

Utilizando 25 µl de complejos inmunes preparados in vitro, diluïdos 1:1 (v/v) en suero humano normal previamente inactivado, preparar diluciones seriadas en amortiguador de boratos (fuerza iónica 0.09 a 0.15). Enseguida-

añadir 25  $\mu$ l de Clq purificado (UA conocidas), a cada uno de los pozos, mezclar e incubar a 20°C; en este paso se se probarán varios tiempos de incubación. Inmediatamente después de terminada la incubación, añadir 25  $\mu$ l de LáIgG diluído 1:4 a cada pozo, mezclar, cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante 20 horas. Al finalizar este tiempo registrar las lecturas.

Para llevar el control de la reacción se prepararán pozos adicionales con los reactivos utilizados.

1) Clq-LáIgG.

A 25  $\mu$ l de solución amortiguadora adicionar 25  $\mu$ l de Clq purificado (UA conocidas) y 25  $\mu$ l de reactivo LáIgG diluído 1:4. Mezclar e incubar 20 horas a temperatura ambiente. La información que se espera de este control es la aglutinación total que se efectúa al reaccionar el Clq con el látex cubierto de IgG.

2) SHN-LáIgG.

A 25  $\mu$ l de solución amortiguadora añadir 25  $\mu$ l de suero humano normal y 25  $\mu$ l de reactivo LáIgG diluído 1:4. Mezclar e incubar 20 horas a temperatura ambiente. La reacción que se espera de este control es negativa, ya que sabemos los sueros normales no contienen componentes que reaccionen con el látex cubierto de IgG.

3) CI-LÁIgG.

A 25  $\mu$ l de solución amortiguadora añadir 25  $\mu$ l de complejos inmunes a 25  $\mu$ l de LÁIgG diluído 1:4. Mezclar e incubar 20 horas a temperatura ambiente. La reacción que se espera de este control es negativa, pero si llegara a presentarse aglutinación ligera, deberá ser tomada en cuenta para determinar el grado de aglutinación real producido tanto por el Clq como por los complejos inmunes al reaccionar con LÁIgG.

Para la detérminación de complejos inmunes en un suero problema se propone el mismo procedimiento. Efectuando un tratamiento previo a su uso, el cual consiste en dilución 1:1 (v/v) en solución amortiguadora e inactivación a 56°C durante 30 minutos. Sabemos que el almacenamiento del suero induce la formación de agregados de inmunoglobulinas (21-29), lo que altera los resultados reales. Por lo que deberá preferirse la utilización de sueros frescos.

La inhibición de la aglutinación obtenida del suero problema debe ser comparada con los resultados obtenidos de los complejos preparados in vitro, para la evaluación de los mismos. (Tabla 7, figura 6).

V. CALCULOS

La evaluación semicuantitativa puede hacerse di-

TABLA 7. DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES POR AGLUTINACION UTILIZANDO Clq

(MICROTECNICA PROPUESTA)

- 1 Clq - SHP (CI) - A, 20°C, 30'
- 2 Agregar Lá-IgG, T. ambiente, 20 horas. Se establece competencia entre CI del SHP y Lá-IgG por el Clq
- 3 Leer aglutinación

$$\% \text{ de inhibición de Aglutinación} = \frac{b}{a - c} \times 100$$

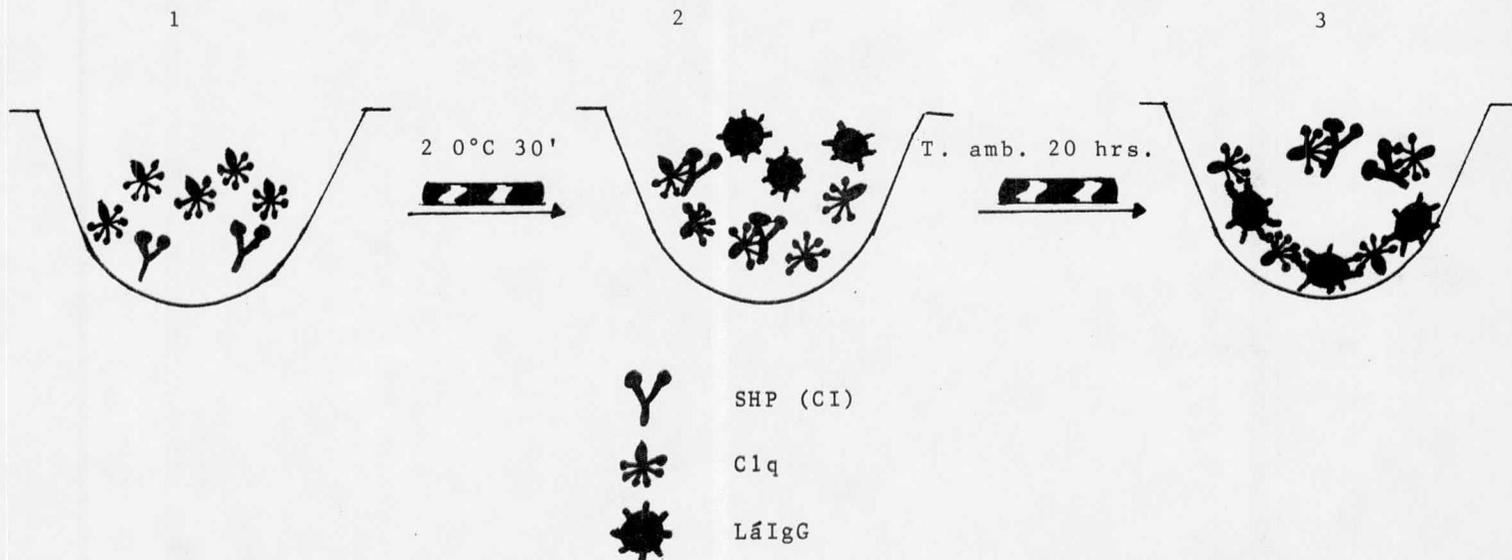
donde

- a control A - Clq-LáIgG
- b problema A - SHP - Clq - LáIgG
- c blanco A - SHN - LáIgG

---

|          |   |
|----------|---|
| Clq      | subcomponente del complemento                                   |
| A        | amortiguador boratos  |
| LáIgG    | látex cubierto de inmunoglobulina G                             |
| SHP (CI) | suero humano problema con complejos inmunes, diluído 56°C, 30'. |
| SHN      | suero humano normal, diluído, 56°C, 30'.                        |

FIGURA 6. DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES POR AGLUTINACION UTILIZANDO C1q



rectamente utilizando el grado de aglutinación observado, registrándolo en número de cruces, en base a la aglutinación producida por el control Clq-LÁIgG.

Para la evaluación cuantitativa de complejos inmunes preparados in vitro, a diferentes concentraciones de antígeno (10, 20, 50 veces el antígeno en exceso), se grafican los datos obtenidos; en la abscisa concentración de complejos inmunes y en la ordenada título de dilución o número de pozo.

Se espera que la unión entre Clq y complejos inmunes se efectúe en forma proporcional a sus concentraciones, si esto ocurre la inhibición de la aglutinación estará determinada por una variación lineal. Así, a mayor concentración de complejos inmunes menor será el grado de aglutinación. Por lo cual se espera la gráfica de una recta con pendiente negativa.

El tipo de gráfica, puede no ser lineal, ya que esta relación estará determinada por el consumo de Clq en el sistema. En este caso se tendrá que determinar la ecuación de la curva obtenida.

Para este sistema el porcentaje de inhibición de la aglutinación puede ser obtenido con la siguiente relación:

$$\frac{b}{a - c} = X \text{ 100 \% de Inhibición de Aglutinación}$$

donde:

- a control (amortiguador, Clq, L $\bar{A}$ IgG)
- b problema (amortiguador, SHP, Clq, L $\bar{A}$ IgG)
- c blanco (amortiguador, SHN, L $\bar{A}$ IgG)

La reacción de aglutinación y los procesos para-  
obtener los reactivos son en su mayoría fáciles de desarro-  
llar y requieren de aparatos básicos para un laboratorio -  
bien equipado.

## C O N C L U S I O N E S

Hemos observado que la mayoría de los métodos -- analizados en el capítulo tercero, utilizan sustancias -- marcadas con isótopos radioactivos como indicadores en la cuantificación de complejos inmunes. Los radioensayos, -- son técnicas de alta sensibilidad y confiabilidad que re-- quieren de personal capacitado para efectuarlos y llevar el mantenimiento adecuado del equipo utilizado en este tipo de análisis.

Para la mayoría de los laboratorios clínicos es difícil la adquisición de equipos para radioensayo, principalmente por su costo. Por lo que creemos sería de utilidad práctica el uso de métodos que no requieran equipos -- muy sofisticados, lo cual representaría una gran ventaja -- para este tipo de laboratorios, puesto que en la actualidad la determinación de complejos inmunes está adquiriendo importancia, debido a la presencia de estas sustancias en una gran variedad de estados patológicos.

Aunque el proyecto presentado, tendría al igual que los métodos antes descritos, el inconveniente de la actividad enlazante de Clq a otras sustancias diferentes de

los complejos inmunes, entre las que se encuentran endotoxinas bacterianas, factor reumatoide, ADN, etc., existen posibilidades para eliminar o disminuir estas interferencias.

El tratamiento con DNasa, centrifugación, reducción y alquilación, inactivación y dilución de los fluidos biológicos, son procedimientos que nos permiten obtener un material adecuado para ensayos que utilizan Clq como molécula principal en la detección de complejos inmunes.

En este proyecto se elimina la posibilidad de usar sueros que contengan factor reumatoide debido a la actividad específica que existe entre este factor y el reactivo látex cubierto de IgG.

A reserva de comprobarlo experimentalmente, los conocimientos teóricos y prácticos con que contamos, nos inclinan a pensar en la utilidad de este diseño. Ya que estamos partiendo de una técnica de sensibilidad muy aceptable, como lo es la inhibición de la aglutinación; además las propiedades de cada una de las moléculas que se pretende utilizar favorecen este sistema.

En cuanto a la importancia de esta determinación, sabemos que la detección de complejos inmunes se utiliza en investigación, para estudiar la evolución de las enfermedades autoinmunes y principalmente el papel patogénico,

así como, el comportamiento de los complejos inmunes antes y después de la aplicación de la terapia.

## R E S U M E N

Se establece una comparación entre los sistemas seguidos actualmente para medición de complejos solubles presentes en sueros y preparados artificiales. Se presentan dos grupos principales: a) pruebas de precipitación de complejos con Clq, b) pruebas de desviación de Clq. Se propone un métodos de evaluación perteneciente al grupo b, basado en la competencia por la fijación de Clq, entre complejos solubles y partículas de látex cubiertas de IgG.



## B I B L I O G R A F I A

1. Agnello V., Winchester R. S. and Kunkel H. G. Precipitation reaction of the Clq component of complement with aggregated  $\gamma$ -globulin and immune complexes in gel-diffusion. *Immunology* 19:909-919, 1970.
2. Andrews B. S. and Penny R. The role of immune complexes in the pathogenesis of disease. *Aust. N. Z. J. Med.* 6:591-602, 1976.
3. Augener W., Grey H. M., Cooper N. R. and Muller Eberhard J. H. The reaction of monomeric and aggregated-immunoglobulins with Cl. *Immunochemistry* 8:1011-1020, 1971.
4. Burnet F. Macfarlane. *Immunology, Aging and Cancer. - Medical aspects of mutation and selection.* W.H. Freeman and Company, 1976.
5. Creighton W. D., Lambert P. H. and Miescher P. A. Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethyleneglycol. *J. Immunol.* 111(4):1219-1227, 1973.
6. Davis B. D., Dulbecco R., Einsen H. N. Ginberg H. S., Wood W. B. and McCarty M. *Microbiology.* Harper International. 2a. ed., 1973.
7. Ewald R. W. and Schubart A. F. Agglutinating activity of the complement component Clq in the F-II Latex fixation test. *J. Immunol.* 97(1):100-105, 1966.

8. Farrell C., Bolth B., Nielsen H., Daugharty H., Lundman T. and Svehag S. E. A survey for circulating - immune complexes in patients with acute myocardial-infarction. Scand. J. Immunol. 6:1233-1240, 1977.
9. Farrell C., Sogaard H. and Svehag S. E. Detection of-IgG aggregates or immune complexes using solid phase Clq and protein A-rich Staphylococcus aureus as-an indicator system. J. Immunol. 4:673-680, 1975.
10. Fletcher D. S. and Lin T. Quantitation of immune complexes by competitive inhibition of binding of Clq-to insoluble IgG aggregates. J. Immunol. Methods -- 15:39-45, 1977.
11. Funderberg H. Are autoimmune diseases immunologic deficiency states? Immunobiology (Good R. A.). - - - Sinauer Associates Inc. 7a. ed., 1974.
12. Hughes-Jones N. C. and Gardner B. The reaction between the complement subcomponent Clq, IgG complexes and-polyionic molecules. Immunology 34:459-463, 1978.
13. Ishizaka T., Tada T. and Ishizaka K. Fijation of C' - and C'1a by rabbit G- and M-antibodies with particu late and soluble antigens. J. Immunol. 100(6);1145 1153, 1968.
14. Kabat y Mayer. Inmunoquímica Experimental. Prensa - Médica Mexicana. 1a. ed. (español), 1968.
15. Knobel H. R., Villiger W. and Isliker H. Chemical ana lysis and electron microscopy studies of human Clq- prepared by different methods. Eur. J. Immunol. -- 5:78-82, 1975.

16. Kronvall G. Protein A-an "incomplete" staphylococcal-agglutinin. Acta Path. Microbiol. Scand. Section B 78:127-128, 1970.
17. Mayer M. M. The Complement System. Immunology (Burnet F.). W. H. Freeman and Company, 1976.
18. Nydegger U. E., Lambert P. H., Gerber H. and Miescher P. A. Circulating immune complexes in the serum in - systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. J. Clin. Invest. 54:297-309, -- 1974.
19. Painter R. H. Evidence that Clt (amyloid-P-component) is not a subcomponent of the first component of complement (C1). J. Immunol. 119(6):2203-2205, 1977.
20. Pinteric L., Assimeh S. N., Kells D. I. and Painter - R. H. The ultrastructure of Clt, a subcomponent of - the first component of complement: on E. M. and ultracentrifuge study. J. Immunol. 117(1):79-83, -- 1976.
21. Porter R. R. Structure and activation of the early -- components of complement. Fed. Proc. 36(9):2191- -- 2196, 1977.
22. Porter R. R. and Reid B. M. The biochemistry of com--plement. Nature 275:699-704, 1978.
23. Reid B. M. and Porter R. R. Subunit composition and - structure of subcomponent Clq of the first compo- - nent of human complement. Biochem. J. 155:19-23, -- 1976.

24. Roitt I. Essential Immunology. Blackwell Scientific - Publications 3a. ed., 1977.
25. Rosen R. D., Reisberg M. A., Hersh E. M. and Gutterman J. U. The Clq binding test of soluble immune -- complexes: Clinical correlations obtained in pa -- tients with cancer. J. Natl. Cancer Inst. 58(5); - 1205-1215, 1977.
26. Sledge C. R. and Bing D. H. Binding properties of the human complement protein Clq. J. Biol. Chem. 218: - 2818-2823, 1973.
27. Sobel A., Bokisch V. A. and Müller-Eberhard H. J. Clq deviation test for the detection of immune complexes, aggregates of IgG, and bacterial products in human-serum. J. Exp. Med. 142:139-150, 1975.
28. Sobel A., Gabay Y., Lagrue G. Recherche de complexes-immuns circulants par le test de déviation de la -- fraction Clq du complément. Nouv. Presse Méd. 5:1465 1467, 1976.
29. Svehag S. E. A solid-phase radioimmunoassay for Clq-binding immune complexes. Scand. J. Immunol. 4:687 697, 1975.
30. Taylor P. A., Fink S., Bing D. H., Painter R. H. Further studies on the identification of the subcomponents of the first component of complement after -- affinity chromatography of human serum on IgG-Sepharosa. J. Immunol. 118(5):1722-1727, 1977.

31. Thompson J. J. and Hoffman L. G. Cooperative binding-  
of a complement component to antigen-antibody com-  
plexes-II. Effect of variations in temperature and  
ionic strength. *Immunochemistry* 11:537-541, 1974.
32. Yonemasu K. and Stroud R. M. Clq: rapid purification-  
method for preparation of monospecific antisera and  
for biochemical studies. *J. Immunol.* 106(2):304-313,  
1971.
33. Zubler R. H., Lange G., Lambert P. H. and Miescher P.  
A. Detection of immune complexes in unheated sera -  
by modified I<sup>125</sup>-Clq binding test. *Immunology* - -  
116:232-235, 1976.