



11201
293

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

DETERMINACION INMUNOENZIMATICA DE
ANTICUERPOS ANTIPROTEINA BASICA DE MIELINA
EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MULTIPLE
REMITENTE RECURRENTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN

PATOLOGIA CLINICA

P R E S E N T A:

DRA. ELIZABETH DIAZ MARTINEZ



MEXICO, D. F.

1999

275586

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**Determinación Inmunoenzimática de
Anticuerpos Antiproteína Básica de
Mielina en Pacientes con Esclerosis
Múltiple Remitente Recurrente.**

No. de Registro: 980332
Comité de Investigación Zonal.


ASESOR QUÍMICO

Química Lourdes Irigoyen Coria
Jefe de Laboratorio de Inmunología
HECMN "La Raza", IMSS.

ASESOR MÉDICO

Dra. Noemí Santos Caballero
Médico Neurólogo
Hospital Fundación Médica Sur.



PAUSA

De vez en cuando hay que hacer
una pausa.

Contemplarse a sí mismo
sin la fricción cotidiana.

Examinar el pasado
rubro por rubro
etapa por etapa
baldosa por baldosa

Y no llorarse las mentiras
sino contarse las verdades.

MARIO BENEDETTI.

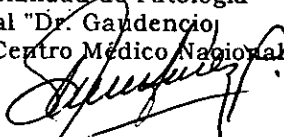
"LO MARAVILLOSO DE APRENDER
ALGO, ES QUE NADIE PUEDE
ARREBATÁRNOSLO".

AGRADECIMIENTOS

DR. EMILIO VILLALOBOS CUEVAS.
Director del Hospital "Dr. Gaudencio
González Garza", Centro Médico Nacional
"La Raza", IMSS.

DR. EMILIO ESCOBAR PICASSO.
Jefe de la División de Enseñanza e
Investigación del Hospital "Dr. Gaudencio
González Garza", Centro Médico Nacional
"La Raza", IMSS.

DRA. MARÍA DEL ROSARIO MARTÍNEZ
SÁNCHEZ.
Titular de la Especialidad de Patología
Clínica del Hospital "Dr. Gaudencio
González Garza", Centro Médico Nacional
"La Raza", IMSS.



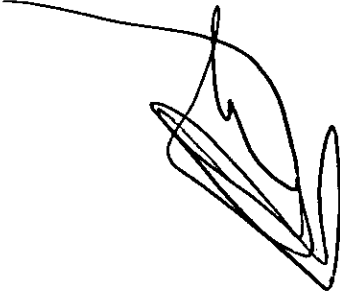
DRA. ALICIA GRAEF SÁNCHEZ.
Directora del Hospital de Especialidades del
Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS.

DR. ARTURO ROBLES PÁRAMO
Jefe de la División de Enseñanza e
Investigación del Hospital de Especialidades,
Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS.

DR. NOÉ SAÚL BARROSO RODRÍGUEZ.
Jefe de la División Médica del Hospital de
Especialidades, Centro Médico Nacional
"La Raza", IMSS.

INDICE

Investigadores	2
Introducción	3
Planteamiento del problema	5
Objetivos	6
Hipótesis	7
Hipótesis nula	7
Tipo de estudio	8
Definición de variables	9
Tamaño de la muestra y ámbito de los pacientes	10
Material y método	11
Criterios de inclusión	15
Criterios de exclusión	15
Recursos	16
Aspectos éticos	17
Resultados	19
Discusión	27
Conclusiones	29
Bibliografía	30



INVESTIGADORES

Investigador Principal.

DR. NOÉ SAÚL BARROSO RODRÍGUEZ.
Jefe de la División Médica.
Hospital de Especialidades Centro Médico
"La Raza" IMSS. (HECMN "La Raza" IMSS).
Seris y Zaachila s/n Col. La Raza. C.P.
02990.

Investigadores Asociados.

Química: LOURDES IRIGOYEN CORIA.
Jefe de Laboratorio de Inmunología
Clínica.
HECMN "La Raza". IMSS.
Seris y Zaachila s/n Col. La Raza. C.P.
02990.
Tel. 724-5900 ext. 1081 y 1082.

Q.B.P. LILIA ALVARADO FÉLIX.
Adscrita al Laboratorio de Inmunología
Clínica. HECMN "La Raza". IMSS.
Seris y Zaachila s/n Col. La Raza. C.P.
02990.
Tel. 724-5900 ext. 1081 y 1082.

DRA. NOEMÍ SANTOS CABALLERO.
Médico Neurólogo.
Hospital Fundación Médica Sur.
Puente de Piedra 150-301. Col. Toriello
Guerra. C.P. 14050.
Tel. 606-4808.

DRA. ELIZABETH DÍAZ MARTÍNEZ.
Residente de 3er. año de Patología
Clínica.
Hospital Gaudencio González Garza.
CMN "La Raza". Calz. Vallejo y Circuito
Interior s/n Col. La Raza C.P. 02990.
Tel. 724-5916, 7245900 ext. 2505 y 2506.

INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC), cuya característica es la aparición de lesiones inflamatorias, y destrucción secundaria de la mielina, con una total o relativa preservación de las neuronas y sus prolongaciones. (1)

Se argumentan múltiples hipótesis a su etiopatogenia(2), involucrando bases similares a la Encefalomiелitis autoinmune experimental: susceptibilidad basada en genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-DR2,DQB1 y DR11), aumento en la actividad coestimuladora de las células presentadoras de antígenos o disminución en la activación de la apoptosis, inducidas por las células T autoreactivas en el SNC. (3,4) Se considera a la Proteína Básica de la Mielina (PBM) un auto antígeno (Auto-Ag) blanco, como consecuencia del mimetismo molecular (regiones 87-106 de la PBM) para algunos virus (paramixovirus, retrovirus y superantígenos). (5,6,7,8,) Se ha considerado que ante diversas infecciones, la EM aparece secundariamente como una respuesta autoinmune (1) mediada por células T y B y desregulación de la respuesta inmune.

La EM es incapacitante, inicia entre los 20 y 40 años. En nuestro país tiene una prevalencia de 6 x 100,000 habitantes (1,5), es más frecuente en adultos jóvenes mujeres en proporciones de 1.4:1 y 2:1.(1)

El diagnóstico definitivo de EM se realiza mediante evaluación clínica, exámenes

de laboratorio, estudios neurofisiológicos y de imagen.

La EM definitiva puede evolucionar en 5 formas clínicas: EM Remitente Recurrente (EMRR), EM Secundariamente Progresiva (EMRP), EM Progresiva Remitente (EMPR), EM Primariamente Progresiva (EMPP) y EM Remitente Progresiva (EMRP). (9)

El comportamiento de la enfermedad es muy variable desde el punto de vista clínico; por este motivo se han implementado escalas de evaluación clínica que dan la oportunidad de medir, la severidad y evolución de los signos y síntomas con la escala de Estado de incapacidad ampliada (EDSS) de Kurtzke (10) aceptada internacionalmente.

La fisiopatología no se conoce completamente; la histopatología de las lesiones de desmielinización primaria (1), producidas por las células inflamatorias perivasculares (linfocitos, células plasmáticas, astrocitos) que invaden la zona donde se formará la placa y posteriormente tiene lugar la gliosis, con multiplicación astrocitaria y aberrantes intentos de remielinización, proliferación de oligodendrocitos en los bordes de la lesión, depósito central de inmunoglobulina y la proporción que guardan las subpoblaciones de células T (CD8+ y CD4+) presentes en los bordes dependen del momento evolutivo de la placa.(6)

La PBM (Auto Ag) es la más estudiada, su peso molecular con electroforesis DSS

es de 18400-19500 D con alto contenido de aminoácidos básicos (arginina, prolina, serina, etc.), poderosamente antigenica. Existen diversos tipos de PBM: PBM clásica (PBMC), isoformas de PBM (IPBM) y PBM "golli" (PBMG).

La PBM constituye el 30% de la mielina, en el adulto se sintetiza en los oligodendrocitos (11,12). Aunque la PBM puede ser secuestrada junto a la barrera hematoencefálica (BHE), recientemente se han demostrado IPBM en tejido linfoide (PBMG), con secuencias de aminoácidos que se comparten con la PBMC y que son reconocidas por las clonas T específicas para PBM; que corresponden al epitopo 83-99 de la PBM.

La respuesta inmune de la PBM con restricción del CMH, fenotipo T-CD4 produce la actividad citolítica que sugiere diferencia de habilidad en el procesamiento y presencia de epitopes durante la tolerancia central o periférica (5) se han reportado cambios conformacionales de la estructura tridimensional de la PBM, en especial del segmento tripolina (residuos 99-101) como un mecanismo de desmielinización (13). Los Acs IgG contra proteínas del SNC en la EM se han determinado en suero y LCR por las Técnicas de electroforesis DSS-PAGE, Immunoblot, Isoelectroenfoque y blotting por afinidad (14) y RIA (15), Inmuno-histoquímicos, cultivos celulares (16) y ELISA (17). Para la determinación de Acs anti PBM por los métodos inmuno-enzimáticos, se han empleado como Acs;

la PBM obtenida de: conejo, bovino, humana y cuyo. La PBM bovina es similar a la humana (18); se ha demostrado que los Acs de conejo contra PBM reaccionan con los residuos 68-86 de cuyo, y que corresponden al residuo 82-88 de la PBM humana; por lo que los antisueros comerciales de conejo muestran reactividad cruzada con el humano (19). El Ag PBM bovino o de conejo altamente purificado y empleado en la sensibilización de placas de ELISA debe ser reconstituido con agua bidestilada a un ph de 4.8 y congelar inmediatamente para evitar la formación de dímeros y su desnaturalización. (18) La PBM actúa como Auto Ag con la participación del HLA(21) e induce la formación de Auto Acs naturales conservados evolutivamente, isotipo IgM con polireactividad, baja afinidad y avidéz (3), ambos se han determinado por ELISA en una concentración mínima de 0.25ng/ml y 0.20ng/ml respectivamente. (19 y 20).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los pacientes con EMRR presentan anticuerpos séricos anti-PBM?

¿Existe relación entre la evidencia de anticuerpos séricos anti PBM y la Escala de EDSS clínica de Kurtzke?

OBJETIVOS

Implementar y estandarizar una metodología de ensayo inmunoenzimático (ELISA) capaz de detectar la presencia de AC. séricos anti-proteína básica de mielina en pacientes con EMRR.

Demostrar si existe correlación entre la presencia de Ac. séricos elevados anti-proteína básica de mielina en pacientes con EMRR y la escala de EDSS clínica de Kurtzke.

HIPÓTESIS

Los pacientes con EMRR tienen anticuerpos séricos elevados anti PBM.

La presencia de Anticuerpos séricos elevados anti-PBM se correlaciona con la escala de EDSSS clínica de Kurtzke.

HIPÓTESIS NULA

Los pacientes con EMRR no tienen anticuerpos séricos elevados anti PBM.

La presencia de Anticuerpos séricos elevados anti-PBM no se correlaciona con la escala de EDSSS clínica de Kurtzke.

HIPÓTESIS

Los pacientes con EMRR tienen anticuerpos séricos elevados anti PBM.

La presencia de Anticuerpos séricos elevados anti-PBM se correlaciona con la escala de EDSSS clínica de Kurtzke.

HIPÓTESIS NULA

Los pacientes con EMRR no tienen anticuerpos séricos elevados anti PBM.

La presencia de Anticuerpos séricos elevados anti-PBM no se correlaciona con la escala de EDSSS clínica de Kurtzke.

TIPO DE ESTUDIO

PROSPECTIVO

TRANSVERSAL

OBSERVACIONAL

COMPARATIVO

DEFINICIÓN DE VARIABLES

DEPENDIENTES

Escala de EDSSS clínica de Kurtzke.

Grupo de pacientes EMRR: suero
(10 ml)

Grupo de control sujetos sanos: suero
(5ml)

INDEPENDIENTES

Técnica Inmunoenzimática (ELISA)
para la determinación de Ac. anti-
proteína básica de mielina.

TAMAÑO DE LA MUESTRA Y ÁMBITO DE LOS PACIENTES

El tamaño de la muestra se considera de 22 pacientes de acuerdo al método estadístico de inferencia. Se analizarán los sueros tomados al grupo de pacientes con EMRR (30 pacientes) que estaban en tratamiento de interferón beta, en el mes de junio y noviembre (1996), 12 y 17 meses de tratamiento respectivamente, así como al grupo control sano, 50 sueros de donadores sanguíneos del Banco de Sangre.

Los pacientes estuvieron en conocimiento del procedimiento a realizar, y previa firma del informe de consentimiento informado se les citó al laboratorio de Inmunología. La fecha de la toma de muestra se les hizo llegar mediante un citatorio por vía telefónica.

Las muestras sanguíneas (10 c.c. dos ocasiones) se tomaron en ayuno, sin anticoagulante. Fueron centrifugadas y los sueros guardados en un congelador de laboratorio (-70°C), etiquetadas con el nombre de cada paciente, fecha y motivo de estudio, para poder procesarlas posteriormente.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL BIOLÓGICO.

Ver tamaño de muestra y ámbito de los pacientes.

(p-nitro fenil fosfato), este se reduce y el desarrollo de color es directamente proporcional a la concentración de Ac PBM.

TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA (ELISA)

INTRODUCCIÓN

Para implementar la técnica Inmunoenzimática (ELISA) se realizarán cinéticas antígeno (Ag-Ac, sensibilizando tiras de Inmunolon II con 5 diferentes concentraciones de PBM de conejo y bovino, con un rango de 0.00025 a 25 ng/ml (50 ul en cada pozo), las diferentes concentraciones de Ag se llevarán a cabo en agua bidestilada y a la vez en PBS/SFB al 10%, para valorar cual de ellos sensibiliza las placas de Inmunolon II.

Incubando toda la noche a 4°C; las fases sólidas se pobrarán con tres diferentes concentraciones de Ac, diluciones del suero, 1:5, 1:10; 1:50. Se graficarán y analizarán las distintas cinéticas Ag/Ac, con la finalidad de encontrar la concentración óptima de Ag y Ac en la zona de linealidad y sensibilidad de la técnica.

FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA.

Los Ac anti PBM al reaccionar específicamente contra PBM forman un complejo Ag-Ac que al adicionar un conjugado anti-IgG o IgM-FA, se une para formar un complejo Ag-Ac-Ac y posteriormente al adicionar el sustrato

MATERIAL Y EQUIPO.

1. Pipetas automáticas con volúmenes variables de 1 a 500ul.
2. Tubos de ensaye de 13x100mm.
3. Tiras de poliestireno o placas de inmunolon II COSTAR catálogo No. 2580.
4. Gradilla metálica.
5. Puntas amarillas para pipeta automática.
6. Vaso de precipitados de 100, 500ml matraces aforados de 250 y 1000ml.
7. Pipetas graduadas 2 y 10ml.
8. Agitador de vidrio y magnético.
9. Porta placas de tiras de inmunolon II.
10. Baño María a 56°C.
11. Balanza analítica.
12. Cantrifuga clínica.
13. Lector de ELISA.

14. Conjugado de fosfatasa alcalina (FA) IgG e IgM, frasco de 1ml marca Sigma, conservada en refrigeración.
15. p-nitrofenilfosfato tabletas de 5mg marca Sigma, conservar en refrigeración.
16. Suero fetal bovino frasco 100ml marca Sigma, guardar en congelación a -4°C .
17. Amortiguador fosfatos salinos (PBS) 0.01 M Ph 7.4 y 4.8.
18. Glicina frasco de 500g Q.P., marca Sigma RTA.
19. ZnCl frasco de 500g Q.P., marca Sigma RTA.
20. MgCl $6\text{H}_2\text{O}$, marca Sigma RTA.
21. NaOH 2N.
22. PBM bovina y de conejo marca Sigma.
23. Kit de IFI para determinar anti PBM (sustrato Médula Espinal Humana).
3. Pipetar 50 microlitros de cada solución en cada pozo de cada placa referida como IA, IIA, IIIA, IVA, VA.
4. Dejar en refrigeración de 18 a 20 hrs. (Toda la noche).
5. Amortiguador de fosfatos salinos (PBS), con suero fetal bovino (SFB) inactivado al 10%.
A) Descongelar el SFB e inactivar a 56°C por 30 mins. en baño María.
B) Disolver el PBS correspondiente a 0.01 M aproximadamente en 200 ml; agregar 100ml de SFB inactivado y aforar cbp 1000ml con agua bidestilada.
6. Amortiguador de glicina (preparación del sustrato, 100 ml).
Glicina 0.1M .7507g.
MgCl 0.001M .0203g.
ZnCl 0.001M .0136g.

Pesar exactamente y disolver en 50ml de agua bidestilada y agregar 1ml de NaOH 2N.

Ajustar el pH a 10.9 y una vez ajustado aforar cbp 100ml, verificar que no se formen precipitados, y la solución se encuentre transparente, guardar en refrigeración.
7. Sustrato de glicina-p-nitro fenilfosfato
p-nitrofenilfosfato, 2 pastillas de 5mg, amortiguador de glicina 10ml.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

1. Sensibilización de tiras con el Ag (PBM bovina y de conejo).
2. Preparar soluciones de 0.00025, 0.0025, 0.025, 0.25, 2.5, 25 ng/ml

8. Titulación del conjugado anti IgG e IgM FA.

Diluir los conjugados cpm PBS/SFB al 10%, 1:2000, 1:5000 y 1:10000.

TÉCNICA.

1. Sensibilizar con las diferentes soluciones de PBM (0.00025-25 ng/ml) cada placa de Immunolon II en un volumen de 50 ug/ml por pozo. (Cada concentración por triplicado en diferente placa).

2. Dejar en reposo toda la noche en refrigeración.

3. Adicionar a cada pozo 350 ul de PBS/ SFB al 10% y dejar reposar a temperatura ambiente por durante dos horas (bloqueo de placas).

4. Diluir los sueros 1:5, 1:10, 1:50 con PBS/SFB al 10% o agua bides-tilada.

5. Transcurrido el tiempo de incubación del paso 3 descartar el PBS escurriendo perfectamente la placa.

6. Adicionar a la placa 200ul de las muestras diluidas (paso 4).

7. Incubar 1 hr. a temperatura ambiente.

8. Lavar tres veces con 350ul de PBS/SFB al 10% cada vez, escurrir perfectamente la placa.

9. Agregar los congelados diluidos (título óptimo) 200ul a cada pozo e incubar 1hr. a temperatura ambiente.

10. Hacer tres lavados con 350ul de PBS/SFB cada vez, escurrir perfectamente la placa.

11. Agregar 200ul de sustrato de p-nitro fenil fosfato diluido en amortiguador de glicina. Incubar 1hr. a temperatura ambiente en la obscuridad.

12. Parar la reacción con 50ul de NaOH 2N.

13. Leer inmediatamente a 405nm.

CÁLCULOS.

$$UA = \frac{\text{DO de la muestra problema} - \text{DO del blanco}}{\text{DO del pool Normal} - \text{DO del blanco}}$$

UA= Unidades Arbitrarias

DO= Densidad Óptica.

$$\text{Valor de Corte} = \frac{\text{DO problema} - \text{Blanco}}{\text{DO } \bar{X} \text{ Normal Alto} - \text{Blanco}}$$

14. Se calcularán los valores de confiabilidad (CV, especificidad, sensibilidad, VP(+), VP(-)).

15. La especificidad de los Acs anti PBM se estudiarán por comparación contra métodos histoquímicos como la Inmunofluorescencia (IFI).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

1. Pacientes masculinos o femeninos.
2. Edad de 20a 45 años.
3. Diagnóstico definido de EMRR.
4. Haber estado en el protocolo de investigación: "Eficacia y seguridad de dosis reducidas del INF-B en la prevención y prolongación del tiempo de exacerbaciones en pacientes con EMRR. Estudio Multicéntrico".
5. Aceptación y firma de consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

1. Pacientes que habiendo estado en el protocolo: " Eficacia y seguridad de dosis reducidas INF-B, en la prevención y prolongación del tiempo de exacerbaciones en pacientes con EMRR. "Estudio Multicéntrico", no den autorización para venopunción y toma de la muestra.
 2. Alteraciones en la coagulación que contraindiquen la venopunción.
-
-

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

1. Pacientes masculinos o femeninos.
2. Edad de 20a 45 años.
3. Diagnóstico definido de EMRR.
4. Haber estado en el protocolo de investigación: "Eficacia y seguridad de dosis reducidas del INF-B en la prevención y prolongación del tiempo de exacerbaciones en pacientes con EMRR. Estudio Multicéntrico".
5. Aceptación y firma de consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

1. Pacientes que habiendo estado en el protocolo: " Eficacia y seguridad de dosis reducidas INF-B, en la prevención y prolongación del tiempo de exacerbaciones en pacientes con EMRR. "Estudio Multicéntrico", no den autorización para venopunción y toma de la muestra.
 2. Alteraciones en la coagulación que contraindiquen la venopunción.
-
-

RECURSOS

Se utilizarán los recursos físicos: Laboratorio de Inmunología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "La Raza", sin generar un costo adicional, considerando que la técnica inmunoenzimática (ELISA), cotidianamente se realiza en el laboratorio.

Los recursos materiales: tubos de ensayo, centrífuga, refrigerador, lector de ELISA, etc.

RECURSOS HUMANOS.

- Q.F.B. Jefe del laboratorio de Inmunología (H.E.C.M.R.).
 - Q.F.B. Adscrita al laboratorio de Inmunología (H.E.C.M.R.).
 - Residente de tercer año de Patología Clínica (H.G.G.G.C.M.R.).
 - Médico Neurólogo (H.E.C.M.R.).
 - Médico Neurólogo (H.Fundación Médica Sur).
-
-

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se determinarán la media y la desviación estandar de los resultados obtenidos de Acs anti PBM, y se calcularán los indicadores de confiabilidad de la prueba diagnóstica mediante tablas de contingencias de 2x2.

El Coeficiente de variación intraensaye.

Se evaluará la significancia estadística del grupo de EMRR vs. grupo Control Sano mediante pruebas no paramétricas, Chi cuadrada con corrección de Yates, y correlación de Pearson.

RESULTADOS

En la tabla 1 se describen los datos demográficos de los pacientes estudiados.

Se obtuvieron, a través de una cinética enzimática, las concentraciones óptimas tanto del Ag (PBM), como del anticuerpo (anti PBM) para la estandarización de la técnica de ELISA (tabla 2 y fig. 1).

Al realizar reactividad cruzada de los Acs anti PBM humanos con dos especies diferentes (bovino y conejo) encontramos una p no significativa en ambas. (tabla 3)

Las condiciones específicas que requiere la PBM para su estabilidad, en la cinética Ag-Ac se muestran en la tabla 4.

En relación a la determinación de Acs anti PBM en los pacientes con EMRR, fue mayor para el isotipo IgM con una P mayor a 0.001 en relación al isotipo IgG. (tabla 5 y fig.2)

Al comparar nuestro método (ELISA) con el inmunohistoquímico (IFI) se obtuvo mayor especificidad (98%) para éste último y menor sensibilidad (30%). (tabla 6)

Por último, no se encontró correlación entre la elevación de Acs anti PBM en suero y la Escala de EDSSS Clínica de Kurtzke. (fig.4)

TABLA 1. Características de los pacientes con EMRR y grupo control sano.

	NÚMERO	EDAD (RANGO)	SEXO
CONTROL	50	18-40	25F, 25M
EMRR	30	18-40	18F, 12M

TABLA 2. Cinética Ag-Ac, de anticuerpos anti PBM isotipos IgG e IgM en diferentes diluciones contra diferentes concentraciones de Ag; por el método ELISA.

Ag PBM - ISOTIPO IgG										
(Ac).	0025ng/ml		.025ng/ml		.25ng/ml		2.5ng/ml		25ng/ml	
DILUCIÓN	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS
1:5	.026	.009	.048	.015	.025	.010	.272	.010	.568	.006
1:10	.041	.039	.037	.006	.019	.014	.024	.018	.316	.008
1:50	.116	.132	.028	.017	.038	.011	.894	.200	.163	.224

Ag PBM - ISOTIPO IgM										
(Ac).	0025ng/ml		.025ng/ml		.25ng/ml		2.5ng/ml		25ng/ml	
DILUCIÓN	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS
1:5	.070	.044	.094	.116	.126	.071	.140	.122	.175	.121
1:10	.711	.155	.619	.031	.772	.056	.722	.047	.701	.044
1:50	.253	.073	.297	.110	.414	.123	.227	.116	.348	.080

TABLA 3. Comparación de la reactividad cruzada de los Acs anti PBM humana contra Ag PBM de 2 especies diferente (bovino, conejo)

	IgG		IgM	
	BOVINO	CONEJO	BOVINO	CONEJO
MEDIA (\bar{X})	.45	.63	.10	.37
DESVIACIÓN ESTANDAR (DS)	.56	.43	.84	.71
VR	(0-1.57 UA)	(0-1.49 UA)	(0-1.71 UA)	(0-1.79 UA)

IgG p.NS

IgM p.NS

TABLA 4. Características fisicoquímicas del Ag (PBM): solubilidad, pH y estabilidad para la cinética Ag-Ac del método ELISA.

	IgG		IgM	
	AGUA	PBS	AGUA	PBS
\bar{X}	1.7	.37	1.5	.95
DS	1.1	.63	.43	.48

pH: Se ajustaron a pH de 4.8 las soluciones de Ag (PBM) diluidos en agua y PBS (p 0.01).

A pH de 7.4 se observó desnaturalización e impresión de los resultados.

TABLA 5. Valores de referencia de anti PBM isotipo IgG e IgM en el grupo control vs. EMRR por el método ELISA.

	ANTI PBM IgG			ANTI PBM IgM		
	X	DS	Xi ²	X	DS	Xi ²
Control	.37	.63		.95	.48	
VR	(0-1.63 UA)			(0-1.44 UA)		
EMRR	.98	1.4	p.NS	2.12	1.04	p< 0.001

TABLA 6. Parámetros de confiabilidad de los métodos:ELISA e IFI para determinar anti PBM.

PARAMETRO	METODO ELISA		METODO IFI
	IgM	IgG	
Especificidad	96%	92%	98%
Sensibilidad	66%	7%	30%
VPP(+)	90%	33%	90%
VPN(-)	82%	62%	70%
CV	12%	15%	18%

VALOR DE CORTE IgG:2.2 IgM:4.2

Fig.1. Cinética Ag-Ac por el método ELISA.

ANTI-PBM

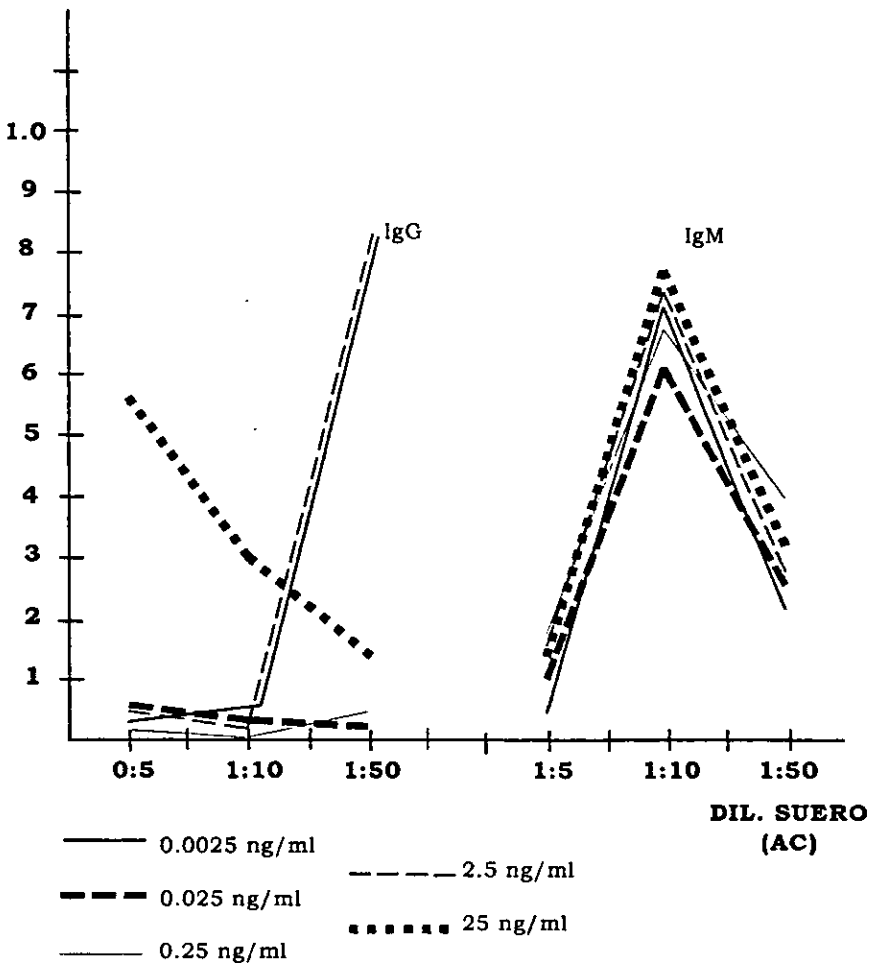


Fig.2. Valores de Anti PBM en el grupo control vs. EMRR

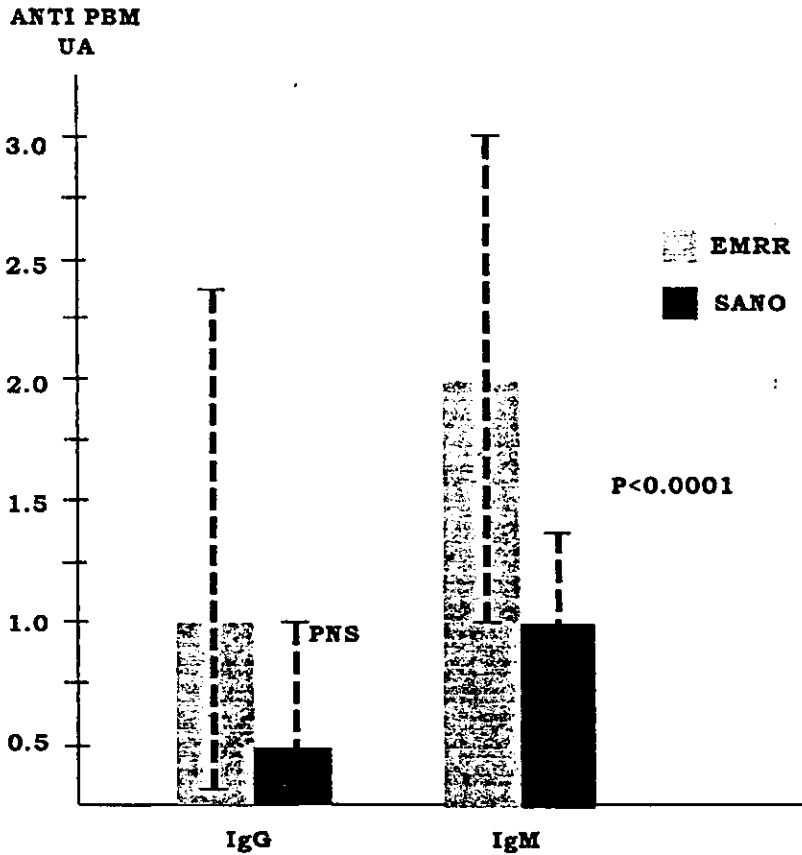


Fig.3. Correlación con la escala clínica de Kurtzke y anti PBM (ELISA o IFI)

**% POSITIVIDAD
DE Ac ANTI PBM**

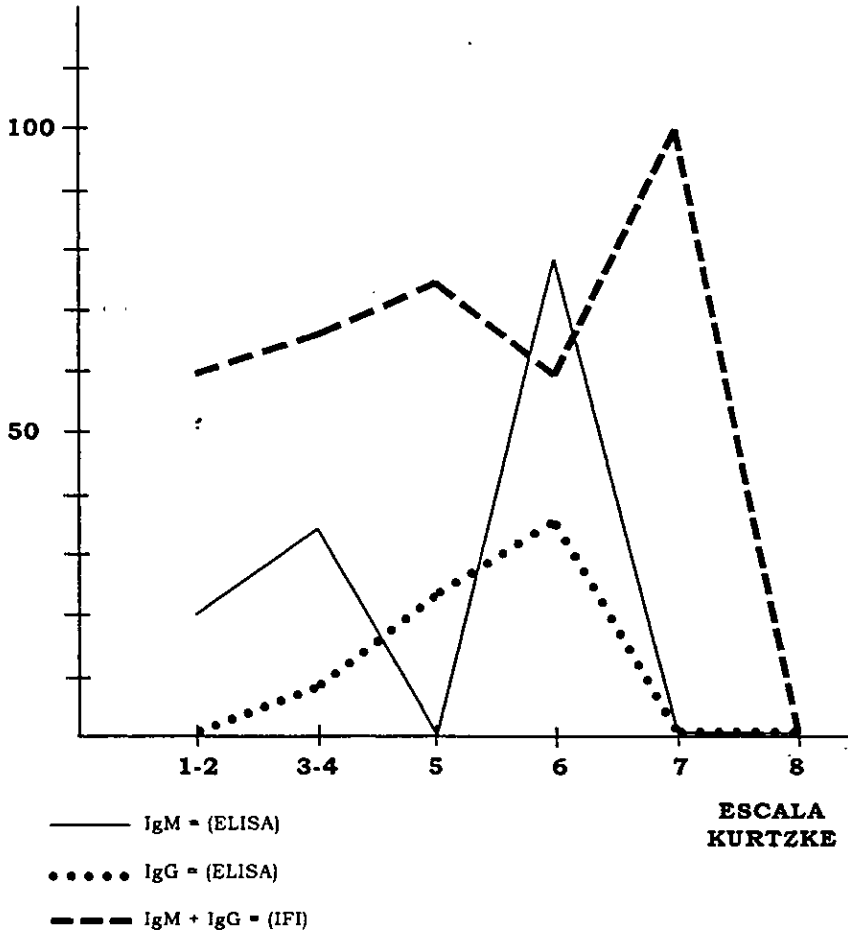
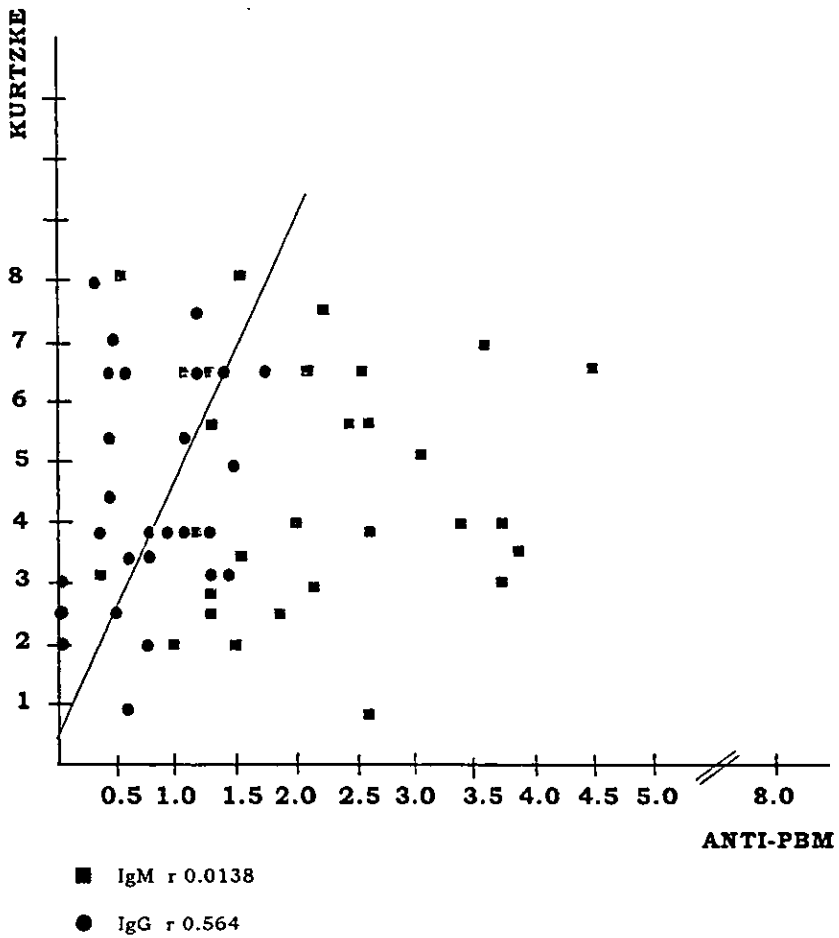


Fig. 4. Correlación de niveles de Acs anti PBM por ELISA y Escala de Kurtzke.



DISCUSIÓN.

El diagnóstico de la EM es difícil, ya que requiere de un examen clínico metódico, estudios neurofisiológicos, imagen (Resonancia magnética y potenciales evocados) y exámenes de laboratorio (VSG, PCR, Inmunoglobulina, bandas oligoclonales, etc.), estos últimos son inespecíficos debido a que la mayoría son marcadores presentes tanto en enfermedades inflamatorias, autoinmunes del SNC y otras. (1)

Por lo que consideramos importante tratar de evidenciar mediante marcadores serológicos más específicos, la patogénesis de la EM; así como apoyar y confirmar el diagnóstico y pronóstico de la misma.

Al implementar el método ELISA para determinar anti PBM en suero, comparamos la PBM de diferentes fuentes y evaluamos sus características químicas altamente antigénicas, corroborando que su liberación en procesos post-traumáticos, degenerativos, infecciosos, así como la susceptibilidad genética-HLA e inmunoregulación favorece la producción de anticuerpos anti PBM: naturales y patogénicos. (3, 20, 21)

Los anti PBM constituye solamente una pequeña proporción de la concentración de las inmunoglobulinas intratecal. (18) Para implementar la técnica de ELISA fue necesario, realizar cinéticas Ag-Ac encontrando: similitud antigénica de la PBM de conejo y bovino con la humana; por reactividad cruzada de los anticuerpos anti PBM naturales y patogénicos (isotipo IgG e IgM).

Se ha demostrado que en el segundo trimestre del embarazo hay un incremento de la PBM en fetos humanos; este conocimiento podría ser útil en el futuro y aplicar la antigenicidad de la PBM en algunas enfermedades de la mielina. (22)

La PBM es una proteína muy inestable, debido a su estructura química, por lo que requiere de condiciones específicas de solubilidad, pH, conservación y manejo para tener reproducibilidad en los resultados por el método de ELISA. (18)

La concentración óptima de Ag y Acs anti PBM de acuerdo a la cinética fue de 2.5 ng/ml y la sensibilidad de 0.0025 ng/ml que correlaciona con otros investigadores. (20,21)

Se detectaron Acs anti PBM en el grupo control sano (3) y en el grupo de EMRR predominando el isotipo IgM sobre el IgG. Los anticuerpos anti PBM isotipo IgM tiene una alta especificidad: 90%, un VP(+): 90% y sensibilidad del 66%; y al compararlos con el IFI, éstos últimos muestran mayor especificidad: 98%, y menor sensibilidad: 30%. Otros investigadores mediante Western blot y ELISA también han reportado elevaciones de Acs de las proteínas del SNC (proteínas ácidas fibrilares) con niveles altos de IgG intratecal, en pacientes neurológicos, con una p .05 (20,21), esto causa controversia, en cuanto a la utilidad de estas pruebas.

Al comparar la escala de Kurtzke y los niveles de anti PBM, no encontramos

correlación, probablemente debido a la variabilidad clínica e inmunológica de la EM, lo que coincide con nuestra hipótesis: sobre la alteración del mecanismo de inmunorregulación en la EMRR. También se ha reportado correlación entre anti PBM en LCR (unida) y PBM sérica (libre).

En pacientes con EM con enfermedad inactiva no se ha reportado elevación de IgG anti PBM, dato similar encontrado en nuestro estudio, ya que nuestros pacientes con EMRR estaban en remisión, los niveles bajos del isotipo IgG, podría sugerir un rol protector de anticuerpos anti-idiotipo (fig.4) que están involucrados en forma natural en la patogénesis de la enfermedad. (23)

En conclusión, el papel de la PBM y anti PBM, como prueba diagnóstica, no es específico, sin embargo juega un rol importante junto con la inmunorregulación en la patogénesis de la EM y sus formas clínicas.

ESTE MATERIAL DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

El método ELISA para la determinación de Acs anti PBM, resultó confiable con una sensibilidad y especificidad mayor para el isotipo IgM en relación al IgG en pacientes con EMRR tratados con interferon beta.

Para la implementación de la técnica de ELISA se requirió de una cinética Ag-Ac. El Ag empleado fue de PBM de conejo hidratado con agua bidestilada a un pH de 4.8 y las diluciones con PBS. La concentración óptima de Ag fue de 2.5ng/ml y la sensibilidad de nuestro método de .0025ng/ml.

Se demostraron niveles de auto anticuerpos naturales anti PBM en individuos normales, el IgM con mayor afinidad.

Al comparar los resultados de los niveles séricos anti PBM obtenidos por ELISA, contra el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) encontramos, mayor especificidad y valor predictivo positivo por el método de IFI y mayor sensibilidad para el método de ELISA.

En la EMRR con IFN Beta no encontramos correlación entre niveles séricos de anti PBM (IgM) y la Escala clínica de Kurtzke; para IgG, mayor correlación y probable efecto protector por regulación de anti-idiotipo. Es conveniente que para estudios posteriores se analicen, presencia de Acs anti PBM en las diferentes formas clínicas de EM.

BIBLIOGRAFÍA

1. FERNÁNDEZ, FD. *Epidemiología*, 1:28-42. En *esclerosis múltiple, una aproximación multidisciplinaria*. 1a. Edición Asociación Española de Esclerosis Múltiple (AEDEM). Editor científico: Oscar Fernández. 1994, Madrid, España.
2. HUGHES, RAC. Pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Royal Soc. Med.* 1992; 85:373-376.
3. MICHAEL, P. Pender genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cell as a cause of Multiple Sclerosis. *The Lancet*. 1998 Vol.351. 978-981.
4. HAFNER, D.A., Weiner, H.L. MS: A CNS and systemic autoimmune disease. *Immunology today*. 1989;10:104-107.
5. WEINSHENKER, B.G. Bass, B., Rice, G.P., et al. The natural history of multiple sclerosis; a geographically based study. *Brain* 1989; 112: 133-146.
6. WOODROOFE, M.N., et al. Detection of IL-1 and IL-6 in adult rat brain following mechanical injury. Evidence of role for microglia in cytokine production. *J. Neuroimmunol.* 1991; 33: 227-236.
7. WOODROOFE, M.N. Cytokine production in the CNS. *Neurology* 1995; 45:6-10.
8. FELDMANN, M. In meeting report and proceeding: Multiple sclerosis society of great criterion and Northern Ireland. Multiple sclerosis clinical and laboratory research. (1996;2:1-55). Cytokines in autoimmune disease: comparison of arthritis and multiple sclerosis (4-5).
9. LUBLIN, FD., Stephen C., Reingold. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Result of an international survey. *Neurology* 1996. Vol.46, 907-911.
10. KURTZKE, JF., Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (E.D.S.S.) *Neurology* 1983. 33: 1444-1452.
11. TRANQUILI, LR., Skinner E., Campagnoni C. Vergelli M., Hemmer B., Murano P., Marlin R., Mc Farland HF., Campagnoni AT., Voskuhl RR. Myelin basic protein (MPB) is a candidate autoantigen in disease multiple sclerosis. *J. Neurosci-Res.* 1996. Sep 15. 45(6) 820-8.
12. BRINKMAN, C.J.J., Nillesen WM, Hammes OR, Lamers KJB, De Pauw BEJ, Delmonte P. Cell-mediated immunity in multiple sclerosis as determined by sensitivity of different lymphocyte populations to various brain antigens. *Ann Neurol.* 1982. 11-45
13. RISDALE, RA. Beniav DR., Tomkins TA., Moscarello MA., Haranz G. Therss dimensional structure of myelin basic protein II molecular modelin and consideration of predicted structure in multiple sclerosis. *J. Biol Chem* 1997: feb 14, 272(7); 4269-75.

14. KAISER, Robert, W. Kaul, Mann R., Czygan W. IgG antibodies to CNS proteins in patients with protein in patients with multiple sclerosis. *Eur, J. Med-Res*, 1997; apr 221, 2(4): 169-72
15. ESIRI MN. Multiple sclerosis: a quantitative and cualitative study of immunoglobulin containing cells in the central nervous system. *Neurophatology and applied neuropathology and applied neurobiology*. 1980, 6-21.
16. COLOMBO, E., Banky K., Talum AH., Daucher J., Ferrante P., Murray RS., Phillips PE., Pearl A. Comparative analysis of antibody and cell mediated autoimmunity to tras aldolase and myelin basic protein in patiens with multiple sclerosis. *J. Clin Invest*, 1997: mar 15 99(60):1236-50.
17. WANG, R., Chen J., Zhou S., Li C. Enzyme-linked immunoadsorbent assay for myelin basic protein and antibodies to myelin basic protein in serum and CSF of patients whit diseases of nervous system. *Hva HSI I ko Ta Hauech Hauch Pao*. 1995, jun;26(2) 131-4.
18. HASHUM, G.A. Myelin basic protein structure function and antigenic determinants. *Immunological reviews* 1978;39:60-107.
19. MATSOO, A., Lee GG., Terai K., Takam K., Hickey WF., Mc Geer EG., Geer PL. Unmasking o fan unusual myelin basic protein epitope during the process of myelin degeneration in humans: a potential mechanism for the generation of autoantigen. *Ann J. Pathol*, 1997; apr, 150(4); 1253-66.
20. CHEN, J., Wang R., LI C., Xiong C., Wang D., Lin J. Simplified enzyme Linked immunoadsorbent assay for myelin basic protein and antibodies to myelin basic protein. *Hva Hsi I Ku TA. Hsuech Huach Pao*. 1995, jun;26(2) 125-130
21. WARREN, KG., Isleinham C., Fine L. Specificity of an body response to myelin basic protein in the central system in multiple sclerosis the minimal B epitope and model of its features. *Proc. Natl-Acad-Sci USA*. 1995, nov 21, 92(24) 1161-5.
22. GREVER, WE., Chiu FC., Tricohe M., et al. Quantification of myelin basic protein in the human fetal spinal cord during the midtrimester of gestation. *J. Comp-Neurol*. 1996, dec 9:376(2): 306-14.
22. WARREN, KG., Catz I. Correlation between cerebrospinal fluid myelin basic protein and anti-myelin basic protein in multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology*. 1987, feb 21(2) 183-9.