



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"CUAUTITLAN"

**METODOS PARA LA DETERMINACION DE COMPLEJOS
INMUNES EN ENFERMEDADES AUTOMUNES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

MARTHA ELBA GARCIA CABRERA

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. CARLOS E. SALAS CONTRERAS

CUAUTITLAN IZCALLI, MEXICO

1981



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

	PÁG.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	II
I.- RESUMEN.....	1
II.- INTRODUCCION.....	3
Propiedades biológicas de los complejos inmunes.....	3
Métodos para la detección de complejos inmunes.....	6
Métodos basados en las propiedades físicas de los... complejos.....	6
Métodos basados en las propiedades biológicas, con - especificidad para receptor de superficie.....	8
- Interacción con el complemento.....	8
- Interacción de complejos inmunes con los recepto- res Fc de las células.....	9
- Prueba de Agregación Plaquetaria.....	9
- Inhibición de anticuerpos citotóxicos.....	10
- Interacción con los receptores de los complejos in- munes celulares para complemento.....	10
- Inhibición de la formación de rosetas de linfoci- tos complemento dependiente.....	10
III.- OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	12
IV.- MATERIAL Y METODOS.....	13
- Separación de leucocitos por el Método de gradiente de densidad.....	13
- Método de sensibilización de eritrocitos de carne- ro con anticuerpo y complemento.....	14
- Suero inactivado por calor y absorbido.....	15
- Prueba de Inhibición de la Formación de rosetas - EAC.....	16

- Preparación de plaquetas.....	17
- Prueba de Agregación Plaquetaria.....	18
- Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio.....	19
- Inmunoelectroforesis.....	20
- Preparación de IgG agregada por calor.....	20
- Preparación de IgG agregada por calor unida a complemento.....	21
- Determinación de proteínas por el Método de folin modificado.....	21
V.- RESULTADOS.....	25
- Obtención del CI de LPA-SAC y del título de AP utilizando IgG agregada por calor, y correlación entre ambas pruebas.....	25
- Obtención del CI de LPR-SAC y título de AP en pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes...	30
VI.- DISCUSION.....	43
VII.- CONCLUSIONES.....	48
VIII.- REFERENCIAS.....	50

LISTA DE ABBREVIATURAS

PMN	Células polimorfonucleares
Fr	Fración cristalisable de las inmunoglobulinas
Ig	Inmunoglobulina
Componente C ₃	Tercer factor del complemento
IgG	Inmunoglobulina humana de la clase G
IgM	Inmunoglobulina humana de la clase M
AgAgO	Complejo inmune antígeno-anticuerpo unido a -- complemento
CI ₁	Primer factor del complemento
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
PBS	Felietileno glicol
BSA	Albumina sérica de bovino
LFB-RAG	Linfocito formador de rosetas-RAG
EAC	Eritrocito de camero recubierto con anticuerpo y complemento
CI	Coefficiente de Inhibición
AP	Agrupación Plaquetaria
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.8
PBS-D	Solución amortiguadora de fosfatos, de Dalbeco's sin Ca ⁺⁺ ni Mg ⁺⁺ y con 0.18 g/L de glucosa pH 7.8
RFP	Reactivo de folin fenol
RFC	Reactivo de folin cobre
Receptor Fr	Receptor sobre la superficie de las células en la fracción cristalisable de las Ig

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Tabla #1 Curva estándar de proteínas, por el método de folin modificado.....	22
Tabla #2 OI de LFB-EAC y título de AP de la IgG agregada por calor.....	26
Tabla #3 OI y título de AP de individuos normales.....	32
Tabla #4 OI y título de AP de pacientes con diversas afecciones.....	34
Figura #1 Curva estándar de proteínas, por el método de folin modificado.....	23
Figura #2 Curva estándar para la prueba del Factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC.....	27
Figura #3 Curva estándar para la prueba de Agregación plaquetaria.....	29
Figura #4 Correlación entre el título de AP y OI de LFB-EAC utilizando IgG agregada por calor.....	31
Figura #5 Título de AP y OI de LFB-EAC de pacientes activos e inactivos con Artritis reumatoide juvenil.....	36
Figura #6 Título de AP y OI de LFB-EAC de pacientes activos e inactivo con Dermatopolicosmitis.....	38
Figura #7 Porcentaje de rosetas LFB-EAC en pacientes e individuos normales.....	39
Figura #8 OI de LFB-EAC en pacientes e individuos normales.....	40
Figura #9 Título de AP en pacientes e individuos normales.....	42

I.- RESUMEN

Este trabajo surgió de la necesidad de implementar las técnicas disponibles para determinar complejos inmunes en suero de pacientes con enfermedad de: artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico, dermatopolimiositis y enfermedad de Weber Christian. Debido, a que de las que actualmente existen se desconoce su confiabilidad y correlación clínica, dado que los complejos inmunes interfieren con las funciones específicas de las células e inducen una reacción inflamatoria, la cual es considerada como su mayor consecuencia patológica. Se estudiaron las diferencias en las concentraciones de complejos inmunes en la etapa activa e inactiva de las enfermedades en estudio, y se correlacionaron los datos de las pruebas de agregación plaquetaria y factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC. De las pruebas realizadas se determinó que en las enfermedades de artritis reumatoide juvenil (3 casos clínicamente activos y 8 inactivos) y en dermatopolimiositis (4 casos clínicamente activos y uno inactivo) sí hay diferencia en las concentraciones de complejos inmunes en las etapas activa e inactiva, observándose una mayor concentración en la etapa activa. En las otras enfermedades estudiadas no fué posible determinar tal diferencia debido a la falta de material humano disponible, todos los pacientes con lupus eritematoso sistémico se encontraban en etapa inactiva, y con Weber Christian en etapa activa. La correlación obtenida en las pruebas de agregación plaquetaria y factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC fue de 0.87%, empleando como complejos inmunes formado -

"in vitro" IgG agregada por calor. Los índices normales obtenidos en ambas pruebas fueron de: Título de AP normal no mayor de una dilución 1:16 y el CI de LFR-EAC no mayor de 3.3%. La sensibilidad obtenida en las pruebas fue la siguiente: 3.78 ug/ml de IgG agregada por calor detectada con la prueba de agregación plaquetaria y en el factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC, 2 mg/ml de IgG agregada por calor inhibió aproximadamente un 50% de LFR-EAC. Con estos resultados se puede concluir que las pruebas de agregación plaquetaria y el factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC se pueden aplicar a la clínica diaria, para determinar complejos inmunes, en enfermedades con sospecha de autoinmunidad.

II.- INTRODUCCION

Los complejos inmunes se forman durante los procesos - infecciosos y en padecimientos autoinmunes: sin embargo, los complejos inmunes no representan más que, un evento biológico de origen insune.

Se ha considerado que los complejos inmunes, se forman "in vivo" durante la respuesta inmune humoral, y en presencia de moléculas de antígeno. Este proceso de formación de complejos inmunes, comúnmente no conduce a evidentes manifestaciones patológicas pero, puede ejercer una función fisiológica o interferir con la función celular (1,3).

Propiedades biológicas de los complejos inmunes: éstas dependen de la densidad del antígeno o de las moléculas agregadas de anticuerpo, si se comparan con las moléculas libres. Así mismo, los anticuerpos o antígenos agregados, se unen — más ávidamente a los receptores humorales o celulares que en forma libre. Los efectos biológicos de los complejos inmunes, son determinados por la interacción con los receptores celulares y humorales por lo que, el acoplamiento de los complejos inmunes a los receptores humorales, (C1q) puede activar al sistema del complemento y a sus mecanismos efectoras. También puede ocurrir el acoplamiento de los complejos a los receptores celulares para antígenos y para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (Fc) o para complejos unidos a los componentes del complemento (20). El reconocimiento celular de los complejos inmunes induce a que sean fagocitados o que estos ejerzan efectos de inflamación directa que dañan la función celular local. Por ejemplo: la fagocitosis

de los complejos por células polimorfonucleares (PMN) conduce a un aumento en la actividad metabólica liberando enzimas lisosomales al medio (1,3,5), sin embargo la actividad bactericida de estas células se deprime.

Otro efecto de los complejos inmunes puede ser la lisis o eliminación de las células como resultado de la unión de los complejos inmunes a la membrana (eritrocitos y plaquetas), y como efecto final, un daño tisular en el sitio donde se localizan (3,9).

In vivo, los efectos de los complejos inmunes dependen del sitio de su formación, de la naturaleza del antígeno y del anticuerpo, o bien de sus concentraciones relativas. Muchos de los complejos inmunes que aparecen en circulación son depurados rápidamente, por células Kuffer (4). Sólo una pequeña cantidad de estos complejos persiste algún tiempo, esto sucede cuando antígenos moleculares libres son presentados a concentraciones bajas y en forma constante denominados como persistentemente silenciosos. La depuración de estos complejos inmunes puede representar un mecanismo fisiológico para la eliminación rápida del antígeno. En algunas circunstancias, pequeñas cantidades de complejos inmunes pueden ser fijados a la pared celular o bien filtrados en las membranas, tales como la glomerular, o el plexo coroidal (3,9,27). Los complejos inmunes formados en el espacio extravascular no son depurados rápidamente y pueden inducir focos inflamatorios locales. Por lo que las consecuencias patológicas dependen de su concentración, la persistencia y la cronicidad de su formación. En algunas condiciones clínicas, se pueden observar cambios, entre la "poza" intra y extravas-

cular de complejos inmunes, pero esta no es una regla común ya que la enfermedad típica por complejos inmunes puede ocurrir en ausencia de complejos inmunes circulantes (2,3,4,9).

Si bien la reacción inflamatoria, inducida por complejos inmunes es considerada como su mayor consecuencia patológica, la interferencia de los complejos inmunes con las funciones específicas de las células puede representar su más importante efecto, en algunas enfermedades asociadas con la formación de los complejos inmunes.

Se usan dos métodos principalmente para la demostración de la existencia de complejos inmunes. El primero, por análisis de especímenes tisulares y el segundo, mediante el análisis serológico de las muestras de varios fluidos biológicos.

La sospecha de complejos inmunes, involucrados en las lesiones tisulares, se basa en la similitud que tienen con las lesiones observadas experimentalmente mediante, el estudio de los tejidos por técnicas histológicas (4) y microscopía electrónica. Por ejemplo: las lesiones observadas en glomerulonefritis, se han definido a través de modelo de estudio de animales (4). Sin embargo, las técnicas inmunohistoquímicas conducen a una demostración directa de los depósitos de inmunoglobulinas, asociadas con componentes del complemento y de algunos antígenos, en patrones que sugieren la presencia de complejos inmunes. Tales técnicas se han aplicando extensamente a muchos tejidos (3,4,5,9).

Los estudios serológicos han aportado evidencias para asociar a los complejos inmunes, con condiciones clínicas particulares: ya sea por detección directa o indirecta, o por la demostración de cambios serológicos asociados con la

formación de complejos inmunes. Por tal motivo, es necesario hacer una breve descripción de los métodos que existen actualmente para detectar complejos inmunes.

Métodos para detección de complejos inmunes: los métodos pueden ser separados en dos principales grupos: 1) métodos que detectan complejos inmunes, independientemente de la naturaleza del antígeno involucrado en la formación de los complejos, 2) métodos que conducen a la detección selectiva de complejos inmunes para un antígeno dado, a través de la discriminación entre el anticuerpo libre y el unido al antígeno (9).

Métodos basados en las propiedades físicas de los complejos. La formación de los complejos inmunes conduce a la creación de nuevas estructuras moleculares, caracterizadas por un incremento en el tamaño de la molécula y por cambios en las propiedades de superficie, solubilidad y carga eléctrica. La magnitud de estos cambios, puede depender de la naturaleza y de la concentración de cada constituyente del complejo inmune. Con estas bases, la ultracentrifugación analítica se ha aplicado para la detección de complejos inmunes, de tal forma que se han demostrado complejos inmunes en condiciones bien definidas. Como por ejemplo: se han demostrado por ultracentrifugación complejos IgG-IgM (22a) y complejos IgG-IgG (17a), en el suero de pacientes con artritis reumatoide (3,5).

Sin embargo, el uso exclusivo de ultracentrifugación analítica para la demostración de complejos inmunes no discrimina entre la presencia de complejos inmunes, de otro ma-

terial de peso molecular similar y que aparezcan en grandes cantidades en la muestra de suero, por lo que la sensibilidad del método es baja.

El uso de métodos preparativos, tales como los gradientes de sacarosa o ultracentrifugación selectiva, son una combinación de análisis físico y biológico para demostrar complejos inmunes.

Estos métodos pueden representar un importante paso en la purificación de los complejos inmunes: así mismo, se han aplicado en el estudio analítico de muchas condiciones clínicas, tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (2), sarampión, lepra y cáncer. Una desventaja de estas técnicas, es el tiempo que consumen y que difícilmente pueden ser utilizadas en la clínica diaria, para la detección de dichos complejos. Un procedimiento sencillo, para la identificación de complejos inmunes, es la precipitación en frío de las proteínas del suero. Las crioglobulinas, más frecuentes, representan un tipo de complejo inmune y con frecuencia se involucran inmunoglobulinas monoclonales y otras proteínas (8,16).

Algunas sustancias químicas son utilizadas para separar las proteínas del suero, de acuerdo a sus propiedades físicas por lo que también, pueden ser utilizadas para precipitar complejos inmunes y otras macromoléculas séricas, en condiciones donde las inmunoglobulinas libres permanecen solubles. La precipitación con polietilén glicol (PEG) peso molecular 6000 se ha aplicado a la clínica para separar complejos inmunes del suero. La adición del PEG al suero, forma un precipitado de proteínas que es proporcional a la concen-

tración de PBS (4,6,26).

La carga eléctrica de los complejos inmunes puede ser la del anticuerpo libre, por lo tanto la inmunoglobulina G - (IgG) acoplada puede mostrar una mayor afinidad para la resina de intercambio iónico (DEAE-celulosa) o una movilidad eléctrica alterada. Estas propiedades físicas dependen de la naturaleza del antígeno involucrado y se han utilizado más - en métodos antígeno específicos, que en la detección inespecífica de los complejos inmunes. Las cargas de superficie de los complejos inmunes con IgG, se han utilizado para adsorber partículas de látex sin recubrir (9).

Métodos basados en las propiedades biológicas, con especificidad para receptor de superficie. Las inmunoglobulinas en forma agregada, o la presencia de complejos inmunes - antígeno-anticuerpo unidos a componentes del complemento, se han utilizado para el reconocimiento de los receptores de la fracción cristalizante de la inmunoglobulina (F₀) y del 3o. factor del complemento (C₃) sobre la superficie celular - (20,24).

Interacción con el complemento. La interacción del - complejo inmune con el sistema del complemento es total o - parcial. Dos principales grupos de métodos se han considerado: el primer grupo involucra técnicas basadas en la inhibición competitiva de la actividad hemolítica o del reconocimiento de la unidad CIq, por los complejos inmunes se ha demostrado. La principal limitación de esta tecnología, es la reactividad inespecífica del sistema del complemento con - otros factores séricos (7,9,25).

Interacción de los complejos inmunes con los receptores Fc de las células. Un gran número de células leucocitarias muestran receptores para la porción Fc de algunas moléculas de las inmunoglobulinas (Ig), que permiten el acoplamiento de las inmunoglobulinas agregadas de los complejos inmunes, más que de las inmunoglobulinas monoméricas libres - (17, 20, 23, 24, 30).

Prueba de Agregación Plaquetaria (AP). Esta se basa en la agregación de plaquetas sanguíneas de humano en presencia de complejos inmunes. La agregación se debe al reconocimiento de los receptores de superficie Fc y C₃ de las plaquetas por los complejos inmunes. Esta agregación es estimada visualmente en placas de microtitulación (28). Se ha observado que las plaquetas pueden ser agregadas "in vitro" en presencia de macromoléculas cargadas, como son agregados de inmunoglobulinas o por anticuerpos que reaccionan con la superficie de las plaquetas y algunos virus y reovirus (9, 21, - 23). Se han observado evidencias de la identificación de complejos inmunes, usando este método en enfermedades, tales como: virosis (12), hepatitis (14, 15), sarcoidosis, artritis reumatoide y en pacientes después de recibir un trasplante (9).

Para descartar la posibilidad de agregación plaquetaria por anticuerpos anti-plaquetas el ensayo se puede repetir a un pH 6.5 en lugar de 7.6, en donde la agregación inducida por complejos inmunes es inhibida, mientras que la agregación por anticuerpos anti-plaquetas persiste (21). El uso de este método nos da una evidencia para determinar la fre-

cuencia de complejos inmunes en varias enfermedades autoinmunes.

Inhibición de anticuerpos citotóxicos. También se ha utilizado para la detección de complejos inmunes. La lisis de las células son inhibidas por los complejos (17), pero — también algunas son inhibidas por inmunoglobulinas séricas y probablemente por anticuerpos antilinfocitos (2). Con este método se han demostrado complejos inmunes en suero de pacientes con artritis reumatoide, colitis ulcerativa, lupus eritematoso y tiroiditis autoinmune (9).

Otras técnicas utilizan radioisótopos se basan en la interferencia de los complejos inmunes, con la incorporación de material radioactivo por macrófagos (9).

Interacción con los receptores de los complejos inmunes celulares para complemento. Varias células tienen gran afinidad para los complejos inmunes unidos a complemento, debido a la presencia de receptores para componentes del complemento en la membrana celular. Muchos de estos receptores interactúan preferentemente con los componentes o con sus — productos de degradación C₃b y C₃d. Algunos linfocitos humanos, se caracterizan por tener una alta densidad de estos receptores: algunos de estos son las células raji, que se han usado para detección de los complejos inmunes (9,19,20,24, — 29).

Inhibición de la formación de rosetas de linfocitos — complemento dependiente. Este método también se ha aplicado a la investigación clínica de complejos inmunes (32), utili-

zando componentes del complemento activado, que inhiben la formación de rosetas unidas a complemento (17), y eritrocitos de carnero cubiertos con complemento (20,24).

Este método se basa en que una gran cantidad de células de varias especies de animales, incluyendo la del hombre tienen receptores para componentes del complemento, los cuales son detectados a través del enlace de eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpo y complemento (EAC), que al incubarlos dan lugar a la formación de rosetas. Estos linfocitos hacen posible la interacción entre linfocitos e inmunoglobulinas, así como también para complejos inmunes unidos al complemento (AgAcG) (9,20,24,17,18).

III.- OBJETIVOS DEL TRABAJO

En la literatura médica se han descrito diversos métodos para la identificación de complejos inmunes, sin embargo, en la mayoría son experimentales y se desconoce su confiabilidad y correlación. Por lo que es importante conocer estas características en los métodos que se analizan en etapas clínicas diferentes de los padecimientos estudiados. Bajo estas condiciones nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificar complejos inmunes en niños con: artritis reumatoide juvenil, variedad poliarticular; dermatopolimiositis; lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Weber Christian, ya que en esta última enfermedad no se ha demostrado la presencia de complejos inmunes.
2. Encontrar las diferencias en la concentración de complejos inmunes en la etapa activa e inactiva de las enfermedades en estudio.
3. Correlacionar los resultados de la prueba del factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC y la prueba de agregación plaquetaria.

IV.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Material humano. Se estudiaron a 23 pacientes (niños) cuyas edades oscilaron entre 5 y 12 años, agrupándose en la siguiente forma: 11 pacientes con artritis reumatoide juvenil seronegativa (factor reumatoide negativo), de los cuales 3 cursaban con poliartritis activa y 8 sin evidencia clínica activa. Cinco pacientes con lupus eritematoso sistémico clínico inactivo. Cinco pacientes con dermatopoliosis; de los cuales cuatro presentaron actividad clínica y uno inactivo. Por último, dos pacientes con enfermedad de Weber Christian ambos con actividad clínica. A todos los pacientes se les suspendió la medicación que estuvieron recibiendo entre 24 y 48 horas antes de la prueba para evitar la interferencia con los estudios. Simultáneamente se estudiaron con las mismas pruebas 29 adultos sanos donadores profesionales del banco de sangre. A todos los pacientes se les extrajo 10 ml de sangre de vena periférica del pliegue del codo para el estudio de agregación plaquetaria y factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC. Para la prueba de agregación plaquetaria se usó plasma rico en plaquetas fresco, de 24 horas de adultos sanos donadores profesionales del banco de sangre.

Separación de leucocitos por el Método de gradiente de densidad. Se separan leucocitos de sangre completa, los que contienen de 30-40 % de linfocitos formadores de rosetas-EAC (LFB-EAC), estos linfocitos tienen receptores de superficie para Fc y C₃, los que son reconocidos por los comple-

jos inmunes antígeno-anticuerpo unidos al complemento y por los eritrocitos de camero recubiertos con anticuerpo y complemento (ZAG). Se extrajeron 5 ml de sangre periférica en una jeringa heparinizada (0.1-0.5 ml de heparina 1000 UI), y se les adicionó lentamente a un tubo para centrifuga, el cual contenía 5 ml de gradiente de ficoll-hypaque [ficoll (Pharmacia) 100 ml al 4% e hypaque (Cintrobe) 20 ml al 50%, densidad del gradiente de 1.076 g/ml]. Después se centrifugó (centrifuga de rotor de ángulo recto) a 400 X g por 40 minutos a 10°C. Después de la centrifugación se observaron cuatro capas; la primera fué el suero; la segunda, el paquete de leucocitos; la tercera, el gradiente y la última, el paquete de eritrocitos. Se separó el paquete de leucocitos con una pipeta pasteur y se lavaron tres veces con solución de Hanks (cloruro de sodio 8.0 g., cloruro de calcio 0.14 g., cloruro de potasio 0.40 g., sulfato de magnesio 0.10 g., fosfato ácido de sodio 0.12 g., fosfato ácido de potasio 0.06 g., dextrosa 1.0 g., bicarbonato de sodio 0.35 g., rojo de fenol 0.007 g. y agua destilada cdp 1000 ml), pH 7.2 volumen a volumen, y se resuspendieron las células en 1.0 ml de la misma solución y se contaron en una cámara de Neubauer. El número y la viabilidad celular se determinó por la exclusión del colorante vital, azul de tripan, el cual tiñe células muertas. Las células que se utilizaron en los ensayos tenían un 90% de viabilidad y una concentración de 5×10^6 células por ml (18).

Método de sensibilización de eritrocitos de camero --

con anticuerpo y complemento (EAC). Los eritrocitos de camero recubiertos con anticuerpo y complemento (EAC), reconocen los receptores celulares Fc y C_3 de los LFB-EAC formando rosetas con ellos cuando son incubados. Se tomó 1.0 ml de paquete de eritrocitos de camero y se adicionó a un tubo para centrifuga, se lavaron tres veces con solución de Hanks, pH 7.2, centrifugándose en cada lavada 5 minutos a 500 X g, de estos eritrocitos lavados, se tomaron 0.4 ml y se llevaron hasta un volumen de 5 ml con solución de Hanks, a la dilución anterior de eritrocitos de camero, se les adicionó hemolisina (anticuerpo contra los eritrocitos de camero), diluido 1:200 y se incubaron a 37°C por 30 minutos, después de incubarlos se centrifugaron 5 minutos a 500 X g, se eliminó el sobrenadante y se lavaron tres veces con solución de Hanks, pH 7.2, centrifugando 5 minutos a 500 X g en cada lavada. De estos eritrocitos se tomaron 0.4 ml y se llevaron a 5 ml con solución de Hanks y se les adicionó 5 ml de suero humano sin inactivar (complemento), diluido 1:50, se incubaron a 37°C por 30 minutos y después se lavaron con la misma solución. Los eritrocitos ya sensibilizados se prepararon a una concentración del 2% con solución de Hanks.

Suero inactivado por calor y absorbido. El suero problema sospechoso de contener complejos inmunes, se inactiva por calor para evitar la interferencia del complemento y se absorben los anticuerpos heterófilos que pudieran formar rosetas con los eritrocitos de camero. Se tomaron 3 ml de sangre en una jeringa y se adicionaron a un tubo de ensayo -

sin anticoagulante, se les removió el coágulo y se centrifugó a 500 X g por 10 minutos, con una pipeta pasteur se separó el suero y se inactivó en baño maría a 56°C por 30 minutos, a un ml de suero inactivado, se le adicionó 0.1 ml de eritrocitos de camero lavados al 0.5 % y se incubaron por 30 minutos a 37°C, para absorber los anticuerpos heterófilos y después se centrifugó 5 minutos a 500 X g, con una pipeta pasteur se separó el suero inactivado y absorbido.

Prueba de Inhibición de la Formación de rosetas-EiC.

Los complejos inmunes presentes en el suero de los pacientes con enfermedad autoinmune se cuantificaron poniendo en contacto primero los LPR-EAC con EAC al 2% (rosetas normales) y por separado los LPR-EAC primero con el suero problema (complejos inmunes "in vivo") y los sitios receptores que dejan libres estos complejos los ocupan después los EAC que se adicionan al último (rosetas inhibidas).

LPR-EAC sin suero. En un tubo para centrifuga se colocaron: 0.5 ml de suspensión de linfocitos formadores de rosetas-EAC (LPR-EAC), obtenidos de sangre periférica y separados por el método de gradiente de densidad, a una concentración de 5×10^6 células por ml y 0.5 ml de EAC al 2%. Hecha la mezcla se incubaron a 37°C por 15 minutos, después se centrifugaron un minuto a 400 X g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió lentamente, se tomó una alícuota con una pipeta pasteur y se colocó en un portaobjetos, se contaron las rosetas y leucocitos libres al microscopio.

LPR-EAC con suero. En un tubo para centrifuga se colocaron

0.5 ml de suspensión de células LFB-EAC, a una concentración de 5×10^6 células por ml y 0.5 ml de suero inactivado por calor y absorbido; se incubaron 30 minutos a 37°C , y se centrifugó 5 minutos a 400 X g, con una pipeta pasteur, se eliminó la mitad de sobrenadante y se adicionaron 0.5 ml de EAC al 2%, esta mezcla se incubó 15 minutos a 37°C y después se centrifugó un minuto a 400 X g. Con una pipeta se eliminó 0.5 ml de sobrenadante y se resuspendió lentamente, se tomó una alícuota con una pipeta y se colocó un portaobjetos, se contaron las rosetas y linfocitos libres al microscopio (18,24).

Lectura. El Coeficiente de Inhibición (CI) se determinó contando, al mismo tiempo, las rosetas formadas con los LFB-EAC y los EAC, y los linfocitos libres hasta llegar a un total de 200 (entre rosetas y linfocitos libres).

Calculos.

$$CI = 100 - \frac{\text{LFB-EAC con suero}}{\text{LFB-EAC sin suero}} \times 100$$

CI = Coeficiente de Inhibición

LFB-EAC = Linfocitos formadores de rosetas-EAC

EAC = Eritrocitos de camero cubiertos con anticuerpo y complemento

Preparación de plaquetas. Se separan las plaquetas de su medio plasmático y se lavan para evitar la interferencia en la prueba de agregación plaquetaria, por productos agregantes plasmáticos. Se obtuvieron las plaquetas a partir de

plasma rico en plaquetas (plaquetas frescas humanas de 24 horas), al cual se centrifugó a 400 X g por 20 minutos a 10°C. Se eliminó el precipitado de eritrocitos y leucocitos y el sobrenadante se centrifugó a 1000 X g por 15 minutos a 10°C. Se eliminó el sobrenadante (plasma) y el precipitado de plaquetas se resuspendió en solución de NaCl 0.15 M para centrifugarse 10 minutos a 760 X g a 10°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en solución de NaCl - - 0.15 M y se centrifugó 10 minutos a 760 X g a 10°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en solución amortiguadora de PBS-D, pH 7.8. Se ajustó la concentración de las plaquetas leyendo la densidad óptica a 660 nm contra un blanco de agua desionizada (Bom demostró que la densidad óptica es directamente proporcional al número de plaquetas (21, 31)), ajustando a una concentración aproximadamente de 2×10^8 plaquetas por ml, densidad óptica de 1.0-1.2 (10, 11, 13, 22, 31).

Prueba de Agregación Plaquetaria. La superficie plaquetaria tiene receptores Fc y C_3 los cuales son reconocidos por los complejos inmunes que se encuentran en el suero de pacientes con enfermedad autoinmune, o por la IgG agregada por calor, produciendo agregación plaquetaria bajo condiciones de pH y temperatura. La prueba se realizó en placas de poliestireno con pozos de fondo en forma de U, de la siguiente manera: se adicionaron 50 μ l de PBS-D, pH 7.8 a cada pozo, más 50 μ l de suero problema, al primer pozo de la hilera con microdilutor, y se hicieron diluciones dobles - -

1:2 a 1:4096. Se adicionaron 50 μ l de PBS-D, pH 7.8 a cada pozo y 100 μ l de la preparación de plaquetas a una concentración de aproximadamente 2×10^8 plaquetas por ml. Para cada prueba se corrió un control positivo usando IgG agregada por calor, se siguieron los mismos pasos antes descritos, — sustituyendo únicamente el suero problema por la preparación de la IgG agregada por calor. Se hizo también al mismo tiempo, un control negativo de agregación espontánea adicionando 100 μ l de PBS-D, pH 7.8 a cada pozo más, 100 μ l de la preparación de plaquetas a la misma concentración. Después se incubaron las placas a 4°C durante 18 a 20 horas. Después de incubar se observaron las placas con una lámpara de fondo — oscuro y luz lateral, la observación de la prueba positiva fue una tela de plaquetas sobre el fondo de los pozos y la — prueba negativa fue un botón de plaquetas en el fondo de los mismos (10,12,13,21,28).

Precipitación de inmunoglobulina con sulfato de amonio. Se usó suero de mieloma tipo IgG el cual se precipitó con sulfato de amonio al 33%, con agitación magnética y en — baño de hielo, se hicieron tres precipitaciones adicionando el sulfato de amonio al suero, conforme éste se disolvió, — después de cada precipitación se centrifugó la mezcla a 500 X g por 15 minutos, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se dializó contra PBS pH 7.8 por 48 horas y, después de dializarse, se liofilizó. La muestra liofilizada se probó — por inmunoelectroforesis para conocer la pureza de la IgG — precipitada del suero de mieloma (21).

Inmunolectroforesis. Para esta prueba se usaron porta objetos, los cuales se cubrieron con agar al 1% y se perforaron. Ya preparadas las placas, se adicionaron a los pozos - la muestra problema (antígeno), y se corrieron en el aparato de inmunolectroforesis usando como medio PBS pH 7.8 y corriente de dos volts por cada placa durante 30 minutos, después de la corrida, se perforó el agar en canal. Y se adicionaron los sueros anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM respectivamente, se incubaron las placas en cámara húmeda por 48 horas (21).

Preparación de la IgG agregada por calor. La inmunoglobulina G en forma libre es incapaz de activar el sistema del complemento, pero en forma agregada sí, de esta forma actúa como complejo inmune. Esta propiedad es usada para estandarizar las pruebas para determinar complejos inmunes en general. Se tomó un gramo de liofilizado de IgG obtenida por precipitación del suero de mieloma y se disolvió en solución de NaCl 0.15 M durante dos horas con agitación magnética, después se calentó en baño maría a 63°C por 30 minutos (se contó el tiempo a partir de que el material alcanzó la temperatura), se enfrió en baño de hielo, se le adicionó - 6.7 gramos de sulfato de sodio, de gramo en gramo hasta disolución. La mezcla densa obtenida se centrifugó 15 minutos a 500 X g y el sobrenadante se eliminó, resuspendiéndose el - precipitado en PBS pH 7.8 y se dializó después contra PBS pH 7.8 durante 48 horas a 4°C. El dializado se centrifugó - 15 minutos a 500 X g eliminando el precipitado. El sobrena-

dante se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso (21, 23, 30).

Preparación de IgG agregada por calor unida a complemento. (para la estandarización de la prueba del factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC). En un tubo de ensayo para centrifuga se colocaron 0.5 ml de la preparación de IgG agregada por calor a la concentración necesaria más, 0.5 ml de suero humano normal sin inactivar (complemento), esta mezcla se incubó 30 minutos a 37°C . Después se centrifugó a 500 X g para eliminar el exceso de suero, dejando un volumen de 0.5 ml y se resuspendió. Por último se inactivó la preparación a 56°C durante 30 minutos (20).

Determinación de proteínas por el Método de folin modificado. Esta prueba se usó para determinar el contenido de proteína de la IgG agregada por calor empleada para estandarizar las pruebas de agregación plaquetaria y factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC. Se usaron los siguientes reactivos: solución stock BSA (fracción 5) con la cual se hizo la curva estandar, de 8 mg/ml en agua desionizada. Se tomó una alícuota de esta solución 1:50 de aproximadamente 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$, esta última fue la que se usó en la prueba. - También se emplearon los siguientes reactivos: Folin A -- (Na_2CO_3 2% más, NaOH 0.1N), Folin B₁ (CuSO_4 100 mg en 10 ml de agua desionizada), Folin B₂ (tartrato de sodio y potasio 200 mg en 10 ml de agua desionizada), Reactivo ZPP solución 1N (1.0 ml de reactivo equivale a 9 ml de 0.1N de NaOH) y el Reactivo de ZPC (29 ml de folin A más, 0.5 ml de folin -

No. de tubo	^a Albúmina ml	^b Agua ml	^c RPC ml	^d RFP ml	D.O. 700 nm	Conc. µg/ml
1	0.0	1.0	5	1	0.0	0.0
2	0.2	0.8	5	1	0.058	27.86
3	0.4	0.6	5	1	0.134	64.43
4	0.6	0.4	5	1	0.213	102.42
5	0.8	0.2	5	1	0.297	123.58
6	1.0	0.0	5	1	0.293	140.89

^a diluida 1:50

^b desionizada

^c Reactivo de folin cobre

^d Reactivo de folin fenol

Tabla #1

Curva estándar de proteínas, por el método de folin modificado.

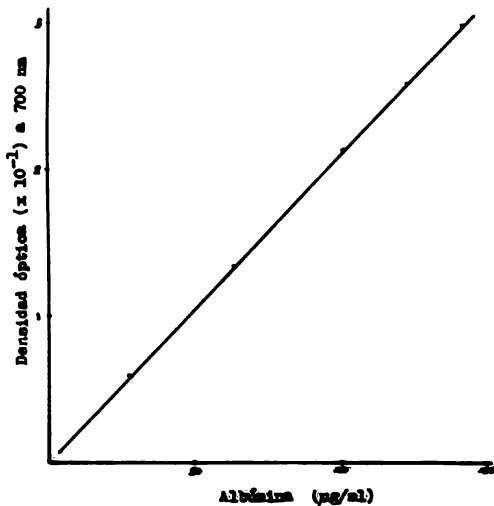


fig. *1 Curva estándar de proteínas, por el método de folin modificado.

B₁ y 0.5 ml de folin B₂).

Curva estándar de proteínas. Tabla #1. Al tubo #1 no se le adicionó albúmina, a los tubos #2 a #6 se les adicionó respectivamente 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml de albúmina más, agua desionizada para completar en cada tubo 1.0 ml más, 5 ml en cada tubo de reactivo NPO, se agitaron todos los tubos y se reposaron 15 minutos a temperatura ambiente. Después se adicionaron 1.0 ml de HFF a cada tubo, se agitaron e incubaron a 50°C en baño maría por 10 minutos, después se enfriaron a temperatura ambiente y se leyeron las muestras a 700 nm usando como blanco el tubo #1.

Para las muestras problema de IgG agregada por calor se siguió el mismo procedimiento mencionado para la curva estándar sustituyendo, la albúmina por la muestra diluida. Se leyó la densidad óptica de la albúmina (fracción 5) 1:90 a 280 nm. Para conocer su concentración en mg/ml se multiplicó la densidad óptica por el coeficiente de extinción (1.515 mg/ml) de la albúmina (33).

V.- RESULTADOS

Obtención del CI de LFB-EAC y del título de AP utilizando IgG agregada por calor, y correlación entre ambas pruebas. La IgG precipitada del suero de mieloma humano tipo IgG se agregó por calor a 63°C por 30 minutos en las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 ($\times 10^3$) $\mu\text{g/ml}$, se incubaron con una suspensión de LFB-EAC de una concentración 5×10^6 células por ml y después con EAC al 2%, para ver si inhibía la formación de rosetas y no mostró inhibición a ninguna concentración. Después, la IgG agregada por calor se incubó con suero humano no inactivado, para unirla a complemento (IgG agregada -- unida a complemento) y esta última se probó de la misma forma que la IgG agregada no unida al complemento y se observó que sí inhibía la formación de rosetas de LFB-EAC. Esta inhibición fue proporcional a la concentración de la IgG agregada unida a complemento usada en la prueba. Los resultados del CI de la IgG agregada unida a complemento se muestran en la tabla #2, donde se observa que ha una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ dió una inhibición de 10.52% (mínima concentración usada) y a 8×10^3 $\mu\text{g/ml}$ de 64.51% (máxima concentración usada), estos resultados se encuentran graficados en la figura #2, -- donde se graficó el logaritmo (base 10) de la concentración de IgG agregada por calor contra el CI de LFB-EAC, donde se muestra una curva dosis respuesta, dando una sensibilidad de la prueba de $\pm 50\%$ de inhibición (CI) en 2×10^3 $\mu\text{g/ml}$ de IgG -- agregada por calor unida a complemento. En la tabla #2 tra-

\hat{a}_A	B	O	^{a}CI	^{b}AP
0.05	38	34	10.52	1:16
0.10	31	24	22.58	1:32
0.20	31	22	29.03	1:64
0.40	34	24	29.41	1:128
0.60	34	21	38.23	1:128
0.80	34	20	41.77	1:256
1.00	39	21	46.15	1:256
2.00	39	20	48.71	1:512
4.00	37	17	54.05	1:1024
6.00	37	15	59.45	1:1024
8.00	31	11	64.51	1:2048

A = IgG agregada por calor

B = porcentaje de rosetas de LPR-SAC sin IgG agregada

O = porcentaje de rosetas de LPR-SAC con IgG agregada

\hat{a}_A ($\times 10^3$) $\mu\text{g/ml}$

a Coeficiente de Inhibición

b Agregación plaquetaria

Tabla #2

CI de LPR-SAC y Título de AP de IgG agregada
por calor.

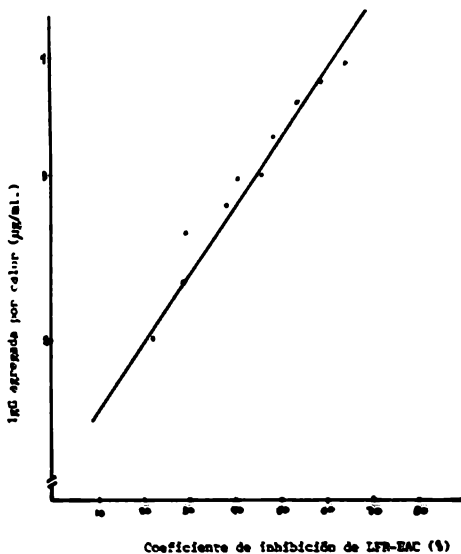


Fig. # 7 Curva estándar para la prueba del factor inhibidor de la inactivación de rosetas-EAC. Se empleó la técnica usual de IgG agregada por calor (completo immune formado "in vitro"). Se graficó el porcentaje de rosetas inhibidas como coeficiente de inhibición de LFR-EAC contra el logaritmo (base 10) de la concentración de la IgG agregada por calor en µg/ml.

bién se da el número porcentual de rosetas en C (LFB-EAC - con IgG agregada) en comparación con B (LFB-EAC sin IgG - - agregada), donde el porcentaje de rosetas LFB-EAC en este último, se encuentra aumentado y en C disminuido (inhibido) a 50 $\mu\mu$ /ml de IgG agregada por calor unida al complemento el porcentaje de rosetas LFB-EAC sin IgG fue de 38 por ciento y - con IgG unida al complemento (C) fue de 34 por ciento; en una concentración de 8×10^3 $\mu\mu$ /ml el porcentaje de rosetas LFB-EAC sin IgG agregada (B) fue de 41 por ciento y con IgG agregada unida al complemento (C) fue de 11 por ciento, lo que demuestra, que el porcentaje de inhibición de rosetas LFB-EAC fue proporcional a la concentración de la IgG agregada por calor presente en la prueba (complejo inmune formado "in vitro").

La IgG agregada por calor en sus diferentes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 ($\times 10^3$) $\mu\mu$ /ml se incubó, en placas de poliestireno con pozos de fondo en forma de U, con una suspensión de plaquetas 2×10^8 plaquetas por ml para conocer el título de agregación plaquetaria (AP) de la IgG agregada por calor en sus diferentes concentraciones. Los resultados se muestran en la tabla #2, en donde se observa que a una concentración de 50 $\mu\mu$ /ml dió un título de AP de una dilución 1:16 y a una concentración de 8×10^3 $\mu\mu$ /ml de 1:2048, lo cual demuestra que el título de AP es proporcional a la concentración de la IgG agregada, los resultados se graficaron en la figura #3, se graficó el logaritmo (base 10) de la concentración de la IgG agregada por calor contra el título de AP obtenido de la misma, se

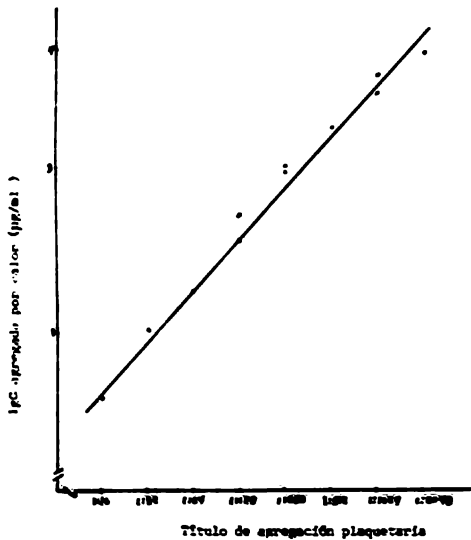


Fig. # 3 Curva estándar para la prueba de agregación plaquetaria. Se estandarizó la técnica usando IgG agregada por calor (complejo inmune formado "in vitro"). Se graficó el logaritmo (base 2) de la concentración de IgG agregada por calor en µg/ml. contra el título de agregación plaquetaria (diluciones dobles)

observa una curva dosis respuesta, dando una sensibilidad de la prueba de aproximadamente 3.78 $\mu\text{g/ml}$ de IgG agregada por calor detectada en la prueba, la cual se determinó de acuerdo a la dilución obtenida del título de AP en cada una de las concentraciones de IgG agregada por calor usada. Obtenidos los resultados del coeficiente de inhibición (CI) y del título de agregación plaquetaria (AP) utilizando IgG agregada por calor (complejo inmune formado "in vitro") usando las mismas concentraciones en ambas pruebas, se graficaron los resultados para correlacionarlos, figura #4, en la cual se observa una relación lineal, a los resultados de ambas pruebas se les determinó el coeficiente de correlación "r" de Pearson para dos variables al cual dió 0.87% y también se calculó T de Student dando una P<0.001. Estos resultados muestran que las pruebas están altamente correlacionadas (0.87%) y esta correlación tiene una confiabilidad de P<0.001.

Obtención del CI de LPR-EAC y del título de AP en pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes. Después de estandarizar las pruebas del factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC y la de agregación plaquetaria usando como complejo inmune formado "in vitro" a la IgG agregada por calor, se planteó como objetivo determinar la concentración de complejos inmunes en pacientes con: artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico, dermatopolioniosis y enfermedad de Weber Christian. Para evaluar a estos pacientes se determinó el CI de LPR-EAC y el título de AP a 29 individuos normales donadores profesionales del banco de sangre, los resultados se muestran en la tabla #3, en donde se

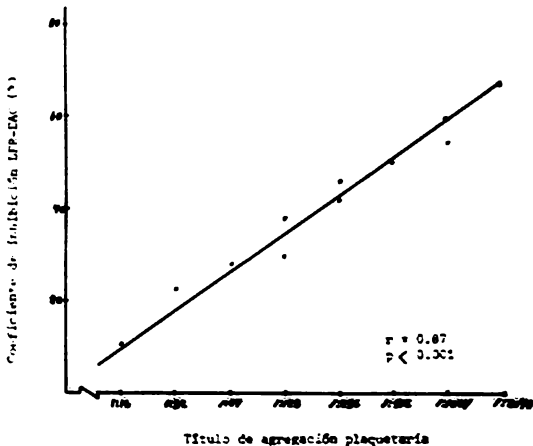


Fig. 3 - Correlación entre el título de AP y CI LFR-EAC utilizan do IgG agregada por calor. Se graficaron los resultados de ambas pruebas usando IgG agregada por calor a diferentes concentraciones; título de agregación plaquetaria, diluciones dobles a intervalos iguales contra el porcentaje de inhibición de rosetas cruzadas; coeficiente de inhibición de LFR-EAC, dando un coeficiente de correlación "r" de Pearson para dos variables de 0.87 y una significancia de P<0.001.

A	B	C	^a CI	^b AP
1	37	38	2.7	1:16
2	38	37	2.6	1:8
3	41	40	2.4	1:16
4	34	33	2.9	1:16
5	31	30	3.2	1:16
6	41	42	2.4	1:8
7	42	41	2.4	1:8
8	44	45	2.2	1:16
9	32	32	0.0	1:16
10	37	37	0.0	1:16
11	35	34	2.8	1:16
12	29	28	3.3	1:16
13	42	42	0.0	1:16
14	34	33	2.9	1:16
15	32	32	0.0	1:16
16	37	36	2.7	1:16
17	39	38	2.5	1:16
18	52	51	1.9	1:16
19	35	34	2.8	1:16
20	35	35	0.0	1:8
21	39	38	2.5	1:16
22	32	31	3.1	1:16
23	34	33	2.9	1:16
24	40	39	2.5	1:16
25	33	32	3.0	1:8
26	28	29	3.2	1:8
27	30	29	3.3	1:16
28	40	40	0.0	1:8
29	32	32	0.0	1:16

A = número de individuo

B = porcentaje de rosetas LFB-EAC sin suero

C = porcentaje de rosetas LFB-EAC con suero

^a Coeficiente de inhibición

^b Agregación plaquetaria

Tabla #3

CI y Título de AP de individuos normales

observa que el mayor coeficiente de inhibición normal fué — de 3.3%, también se muestra el porcentaje de rosetas de LPR-EAC sin suero (B) y con suero (C); observándose que no hay — diferencia significativa entre ambos resultados, por lo que el CI normal dió de máximo 3.3% y el título de AP no mayor — de una dilución 1:16. Ya determinados los niveles normales del CI y del título de AP, se prosiguió a determinar las con — centraciones de complejos inmunes en pacientes.

Se analizaron a 23 pacientes cuyas edades oscilaron en — tre 5 y 12 años, a los cuales se les suspendió toda medica — ción de 24 a 48 horas antes de la prueba para evitar la inter — ferencia con los estudios. Se les tomó 10 ml de sangre veri — férica, del pliegue del codo, y se les practicó la prueba — del Factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC y Agrega — ción plaquetaria los resultados se muestran en la tabla #4: 11 pacientes con artritis reumatoide juvenil, 3 casos clíni — camente activos y 8 inactivos. Puede observarse en la tabla que el CI de LPR-EAC es mayor en los pacientes en etapa acti — va (CI de 32 a 36), en comparación con los inactivos (CI de 8 a 34), también se muestran los porcentajes de rosetas de — LPR-EAC sin suero (A) y con suero (B) en ambas etapas de la — enfermedad, por ejemplo, el primer paciente dió un porcentaje de rosetas LPR-EAC sin suero de 33% y con suero de 21%, lo — que muestra una marcada inhibición de rosetas cuando los — — LPR-EAC se incuban primero con suero (complejos inmunes en suero) y después con EAC al 2%, en comparación con los LPR — EAC que se incubaron directamente con EAC al 2%. El título de agregación plaquetaria también se muestra en la tabla —

Tabla #4. CI y Título de AP de pacientes con diversas afecciones. Se estudiaron a 23 pacientes con las siguientes enfermedades: 11 pacientes con artritis reumatoide juvenil (ARJ), 5 pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), -- 5 pacientes con dermatopolioniosisitis (DPM) y dos pacientes -- con enfermedad de Weber Christian (WC). Se les determinó el porcentaje de rosetas LPR-RAG sin suero (A) y el porcentaje de rosetas LPR-RAG con suero (B), calculandose su CI respectivo. También se determinó el título de AP a cada paciente. En la tabla se señala en que etapa de la enfermedad se encuentran los pacientes (O).

		A	B	^a CI	^b AP	C
1	ABF	33	21	36	1:256	activo
2	ABF	35	25	29	1:32	inactivo
3	ABF	35	23	34	1:32	inactivo
4	ABF	37	32	14	1:32	inactivo
5	ABF	36	33	8	1:16	inactivo
6	ABF	32	28	13	1:16	inactivo
7	ABF	32	27	16	1:16	inactivo
8	ABF	47	30	36	1:128	activo
9	ABF	33	26	21	1:32	inactivo
10	ABF	44	30	32	1:128	activo
11	ABF	30	25	17	1:32	inactivo
12	LES	38	34	11	1:32	inactivo
13	LES	39	28	3	1:16	inactivo
14	LES	29	17	41	1:256	inactivo
15	LES	34	27	21	1:64	inactivo
16	LES	40	40	0	1:16	inactivo
17	DFM	37	23	38	1:128	activo
18	DFM	25	20	20	1:64	activo
19	DFM	32	23	28	1:128	activo
20	DFM	29	25	14	1:32	activo
21	DFM	32	25	22	1:32	inactivo
22	WC	37	33	11	1:32	activo
23	WC	30	26	13	1:32	activo

^aCoeficiente de Inhibición

^bAgregación Flacostaria

Tabla #4

CI y Título de AP de pacientes con diversas afecciones

#4, observandose al igual que en CI una mayor concentración de complejos inmunes en la etapa activa de la enfermedad con respecto a los inactivos: título de AP en la etapa activa - de una dilución 1:128 a 1:256 y en la etapa inactiva de 1:16 a 1:32, los resultados de los 11 pacientes con artritis reumatoide juvenil de ambas pruebas se graficaron comparativamente con los resultados del grupo control normal, figura #5 observandose en la grafica diferencia entre los individuos - normales y enfermos, y a su vez diferencia entre los casos - clinicamente activos e inactivos: mayor concentración de complejos inmunes en la etapa activa, con respecto a la inactiva.

Cinco pacientes con lupus eritematoso sistémico todos clinicamente inactivos, en este grupo de pacientes no fué -- posible hacer una comparación como la anterior, debido a que todos los pacientes disponibles estudiados se encontraban en una etapa inactiva de la enfermedad, pero se puede observar (tabla #4) que sí se detectan complejos inmunes por arriba - de los límites normales, dando en dos de los pacientes un CI de LPR-EAC de 21 y 41, y un título de AP de 1:64 y 1:256 respectivamente.

Cinco pacientes con dermatopolioimiositis: 4 casos clinicamente activos y uno inactivo, los resultados de ambas -- pruebas practicadas se muestran en la tabla #4, en donde se observa ligera diferencia entre los CI de LPR EAC en la etapa activa con respecto a la inactiva: CI de activos de 14 a 38 y el inactivo de 22, lo mismo en el caso del título de AP, 47 activos una dilución de 1:32 a 1:128 y el inactivo de 1:32

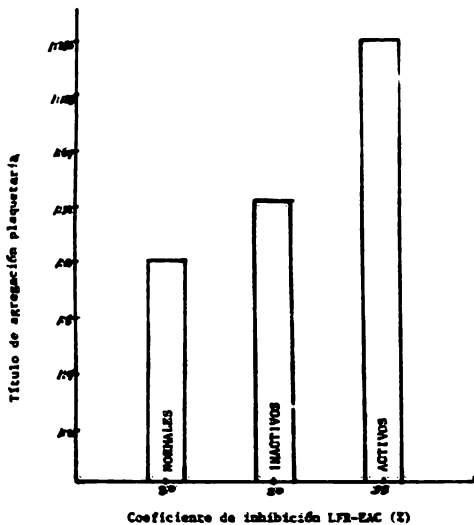


Fig. # 5. Título de AP v CI LFR-EAC de pacientes activos e inactivos con artritis reumatoide juvenil. Resultados obtenidos de 11 pacientes con artritis reumatoide juvenil; 3 casos clínicamente activos y 8 inactivos, en las pruebas de agregación plaquetaria y factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC (CI), graficándose comparativamente con el grupo control de 29 individuos normales.

Los resultados se graficaron en la figura #6, comparativamente con el grupo control normal (referencia), observandose -- una mayor concentración de complejos inmunes en la etapa activa con respecto a los inactivos y una diferencia notable del grupo de pacientes en general con el grupo control normal.

Por último se les determinó el CI y el título de AP a dos pacientes con enfermedad de Weber Christian, en donde -- no se han reportado complejos inmunes, en nuestro estudio se encontraron complejos inmunes en baja concentración; un CI de 11 y 13, y un título de AP en cada uno.

En la figura #7 se graficaron los resultados porcentuales de rosetas LFB-EAC, de los 29 individuos normales y de los 23 pacientes con diferentes enfermedades: artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico, dermatopoliosis y enfermedad de Weber Christian, para observar gráficamente las diferencias entre el número de rosetas LFB-EAC entre un grupo y otro. En el caso de individuos normales no se observa diferencia entre el número de rosetas LFB-EAC con suero y sin suero, pero en el número de rosetas de los 23 pacientes si se observa una clara diferencia, los LFB-EAC que se trataron primero con suero y después con EAC al 2° el porcentaje de rosetas se observa disminuido (inhibido), en comparación con los LFB-EAC que se incubaron directamente con los EAC al 2°.

En la figura #8 se comparan los CI de LFB-EAC de los 29 individuos normales y los 23 pacientes con las enfermedades antes mencionadas, y se observa una gran diferencia en--

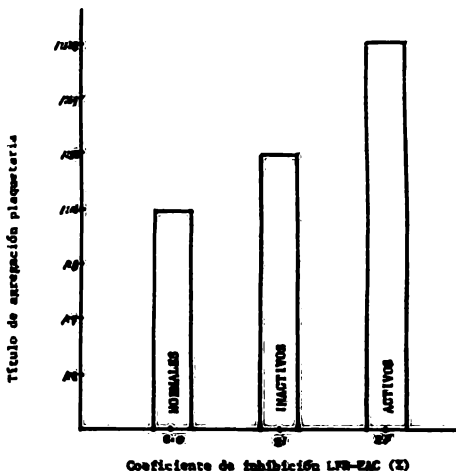


Fig. # 6. Título de AP y CI de LFB-EAC de pacientes activos e inactivos con dermatopolionidrosis. Resultados obtenidos de 5 pacientes con dermatopolionidrosis; 4 casos clínicamente activos y uno inactivo, de las pruebas de inhibición de la formación de rosetas-EAC (CI) y agregación plaquetaria, en la gráfica se observa la diferencia en las concentraciones de complejos inmunes en la etapa activa e inactiva de la enfermedad, comparativamente con el grupo con trol normal.

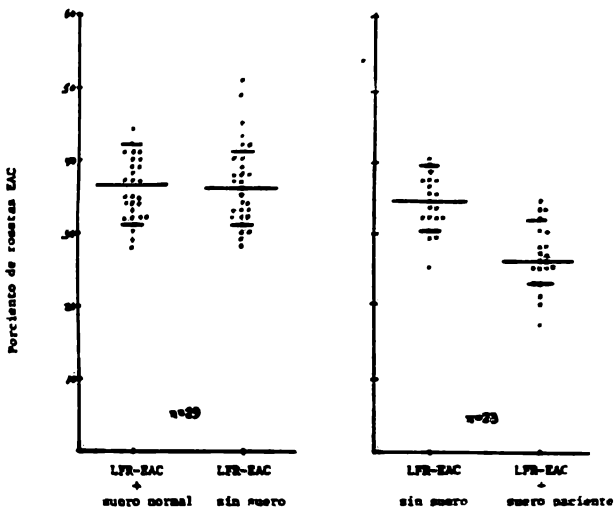


Fig. # 7. Porcentaje de rosetas LFR-EAC en pacientes e individuos normales. Se comparan los resultados en porcentajes obtenidos de la prueba de inhibición de la formación de rosetas EAC, porcentaje de rosetas-EAC sin suero y con suero de 29 individuos normales y 29 pacientes con enfermedad de: artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico, dermatopolioicosis y enfermedad de weber christian.

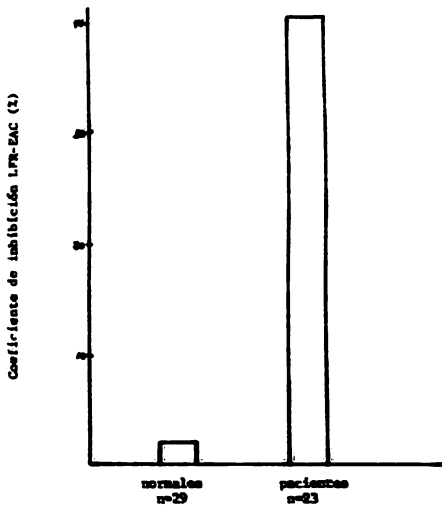


Fig. 98 Coeficiente de inhibición de LFR-EAC en pacientes y individuos normales.

Se comparan los coeficientes de inhibición obtenidos de 29 individuos normales y 23 pacientes con enfermedades de: artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico, dermatopoliosisitis y enfermedad de Weber christian.

tre los CI de los individuos normales y pacientes: en los -- normales el CI mayor dió 3.3^o y en los pacientes de 41^o.

Así mismo se comparan los títulos de AP de individuos normales y enfermos en la figura #9, en la cual se observa -- una marcada diferencia entre el título de AP de individuos -- normales y enfermos: el título de AP normal dió de una dilu- ción no mayor de 1:16 y en los individuos enfermos de 1:256 la más alta.

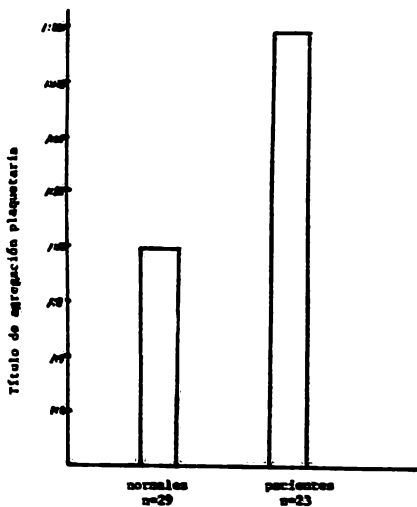


Fig. # 9. Título de AP de pacientes e individuos normales. Se muestran los resultados obtenidos de 29 individuos normales y de 23 pacientes con enfermedades de: artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico, dermatopoliositosis y enfermedad de waber christian.

VI.- DISCUSION

Los métodos usados en este trabajo para detectar complejos inmunes: Prueba de Agregación plaquetaria y Factor - Inhibidor de la formación de rosetas-EAC, dependen de las propiedades biológicas de la inmunoglobulina acoplada o de los componentes del complemento, en los complejos inmunes, tales propiedades incluyen también la reactividad con receptores Fc de las inmunoglobulinas o componentes del complemento (8,9,17,18,20,24).

La IgG agregada por calor fué usada como un modelo de complejo inmune formado "in vitro", para determinar la sensibilidad de los métodos y para cuantificar los niveles de complejos inmunes en suero (23). En la prueba del Factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC al probarse la IgG agregada por calor unida al complemento con EFB-EAC dió una inhibición, la cual fué proporcional a la concentración usada en la prueba (tabla #2), en la figura #2, se muestra la curva estándar, una curva dosis respuesta, dando una sensibilidad de la prueba de $\pm 50\%$ de CI con 2×10^3 $\mu\text{g/ml}$ de IgG agregada por calor unida al complemento. La estandarización de esta prueba no se había reportado en la literatura (18,24). En la Prueba de Agregación plaquetaria se usaron plaquetas frescas humanas de 24 horas después de la extracción, y ha este respecto existe un reporte (21) de que las plaquetas de 48 - horas son satisfactorias. Los resultados obtenidos de la estandarización (tabla #2), muestran que la agregación plaquetaria producida por la IgG agregada por calor fué proporcio-

nal a su concentración empleada, figura #3, dando una curva dosis respuesta y una sensibilidad de 3.78 $\mu\mu$ /ml de IgG agregada por calor detectada. Otros autores reportan una sensibilidad de 1.0 $\mu\mu$ /ml usando también IgG agregada por calor (21) y de 0.3 $\mu\mu$ /ml empleando como complejo inmune formado "in vitro", un conjugado VIP-SSA-anticuerpo anti-NIP (12). A las dos pruebas se les determinó el coeficiente de correlación para dos variables "r" de Pearson, que dió 0.97% y también se calculó la T de student dando P<0.001, figura #4; — los resultados del CI y del título de AP fueron directamente proporcionales a la concentración de la IgG agregada por calor usada en las pruebas y existió una alta correlación entre ambas, la cual fué altamente significativa (P<0.001).

Para determinar los niveles normales se emplearon como referencia a 29 adultos sanos donadores profesionales del — banco de sangre, no se determinó en niños, en el rango de — edad de los pacientes estudiados (5 a 12 años) por la inaccessibilidad a este grupo. Los niveles normales obtenidos en ambas pruebas (tabla #3), muestran que el CI el valor máximo fué de 3.3 y el título de AP no mayor de una dilución 1:16. Un reporte del título de AP normal coincide con el muestro (21).

De los padecimientos estudiados con estas dos pruebas se habían reportado complejos inmunes en las siguientes enfermedades: con la prueba de Agregación plaquetaria en artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (34), a parte de las antes mencionadas se reportan en infecciones virales: mixo y reovirus (17,35), hepatitis (15), en enfermedad

crónica del hígado (14), infección micoplasmica neumonica — (35), sarcoidosis (9). Con la prueba del Factor inhibidor — de la formación de rosetas-EAC no se han reportado complejos inmunes en las enfermedades estudiadas en este trabajo, sino en otras como son: schistosomiasis (32), en niños con síndrome nefrótico y otras enfermedades renales como glomerulonefritis postestreptococal (16). Complejos inmunes se han reportado empleando la prueba de Precipitación con PEG (PM - - 6000), en pacientes con depósito y circulación de complejos inmunes en las enfermedades renales, glomerulonefritis y lupus eritematoso sistémico, estudios realizados en adultos - (4), pero no en niños. Con la prueba de Desviación C1c se han reportado complejos inmunes en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatopolioniosis (2,7,25). - Prueba de inhibición de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, se reportan complejos inmunes en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Crohn's (17). En estos estudios existe el inconveniente que se desconoce su confiabilidad y correlación en etapas clínicas diferentes de la enfermedad, así como también en la enfermedad de Weber Christian no se han reportado complejos inmunes.

De los resultados obtenidos en los padecimientos estudiados, en niños de 5 a 12 años (tabla #4), se encontró que en la enfermedad de artritis reumatoide juvenil y dermatopolioniosis, existió una correlación entre la actividad del padecimiento y la concentración de complejos inmunes circulantes en sangre (figura #5 y #6), observándose una mayor concentración de complejos en pacientes clínicamente activos

con respecto a los inactivos y en comparación al grupo control normal. Los pacientes con artritis reumatoide juvenil clínicamente activos, el CI osciló entre 32 y 36 por ciento y el título de AP entre una dilución de 1:128 y 1:256, en los casos inactivos el CI fué de 8 a 34 por ciento y el título de AP de 1:16 a 1:32. En el grupo de pacientes con dermatopolimiositis la diferencia entre la etapa activa e inactiva de la enfermedad, no fué tan clara como en artritis reumatoide juvenil debido que hicieron falta más, pacientes disponibles en etapa inactiva; el CI de pacientes en etapa activa fué de 14 a 38 por ciento y el título de AP de 1:32 a 1:128 y en el caso del inactivo el CI de 22% y el título de AP de 1:32. En los pacientes con lupus eritematoso sistémico se detectan altas concentraciones de complejos inmunes, pero no fué posible observar las diferencias entre la etapa activa e inactiva, debido a que todos los pacientes disponibles se encontraban en etapa inactiva, CI de pacientes inactivos de 3 a 41 por ciento y título de AP de 1:16 a 1:256.

Pacientes con enfermedad de Feber Christian en esta enfermedad no se ha demostrado la presencia de complejos inmunes, de los resultados obtenidos en este trabajo se usó para probar la presencia de complejos inmunes, en baja concentración únicamente se estudiaron dos pacientes y dieron los siguientes niveles de complejos inmunes, CI de LFB-EAC de 11 y 13 por ciento y el título de AP de 1:32 en ambos pacientes.

Los resultados porcentuales de rosetas LFB-EAC (Prueba del factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC) de los pacientes, comparados con el grupo control normal (figura -

#7) muestra que las rosetas LFB-ZAC con suero y sin suero, - en el caso de individuos normales la diferencia no fué significativa pero, sí en el caso de los pacientes, en donde el porcentaje de rosetas LFB-ZAC con suero se observó disminuido (inhibido), debido a la presencia de complejos inmunes en el suero, también se observa la misma diferencia en el caso del CI de LFB-ZAC (figura #8).

Quando se comparan los títulos de AP de individuos normales y enfermos se observa que existió una diferencia marcada en pacientes, niveles altos, debido a la presencia de complejos inmunes, figura #9.

Al analizar los resultados y compararlos con la literatura es importante enfatizar que estos valores normales obtenidos en adultos sanos donadores profesionales del banco - de sangre fueron útiles como un patrón de referencia para el grupo de pacientes estudiados en este trabajo.

VII.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de Agregación Plaquetaria y Factor Inhibidor de la Formación de rosetas-EAC, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. En la enfermedad de Artritis reumatoide juvenil y - Dermatopoliomiositis se determinó que posiblemente existe una correlación entre la actividad del ude- oimiento y la concentración de complejos inmunes en suero, debido a la mayor concentración de complejos inmunes en la etapa activa de la enfermedad.
2. En Lupus eritematoso sistémico, aún en su etapa clínica inactiva fué posible cuantificar niveles altos de complejos inmunes en suero, que sobrepasan los niveles normales en ambas pruebas. Así también en la enfermedad de Weber Christian, en la que no se habían reportado complejos inmunes en nuestro estudio se pudo presumir su presencia.
3. Los métodos empleados en este estudio tuvieron las características de ser sensibles: Prueba de Agregación plaquetaria, sensibilidad de 3.78 $\mu\text{g/ml}$ de IgG agregada por calor detectada y en la Prueba del Factor inhibidor de la formación de rosetas-EAC \pm 50% de inhibición con 2 mg/ml de IgG agregada por calor, confiables y por el poco tiempo que consumen, aplicables a la clínica diaria. Lo que permitirá deter

minar complejos insueros en suero de pacientes con -
sospecha de enfermedad autoinmune y también ayudará
al médico a un mejor entendimiento del curso de la
enfermedad, estimando adecuadamente la terapia.

VIII.- Además

- 1.- Pudentberg, H.H., Stites, P.D., Caldwell, L.J., y Well, V. J. (1980) *Inmunología Clínica*. 2d. Ed Manual Moderno S. A. 2a. edición 217-226.
- 2.- Harbeck, J.R., Bardana, J.E., Kohler, F.P., y Carr, I.R. (1973) DNA:ANTI-DNA Complexes. Their Detection in Systemic Lupus Erythematosus Sera. *J. Clin. Invest.* 52:789-795.
- 3.- Carter, M.P. (1973) Occasional Survey: Immune complex disease. *Ann. Rheum. Dis.* 32:265-271
- 4.- Cohen, S.L., Fisher, J.P., Mowbray, C., Hopp, A., y Burton-Kee, J. (1979) Circulating and deposited immune complex in renal disease and their clinical correlation. *J. Clin. Path.* 32:1135-1139
- 5.- Yeatts, R.P., Turner, R., Collins, R., Kaufmann, J., y Mashburn, H. (1978) Soluble and insoluble immune complex-Platelet interactions in rheumatoid inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* 37:421-427
- 6.- Creighton, W.D., Lambert, P.H. y Miescher, P.A. (1973) Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J. Immunol.* 4:111:1219-1227
- 7.- Agnello, V., Winchester, R.J., y Kunkel, H.G. (1970) -- Precipitin reactions of the C1q component of complement with aggregated globulin and immune complexes in gel diffusion. *Immunology* 19:909-919
- 8.- Penttinen, K., Vager, O., Hämäläinen, J.A., Myllylä, G., y

- Haapanen, E. (1973) Platelet aggregation and cryo-IgM in the study of hepatitis and immune complex states. *Clin. Exp. Immunol.* 15:409-416
- 9.- Zubler, R.H. y Lambert, P.H. (1977) Immune complexes in Clinical investigation. *Recent Advances in Clinical Immunology.* Ed. by Thompson Churchill Livingstone, Edinburgh, London y New York 125-148
- 10.- Myllylä, G., Vaheri, A., y Penttinen, K. (1971) Detection and characterization of immune complexes by the platelet aggregation test II. Circulating complexes. *Clin. Exp. Immunol.* 8:399-408
- 11.- Merino, J., Golpe, J.A., Benet, B., y Garcia-Conde, T. - (1978) Técnicas de separación de las plaquetas de su medio plasmático. Valoración de la filtración en columnas de sepharosa. *Revista Clinica Española.* 151:101-105
- 12.- Penttinen, K., Myllylä, G., Mäkelä, O., y Vaheri, A. - (1969) Soluble antigen-antibody complexes and platelet aggregation. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 309-317
- 13.- Penttinen, K., Vaheri, A., y Myllylä, G. (1971) Detection and characterization of immune complexes by the platelet aggregation test I. Complexes formed in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 8:389-397
- 14.- Penttinen, K., Myllylä, G., Sager, O., y Haapanen (1972) The platelet aggregation test in the study of hepatitis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 122:60
- 15.- Penttinen, K. (1972) Platelet aggregation test in the study of hepatitis. *Amer. J. Dis. Child.* 123:418-420
- 16.- Sager, O., Penttinen, K., Häsänen, J.A., y Myllylä, G. -

- (1973) Inhibition of IgG complex-induced platelet aggregation by antiglobulin-active cryoglobulin IgM component
Clin. Exp. Immunol. 15:393-408
- 17.- Dickler, B.H. (1974) Studies of the human lymphocyte receptor for heat aggregated or antigen-complex immunoglobulin. *J. Exp. Med.* 140:508-522
- 18.- Smith, M.D., Barratt, T.M., Hayward, A.E. y Soothill, J. F. (1975) The inhibition of complement-dependent lymphocyte rosette formation by the sera of children with steroid-sensitive nephrotic syndrome and other renal disease. *Clin. Exp. Immunol.* 21:236-243
- 19.- Morito, T., Tanimoto, K., Hashimoto, H., Horinchi, Y., - y Juji, T. (1976) Fc-rosette inhibition by hypocomplementemic systemic lupus erythematosus sera. *Ann. Rheum. Dis.* 35:415-421
- 20.- Nussenzweig, V. (1974) Receptor for immune complexes on lymphocytes. *Advances in Immunology* 19:217-258
- 21.- Thompson, R.S. (1977) *Techniques in clinical immunology* - Ed. Black Well Scientific Publication 110-137
- 22.- Aster, R.H. y Jandl, J.H. (1964) Platelet sequestration in man. *Methods. J. Clin. Invest.* 43:843-855
- 23.- Kauffmann, R.H., Van es, L.A. y Dahn, M.B. (1979) Aggregated human immunoglobulin G stabilized by albumin: a standard for immune complex detection. *J. Immunol. Methods.* 31:11-12
- 24.- Elen, A., Bianco, G., y Nussenzweig, V. (1973) Mechanism of binding of soluble immune complexes to lymphocytes. *Cell. Immunol.* 7:459-473

- 25.- June, C.H., Contreras, C.D., Ferrin, L.H., y Lambert, P. H. (1979) Improved detection of immune complex in human and mouse serum using a microassay adaption of the CIq - binding test. *J. Immunol. Methods* 31:23-29
- 26.- Schultz, G., Charland, C., Driscoll, J., y Thayer, V. — (1979) A rapid method for immune complex detection: PEG insolubilization combined with laser nephelometry. *J. - Immunol. Methods* 31:31-40
- 27.- Dixon, F.J. (1963) The role of antigen-antibody complexes in disease. *The Harvey Lectures*. 58:21-52
- 28.- Myllylä, G. (1973) Aggregation of human blood platelet - by immune complexes in the sedimentation pattern test. *Scand. J. Haemat. Suppl.* 19
- 29.- Theofilopoulos, A.N., Wilson, C.B., y Dixon, J. (1976) - The raji cell radioimmune assay for detecting immune complexes in human sera. *J. Clin. Invest.* 57:169-182
- 30.- Russell, B.A. (1978) Value of immune complexes assays in diagnosis and management. *Lancet* 8083:2:359-364
- 31.- Born, G.V.B., y Cross, M.J. (1963) The aggregation of - blood platelet. *J. Physiol.* 168-178
- 32.- Smith, M.D., Verroust, P.J., Morel-Maroger, Elsticer, - L., y Coulaud. (1975) Circulating immune complexes in - schistosomiasis. *Brit. Med. J.* 274 letter.
- 33.- Dasgupta, W.H., Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. y Fields, W.S. (1952) Determination of cerebrospinal fluid protein with the folin phenol reagent. *J. Clin. Med.* 39:663
- 34.- Fink, P.C. (1979) Platelet aggregations and aggregation inhibition by different antiglobulin and antiglobulin —

complexes from sera of patients with rheumatoid arthritis. Arthr. Rheum. 22:8:896-903

- 35.- Penttinen, K., y Myllylä, G. (1968) Interaction of human blood platelet, viruses and antibodies. I. Platelet aggregations test with microequipment. Ann. Med. Fenn. 46:-188-192