

15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

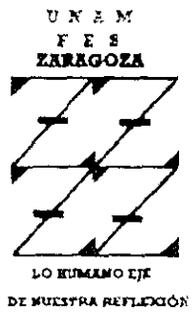
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

ANALISIS DE LA COMPLEMENTARIEDAD METODOLOGICA EN LA DETECCION DE COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES DE PACIENTES CON DIVERSAS ENFERMEDADES REUMATICAS AUTOINMUNES.

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO P R E S E N T A : EVALUZ ESPINOSA VILLA

297703

TUTOR: M. EN C. NORMA R. CAPIN GUTIERREZ ASESOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA



MEXICO, D F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**ANÁLISIS DE LA COMPLEMENTARIEDAD
METODOLÓGICA EN LA DETECCIÓN DE COMPLEJOS
INMUNES CIRCULANTES DE PACIENTES CON
DIVERSAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS
AUTOINMUNES**

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LA SECCIÓN DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL LABORATORIO DE
INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL
CENTRO MÉDICO NACIONAL
LA RAZA, I.M.S.S.**

JURADO

PRESIDENTE DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
VOCAL M en C NORMA CAPÍN GUTIÉRREZ
SECRETARIO · Q.F.B. MA DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURÁN
SUPLENTE M C. ALFREDO JESÚS MIRANDA SÁNCHEZ
SUPLENTE M en C MARÍA JOSÉ MARQUES DOS SANTOS

DEDICATORIA

CON TODO MI AMOR
PARA QUIENES SON Y HAN SIDO EL EJE DE MI VIDA

MIS PADRES CONSUELO Y EFRÉN
MIS HERMANOS GONZALO, CESAR, JOSÉ JUAN, FRANCISCO
JAVIER, ZANDRA Y JULIO
MIS ABUELOS GONZALO, ASUNCIÓN Y ERNESTINA
MIS HIJOS EVALUZ Y FRANCISCO JAVIER
MI ESPOSO ALEJANDRO

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Norma Capín por sus conocimientos, paciencia y comprensión
¡Gracias Norma!

Agradezco al Dr. José Ramón Paniagua Sierra, por confiar en mí y apoyar el
proyecto, por todas sus palabras de aliento.

Le agradezco a la maestra, Q.F.B. Yolanda Flores, porque sin ella, este trabajo
no hubiera sido posible ¡Gracias maestra!

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Alfredo Jesús Miranda Sánchez por todo
su apoyo y confianza depositados en mí ¡Mil gracias!

Al Dr. Rubén Marroquín Segura, quien con esa sencillez, paciencia y
comprensión, que lo caracterizan, ha sido el maestro ejemplar ¡Gracias
maestro!

Especialmente agradezco a la Q.F.B. Martha Sánchez Rodríguez, por su apoyo
moral y en la revisión del presente escrito, le agradezco porque siempre ha sido
ejemplo de constancia y la maestra amiga de todos los que nos acercamos a
ella ¡Muchas gracias!

Agradezco a Dios por darme amigos tan especiales, Angeles, Ana María,
Loreto, Tere, Isabel, Susi, Alba, Almita y doña Rose Mary ¡Gracias!

A Martín y a Paco, porque la nobleza de sus corazones ha sido incondicional y
mucho de lo que soy se los debo a Ustedes ¡Gracias!

CONTENIDO

I Resumen.	1
II Introducción.	2
III Fundamentación teórica .	4
IV Antecedentes .	4
1. Complejos inmunes .	4
2. Patogénesis de la enfermedad por CI .	6
3. Fisicoquímica de la unión antígeno-anticuerpo .	10
4. Precipitación de CIC .	13
5. Antígenos.	15
6. Anticuerpos	15
7. Complemento	18
V Planteamiento del problema	22
VI Objetivos	23
1. Objetivo general	23
2. Objetivos particulares	23
VII Hipótesis de trabajo	24
VIII Metodología	24
1. Tipo de estudio	24
2. Universo de trabajo	25
A Grupo experimental	25
B Grupo control	25
C Variable dependiente	25
D Variable independiente	25
3. Material y métodos	26
A Material y equipo	26
a Equipo	26
b Material	26
c Material biológico	27
d Soluciones y reactivos	27
B Forma de muestras	28

C	Preparación de Gamma Globulina Humana	29
D	Métodos clínicos	29
	1 Cuantificación de CIC por nefelometría láser	29
	1.1 Fundamento teórico	29
	1.2 Procedimiento	30
	2 Determinación de CIC por Anafilaxia Cutánea Pasiva	32
	2.1 Fundamento teórico	32
	2.2 Procedimiento	34
	3. Cuantificación de CIC por ELISA con C1q	36
	3.1 Fundamento teórico	36
	3.2 Procedimiento	38
	4 Determinación de CIC por Consumo de Complemento	40
	4.1 Fundamento teórico	40
	4.2 Reacción de Consumo de complemento	40
	5 Determinación de CIC por vía alterna de complemento	43
	5.1 Fundamento teórico	43
	5.2 Procedimiento	43
E	Métodos estadísticos	46
IX	Resultados	50
	1. Cuantificación de CIC por nefelometría láser	50
	2. Determinación de CIC por Anafilaxia Cutánea Pasiva	52
	3 Determinación de CIC por ELISA con C1q	54
	4 Determinación de Consumo de Complemento	57
	5 Determinación de CIC por la Vía alterna del Complemento	60
	6. Tablas resumen	67
X	Análisis estadístico	67
XI	Valoración clínica de los cinco métodos para detectar CIC	72
XII	Discusión de resultados	73
XIII	Conclusiones	83
XIV	Sugerencias	85
XV	Bibliografía	86

I. RESUMEN

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, transversal y comparativo aplicando metodologías complementarias con la finalidad de detectar la mayor gama de complejos inmunes circulantes (CIC) en diversas enfermedades reumáticas autoinmunes (ERAJ), como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), la Artritis Reumatoide (AR), y en pacientes con probable ERAJ (P ERAJ)

Los métodos seleccionados fueron Nefelometría Láser, Anafilaxia Cutánea Pasiva, ELISA con C1q, Consumo de Complemento y activación de la Vía Alterna del Complemento, cada uno con fundamento diferente. Esto se demostró al no presentarse ninguna correlación entre ellos, lo cual permitió detectar CIC con características distintas.

Se analizaron 50 muestras de pacientes con diagnóstico de ERAJ y 50 sujetos sanos, se realizaron las curvas de calibración de los métodos, se calcularon las medias, desviaciones estándar, coeficientes de correlación, los valores de corte, sensibilidad y especificidad diagnóstica

El método con mayor Sensibilidad diagnóstica fue Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA) con un 76%, y el de mayor Especificidad diagnóstica fue el Consumo de Complemento con un 100%, sin despreciar a los demás métodos los cuales tienen una especificidad entre 90 y 100% La prueba de PCA fue la que detectó mayor cantidad de sueros positivos a CIC, es probable que esta mayor sensibilidad se deba a que el método es "in vivo" y los CIC existentes en el suero de los pacientes puedan activar tanto la vía clásica y la vía alterna del complemento con la consecuente liberación de sustancias quimiotácticas, anafilácticas y de aminas vasoactivas aumentando la posibilidad de detectar una mayor cantidad de CIC

Por todo lo anterior, se concluye que es importante el empleo simultáneo de varios métodos en la medición de CIC y la realización de varios estudios en diferentes estadios de la enfermedad ya que estos pueden encontrarse depositados y no circulantes

II. INTRODUCCIÓN

Los Complejos Inmunes (CI) son el resultado de la combinación de anticuerpos con el antígeno endógeno o exógeno(1), los cuales pueden encontrarse solubles en la circulación sanguínea, en los espacios extracelulares y localizados formando parte de un tejido o una célula. Los complejos formados en la circulación, son llamados Complejos Inmunes Circulantes (CIC) y al depositarse en los tejidos pueden producir inflamación aguda o crónica. Los CI pueden mediar el daño en gran variedad de enfermedades, algunos antígenos catiónicos tales como los nucleosomas (2) pueden enlazarse a la membrana basal glomerular, vasos sanguíneos, plexo coroideo, y producir daño como glomerulonefritis, vasculitis, artritis, erupciones en la piel, pleuritis y pericarditis así como daño cerebral. En el LES y la AR, las manifestaciones clínicas y presencia de CI varía de paciente a paciente y del estado evolutivo de la enfermedad (3,4)

La medición de los CIC puede ser útil para el diagnóstico, pronóstico, y monitoreo de la enfermedad y orientación para el tratamiento terapéutico, por esto es importante su detección en el laboratorio clínico

La heterogeneidad de los CIC y su variabilidad, es el principal problema para su detección y cuantificación. Por lo que se han desarrollado varios métodos basados en la detección de diferentes propiedades fisicoquímicas de los CIC, sin embargo, la poca correlación entre ellos obliga a buscar nuevas alternativas para atacar el problema. Las metodologías van desde las más sencillas hasta las más sofisticadas, tales como el uso de nefelometría (5), el enlazamiento a C1q (6), la tomografía con emisión de positrones (7), y la microscopía electrónica (8) entre otras. Sin embargo, ninguna de las pruebas establecidas es suficiente para detectar la gran variedad de CIC existentes posibles en los pacientes, y una alternativa es utilizar varias técnicas con diferente sensibilidad y especificidad para incrementar su detección en la amplia gamma de CIC presentes.

El objetivo de este trabajo es lograr detectar una mayor cantidad de CIC en

sueros de pacientes con enfermedades reumáticas autoinmunes (ERAI) como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y la Artritis Reumatoide (AR) por medio de la complementariedad de diferentes métodos. Los sueros que resulten positivos por un método no necesariamente lo serán por los otros.

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Los CI se encuentran en una amplia gama de enfermedades tales como LES (2,4), AR (9,10), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (11), diabetes mellitus (12), cáncer (13), melanoma (14), entre otras. Además, se han involucrado en mecanismos tales como la apoptosis (15,65).

Desde principios de siglo (16), a la fecha se han desarrollado metodologías muy diversas como son, enlazamiento a C1q, precipitación con PEG, microscopia electrónica, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo con células Raji, interacción con antiglobulinas, ultracentrifugación, ELISA, consumo de complemento etc.(6,8,10) para cuantificar los CI, las cuales aunque específicas y sensibles sólo detectan, cada una de ellas, cierto tipo de complejos y ninguna es suficiente para detectar la gran heterogeneidad de los posibles CI presentes. Por esta razón, se pretende correlacionar varias metodologías complementarias cuya sensibilidad y especificidad pongan de manifiesto la totalidad de los CIC de las diferentes ERAI y obtener resultados de mayor utilidad diagnóstica.

La selección de los métodos empleados se realizó basándose en su diferente especificidad y sensibilidad para detectar diversas propiedades fisicoquímicas de los complejos inmunes. Como son, en la Nefelometría, el tamaño del complejo, en el PCA los CIC fijadores de complemento vía clásica y alterna "in vivo", en el ELISA, y el Consumo de Complemento los CIC fijadores de complemento vía clásica, y en la Vía alterna de complemento detectar CIC activadores de la vía alterna "in vitro" Además de que son pruebas sencillas y de bajo costo

IV. ANTECEDENTES

I. COMPLEJOS INMUNES

El estudio de los CI inició en 1862, con Maurice Raynaud, donde se menciona

por primera vez el concepto de “enfermedad causada por complejos inmunes” (16). Sin embargo, los CIC se han encontrado en la circulación de personas sanas sin ninguna manifestación patológica (17), siendo un fenómeno normal de la respuesta inmune, aquí juega un papel muy importante la afinidad antígeno-anticuerpo.

Los CIC en ocasiones pueden provocar daño tisular produciendo enfermedad por depósito de complejos fijadores de complemento sobre los tejidos, los cuales son complejos de alta afinidad y en sujetos sanos son de baja afinidad o no son fijadores de complemento por lo tanto no causan daño. Los complejos inmunes localizados en las paredes vasculares producen hiperplasia del endotelio, necrosis de la pared vascular, gran infiltración por parte de los neutrófilos, aumento de la permeabilidad vascular. Las lesiones son muy prominentes en el riñón con liberación de grandes cantidades de proteína. En la lesión tisular pueden visualizarse CI mediante inmunofluorescencia.

En el glomérulo el complejo antígeno-anticuerpo aparecen en forma granular e irregular, el antígeno no se deposita en los vasos sanguíneos, son los complejos solubles circulantes, de un tamaño pequeño formados por una o dos moléculas de antígeno con una o dos de anticuerpo que intervienen en la producción de enfermedades, son los complejos que se forman cuando hay exceso de antígeno, los que circulan durante más tiempo y tienen la oportunidad de localizarse en los vasos sanguíneos y producir la inflamación. Al progresar la respuesta inmune y formarse más anticuerpo, se forman complejos grandes que se combinan fácilmente con los fagocitos o células de Kupffer del hígado y del bazo y circulan poco y son catabolizados y eliminados, por lo tanto, no participan en la lesión del tejido (18). A medida que pasa el tiempo, se forma más anticuerpo, se elimina el antígeno y todos los complejos inmunes desaparecen de la circulación, la causa de la patología clínica ya no existe y los síntomas clínicos disminuyen.

El aumento de la permeabilidad vascular que permite a los complejos penetrar en las paredes vasculares se debe a las aminas vasoactivas como la histamina o

la serotonina (19), la IgE participa y se combina con los basófilos circulantes y produce la liberación de aminas vasoactivas. Así como el factor activador de plaquetas (PAF) el cual hace que las plaquetas se encuentren adheridas al endotelio se agreguen y liberen mediadores intracelulares, tales como las prostaglandinas. También, hace que los neutrófilos se agreguen y liberen enzimas lisosomales y que los vasos sanguíneos aumenten la permeabilidad a las proteínas. Si los fagocitos del hígado y del bazo, disminuyen su actividad, los complejos circulan más tiempo y pueden localizarse en otros tejidos y producir daño.

El riñón es el órgano más expuesto a presentar patología por CI (20,21), los cuales al quedar atrapados con facilidad en la membrana basal glomerular (MBG), a causa de la estructura del endotelio renal, que permite estar en contacto directo con la sangre por el alto flujo sanguíneo y la alta presión hidrostática en los glomérulos favorecen el daño por depósito. Estos depósitos electrodensos pueden ser o no fijadores de complemento y producir daño glomerular e identificarse mediante inmunofluorescencia, el resultado final es la insuficiencia renal crónica, con marcada proteinuria y azoemia.

Los CI, pueden disociarse por la adición de proteínas del complemento que se insertan en el enrejado de los complejos, facilitando su aclaramiento, por medio de la formación de CI ricos en C3b, los cuales son solubles y sin poder inflamatorio, son captados rápidamente por las células de Kupffer en las sinusoides hepáticas y rápidamente catabolizados (22,23). Se ha encontrado que los individuos con ausencia completa de C2 y C4 tienen una incidencia mayor de enfermedad por CI (24).

2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD POR CIC

Las interacciones antígeno-anticuerpo pueden producir diferentes tipos de lesiones tisulares, estos daños son en gran parte debido a la activación del complemento el cual es activado por la vía clásica, alterna y de las lectinas.

Durante la activación se forman factores quimiotácticos y anafilácticos que atraen neutrófilos y se combina con los CI a través del receptor C3b de superficie, los neutrófilos fagocitan los complejos, durante la fagocitosis se secretan enzimas, sustancias químicas inflamatorias de los neutrófilos y se produce el daño a la pared vascular (25).

Los antígenos deben satisfacer tres condiciones para provocar la enfermedad, el antígeno debe ser inmunogénico, la cantidad de antígeno administrada debe ser grande y debe de circular durante períodos suficientes para permitir que el anticuerpo se combine con ellos.

El factor más importante para el desarrollo de la enfermedad crónica por complejo inmune es la presencia continua del antígeno. Existen diferentes tipos de antígenos que intervienen en la patología de enfermedades por CIC, como son, proteicos, bacterianos, parasitarios, vírales, autólogos y desconocidos

En algunas enfermedades como el LES (26), hay un marcado aumento en la producción de autoanticuerpos, se destacan los anticuerpos al DNA nativo, al DNA de una sola cadena, a una variedad de nucleoproteínas, nucleosomas, componentes citoplasmáticos, antígenos de plaquetas, eritrocitos y neutrófilos, los autoanticuerpos pueden combinarse con antígenos de la sangre o de los líquidos de tejidos extracelulares y formar CI que provocan lesión tisular. Los complejos DNA-antiDNA, que se hallan en la membrana basal glomerular (MBG), de los pacientes con lupus, son los principales responsables del daño tisular en el LES (27).

La AR (28,29) es una enfermedad inflamatoria crónica de las articulaciones, donde están implicados los CI formados por anticuerpos de clase IgM o IgG, que reaccionan con la IgG autóloga. A estos autoanticuerpos se le llama Factor Reumatoide (FR)

La lista de padecimientos en los que se han encontrado CI (30,31,32,33,34,35), cada día va en aumento como se puede ver en la tabla 1, razón por la cual se multiplican los estudios que tratan de aclarar, los mecanismos de formación y daño de los CIC, así como la metodología para cuantificarlos, esto puede servir

para el monitoreo de la enfermedad, así como para la evaluación del tratamiento y el pronóstico de la enfermedad, pero se requiere que la detección de los CIC sea lo más próximo al 100% de los casos, ningún método ofrece esto, por lo que se requiere realizar varios estudios que se complementen, para una mayor detección de CIC en los padecimientos.

TABLA 1.

PADECIMIENTOS FRECUENTES EN LOS QUE SE HAN ENCONTRADO CIC (36)
1. ENFERMEDADES AUTOINMUNES
Lupus eritematoso sistémico
Artritis reumatoide
Vasculitis
Púrpura trombocitopénica
Nefropatía tipo IgA
2) INFECCIONES VIRALES
Mononucleosis infecciosa
Hepatitis
Influenza
Rubéola
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
3) INFECCIONES PARASITARIAS
Tripanosomiasis
Kala-azar
Malaria
Esquistosomiasis
Filariasis
4) ENFERMEDADES INFLAMATORIAS CRÓNICAS
Tuberculosis
Lepra
Sífilis
Brucelosis
Endocarditis bacteriana
Salmonelosis
Colitis ulcerativa
5) ENFERMEDADES MALIGNAS
Cáncer
Seminoma
Carcinoma
Linfoma
Melanoma
6) ENFERMEDADES CRÓNICAS
Enfermedad crónica del hígado
Diabetes
Enfermedades pulmonares crónicas

3. FISICOQUÍMICA DE LA UNIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

La formación de los CI es un equilibrio dinámico y se realiza cuando se combina en la circulación el antígeno y el anticuerpo correspondiente. Las moléculas interactúan en una amplia variedad de fuerzas de enlace como son no covalentes, enlaces electrostáticos, dipolo, puentes de hidrógeno, fuerzas de Vander Walls y enlaces hidrofóbicos, todas estas fuerzas dependen del pH del medio (37,38).

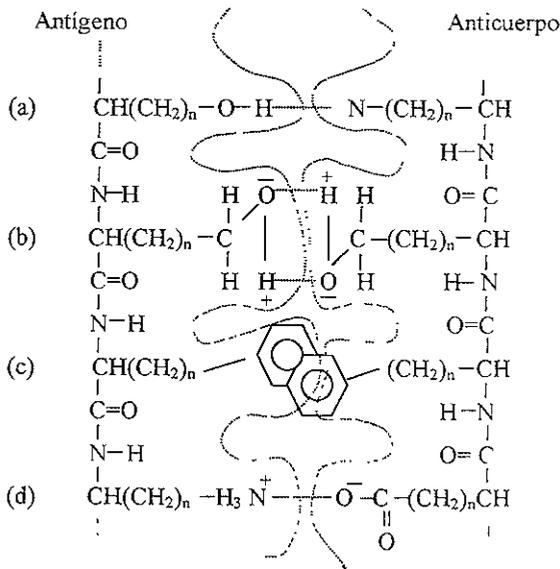


Figura 1. La interacción de un sitio de combinación de un anticuerpo con su determinante antigénico específico (u homólogo) involucra la participación de enlaces electrostáticos dentro de los que se encuentran a) los enlaces por puentes de hidrógeno, b) las interacciones entre dipolos, c) las interacciones hidrofóbicas y d) los enlaces iónicos o salinos, además de algunos otros. A diferencia de los enlaces covalentes que poseen alta energía de unión (32-100 kCal/mol), los enlaces electrostáticos son de baja energía (4-12 kCal/mol) y por lo mismo se disocian fácilmente (39).

La combinación del anticuerpo con el antígeno homólogo para formar un complejo es una reacción reversible



Donde K_a es una constante de asociación y K_d es una constante de disociación, la combinación de la población de anticuerpo y antígenos es descrito por la ley de acción de masas.

La constante de equilibrio y la extensión de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo se determina por la velocidad de reacción a la que el antígeno, no combinado se une al anticuerpo, comparada con la velocidad a la cual el complejo AgAb se disocia, los estudios de cinética demuestran que estas reacciones tienen velocidades de reacción más grandes a la derecha y hacia la izquierda más pequeñas, por lo tanto las constantes de equilibrio se determinan más por la estabilidad del complejo formado, que por la velocidad a la cual se combina el antígeno y el anticuerpo

Otro factor importante en la formación de los CI es que, para un determinante antigénico se forman diferentes anticuerpos, de los cuales algunos se unirán mejor a los antígenos que otros, estos con mejor ataque enlazarán el antígeno más fuertemente y esto nos conduce al concepto de afinidad que se refiere, a la energía de enlace potencial contenida en cada uno de los sitios activos del anticuerpo y en ella participan todas las posibles interacciones con el antígeno, estas a su vez están determinadas por el número y el tipo de grupos químicos reactivos presentes en el sitio de combinación, es por lo tanto una medida de la fuerza de combinación del antígeno con el anticuerpo. Cuando se trata de antígenos y anticuerpos multivalentes la interacción es más compleja y se le llama avidéz. Esta interacción origina diferentes tipos de complejos como se ve en la figura 2

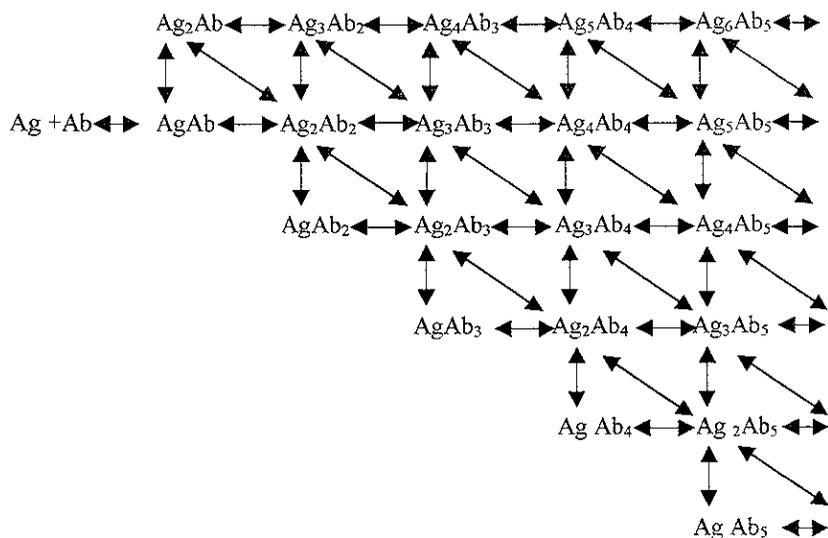


Figura 2. Esquema de reacción de las interacciones antígeno-anticuerpo. El complejo posible más simple es $AgAb$, y este puede crecer en diferentes formas (1) por adición de una molécula de antígeno (flechas verticales), (2) por adición de una molécula de anticuerpo (flecha diagonal) y (3) por adición del complejo más simple (flechas horizontales) (40)

En la mayoría de las reacciones antígeno-anticuerpo, la interacción primaria es el reconocimiento específico y la combinación de un determinante antigénico, con un sitio de unión en su correspondiente anticuerpo. Se conoce que los aminoácidos importantes para la combinación con el antígeno se localizan en la región hipervariable de las cadenas H y L, la formación de los CIC depende también de otros factores como los enunciados en la tabla 2

TABLA 2

**FACTORES QUE INFLUYEN EN EL TAMAÑO Y COMPOSICIÓN
MOLECULAR DE LOS CIC (41)**

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS

Clase, afinidad, número de sitios de reconocimiento específicos al antígeno y propiedades para enlazarse a complemento.

2. CARACTERÍSTICAS DEL ANTÍGENO

Tamaño, valencia, propiedades fisicoquímicas. carga, solubilidad, distribución estérica de los determinantes antigénicos

3. DISPONIBILIDAD

Concentración absoluta de reactivos (relación antígeno-anticuerpo), síntesis de anticuerpo, entrada de antígeno soluble a la circulación, eliminación de CIC por fagocitos del sistema retículo endotelial o por la deposición del complejo en el tejido

4. INTERACCIONES ENTRE ANTÍGENO Y ANTICUERPO

Enlaces hidrofóbicos, cargas, interacciones entre los mismos complejos (polimerización)

4. PRECIPITACIÓN DE LOS CIC

Cuando el antígeno y el anticuerpo respectivos interactúan "in vitro" formando un complejo inmune Ag-Ab, el CI puede permanecer soluble o precipitar. La reacción se considera no covalente, en la que las moléculas solubles pueden formar un precipitado, el factor más importante que determina su precipitación, es la concentración del antígeno y del anticuerpo, como se muestra en la figura 3 (40, 41)

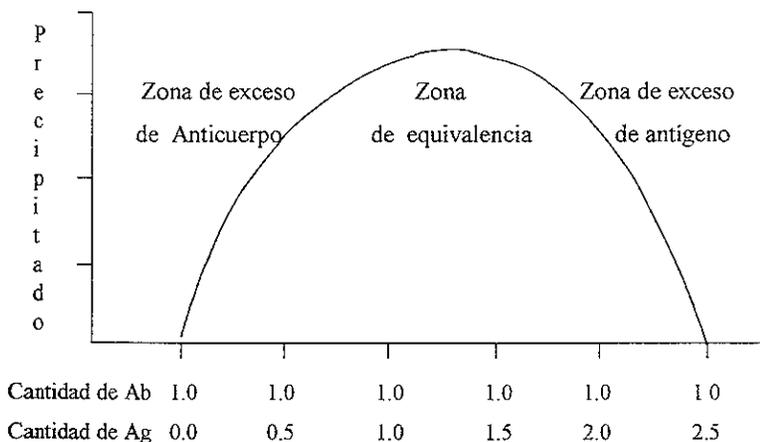


Figura 3. La curva de precipitación entre el antígeno y el anticuerpo tiene una forma de campana y en ella se distinguen tres zonas. Cuando la cantidad de anticuerpo se mantiene fija y se varían las concentraciones de antígeno se distinguen la zona de exceso de anticuerpo, la zona de equivalencia y la zona de exceso de antígeno. En las zonas de exceso de antígeno y de exceso de anticuerpo, aunque los reactantes se encuentren unidos, el tamaño de los agregados moleculares no es lo suficientemente grande, para salirse de la solución y precipitar, en estos casos, los CI se mantienen predominantemente como CI solubles (39).

En la zona de exceso de anticuerpo todo el antígeno adicionado, formará CI pequeños, los cuales no precipitarán de manera espontánea, no hay antígeno libre pero si anticuerpo, todos o la mayoría de los determinantes antigénicos se encuentran interaccionando con moléculas de anticuerpo.

En la zona de equivalencia, se alcanzará una concentración máxima de precipitado, en esta zona, el número de determinantes antigénicos es igual al número de sitios activos de los anticuerpos, por lo que el entrecruzamiento es máximo formándose así una red de precipitación, ninguno o por lo menos muy poco antígeno y anticuerpo permanece soluble.

En la zona de exceso de antígeno, con la adición de más antígeno se produce menos precipitado, los complejos formados son pequeños, porque los sitios activos de los anticuerpos han sido ocupados y las oportunidades de unión son limitadas, de modo que estos permanecen solubles.

5. ANTÍGENOS

Se llama antígeno a cualquier molécula soluble o particulada que puede unirse de forma específica a un anticuerpo producido en un animal inmunocompetente algunos de los antígenos más inmunógenos son los polisacáridos bacterianos, proteínas como las cubiertas de los virus, nucleoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, la mayor inmunogenicidad es la de las proteínas y la menor la de los ácidos nucleicos (22,24,39).

Debido a que las moléculas antigénicas son más grandes que su región de unión con el anticuerpo, se une a ciertas regiones llamadas determinantes antigénicos o epitópos, existen múltiples epitópos por antígeno y cada uno de ellos puede ser reconocido por un anticuerpo distinto. En el caso de los fosfolípidos o de azúcares complejos, los determinantes dependen de la propia estructura primaria de la molécula, pero en el caso de los ácidos nucleicos y proteínas, es importante el plegamiento de estas moléculas

Las condiciones necesarias para la antigenicidad de los antígenos son: la complejidad estructural, tamaño molecular, heterogeneidad estructural, carga eléctrica, accesibilidad de los determinantes antigénicos, conformación estérica configuración óptica y la forma física

6. ANTICUERPOS

Las inmunoglobulinas son moléculas glicoprotéicas con actividad de anticuerpo, es decir tienen la propiedad de combinarse con el antígeno inductor de su formación (41) Dichas inmunoglobulinas se pueden encontrar solubles en suero o plasma, o anclados a la membrana de los linfocitos B constituyendo el receptor para antígenos (BCR, B Cell receptor) de estas células

Todas las moléculas de anticuerpo comparten el mismo patrón estructural y poseen características fisicoquímicas muy similares, todas las moléculas de anticuerpo están constituidas de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) de 50-75 kD de aproximadamente 420 aminoácidos y dos cadenas ligeras (L) de 2 a 25 kD de 110 aminoácidos. Dentro de las cadenas H y L tenemos regiones variables y regiones constantes. La comparación de las secuencias de las cadenas pesadas y las ligeras revela la existencia de una gran variabilidad al nivel de los extremos aminoterminales (Nt) y a este grupo de aminoácidos próximos al extremo Nt se conoce como región variable VL, para las cadenas ligeras y VH para las cadenas pesadas, la variabilidad de las regiones V no es uniforme, sino que se concentra en tres segmentos cortos denominados regiones de hipervariabilidad CDR1, CDR2 y CDR3.

Las cadenas polipeptídicas no existen como cadenas lineales de aminoácidos, sino que están plegadas por enlaces disulfuros en regiones globulares llamados dominios, de la cadena H, se designan V_H y $C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}$ y los dominios de la cadena L, se designan V_L y C_L . En las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgD se han identificado 3 dominios C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} , en las inmunoglobulinas IgE e IgM se ha identificado un dominio adicional C_{H4} . La propiedad biológica de fijar el complemento radica en la fracción Fc de las inmunoglobulinas.

Los estudios de interacción de los diferentes fragmentos generados por hidrólisis enzimática con el antígeno permitieron establecer que los sitios de combinación de la molécula del anticuerpo, que se combina con el antígeno esta formado por sólo un pequeño número de aminoácidos en las regiones V de las cadenas H y L y radica en el extremo amino terminal. Las inmunoglobulinas interaccionan y activan al sistema complemento, en el dominio C_{H2} de la IgG y en el dominio C_{H3} de la IgM, asimismo, las inmunoglobulinas que se fijan a las células cebadas y basófilos lo hacen a través de sus dominios C_{H3} (IgG) o C_{H4} (IgE) (39).

Una región importante en la molécula de inmunoglobulina es la región de la bisagra, es una zona flexible y está expuesta a las enzimas y a sustancias como

la papaína, la pepsina y al 2-mercaptoetanol.

Los enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína son esenciales para la estructura normal tridimensional, estos enlaces pueden ser de cadena H a cadena H, de cadena H a cadena L, de Cadena L a cadena L, la estructura de la inmunoglobulina se muestra en la figura 4.

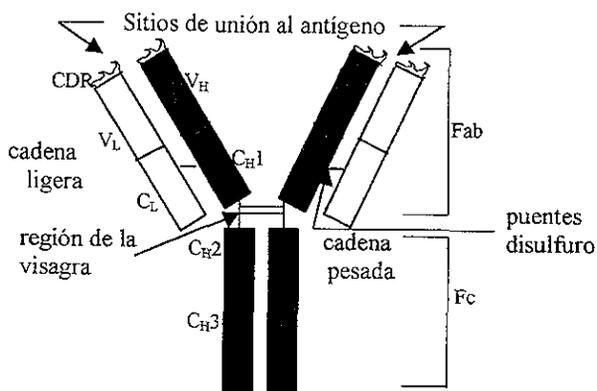


Figura 4. La molécula de inmunoglobulina tiene dos cadenas polipeptídicas diferentes: la cadena pesada (obscura) y la cadena ligera (clara). Cada inmunoglobulina está formada por dos cadenas ligeras idénticas y dos pesadas también idénticas, las cuales se unen por medio de los puentes disulfuro; las cadenas pesadas quedan divididas en dominios C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4} y V_H; las cadenas ligeras en dominios llamados V_L y C_L. La digestión con papaína rompe las inmunoglobulinas en dos fragmentos: un Fc receptor de complemento y dos Fab receptores de antígeno. En la región variable hay regiones CDR que son las receptoras de antígeno (38)

Las inmunoglobulinas humanas están clasificadas en cinco clases o isotipos, basadas en la estructura primaria de sus respectivas cadenas pesadas, IgG (γ), IgA (α), IgM (μ), IgE (ϵ), IgD (δ) y pueden contener cualquiera de los dos tipos de cadenas ligeras κ y λ . Las características de cada una de las inmunoglobulinas están contenidas en la tabla 3.

TABLA 3
CARACTERÍSTICAS GENERALES Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS
DE LAS INMUNOGLOBULINAS (39)

Clase	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Cadenas pesadas	mu (μ)	gamma (γ)	alfa (α)	delta (δ)	epsilon (ϵ)
Polimerización	pentamero	monómero	dímero	monómero	monómero
Coefficiente de Sed	19S	7S	7S/13S	7-8S	8S
Peso molecular kD	900	140-150	160/320	150-160	200
Cont. de carbohid. (%)	10	2.5	10	6	12
Cadena J	si	no	si	no	no
Componente secretor	no	no	si	no	no
Valencia	5	2	2/4	2	2
Termoestabilidad a 56°C	estable	estable	estable	estable	lábil
Conc. en suero (mg/dl)	50-200	800-1600	50-500	3-5	15-450
Abundancia en secrec	\pm	+	+++	-	-
Paso a través de placenta	no	si	no	no	no
Activación de Complemento	si	si	no	no	no
Vida media en días	9-11	25-35	6-8	2-3	2
Afinidad por cel cebadas	no	si(IgG1)	no	no	si
Afinidad por macrófagos	no	si	no	no	no

7. COMPLEMENTO

El sistema complemento (23,39) es el mecanismo efector humoral más importante de la respuesta inmune y junto a los fagocitos es responsable de la inmunidad innata, la función principal es la eliminación de patógenos y el inicio de la inflamación, los componentes interactúan entre sí. Las proteínas del complemento se activan en cascada, permitiendo amplificar una respuesta inicialmente débil, una sola molécula de C3b activa a millones en pocos minutos. La activación se realiza por diferentes vías, la vía alterna, clásica y de

las lectinas (38) las cuales convergen en una fase terminal o lítica. La vía alterna, se activa a partir de C3b formado en la vía clásica o de forma espontánea, las superficies activadoras, como las paredes bacterianas, permiten la unión covalente de C3b y lo protegen de la acción inactivadora del factor I que hidroliza a C3b para generar iC3b (C3b inactivo) y C3f, y después a iC3b en C3c y C3dg. El factor B se une a C3b en el complejo C3bB, que es hidrolizado por D para dar la proteasa C3bBb. Esta es estabilizada por el factor P o properdina y a su vez hidroliza a C3, formándose así, más moléculas de C3b, que actúan como puntos de formación de más complejos C3bBb y se unen a ellos. El complejo resultante C3bBb3b actúa como convertasa de C5, dando lugar a los fragmentos C5a y C5b. La activación de la vía alternativa supone un mecanismo de amplificación del sistema complemento, ya que utiliza como sustrato a su producto (C3b).

La vía clásica sólo se activa en respuesta a complejos antígeno-anticuerpo, es muy selectiva y esta acoplada a la inmunidad específica a través de los anticuerpos. Se activa por la unión del complejo antígeno-anticuerpo a C1q, la región Fc de una molécula de IgM, IgG1, IgG2, IgG3 unida al antígeno interacciona con el complejo C1 (C1q-C1r-C1s) y provoca un cambio conformacional, que hace que el C1r hidrolice a C1s para que pueda hidrolizar a C4 y generar C4b y C4a. C1q no se une a IgG4, IgE, IgA o IgD. Un enlace tioéster de C4 queda expuesto en C4b, lo que permite unirse covalentemente al patógeno. C4b es atractivo para C2, que al unirse se hace sustrato de C1s generando la convertasa de C3 de la vía clásica (C4b2a). Posteriormente, ésta hidroliza a C3 dando los fragmentos C3b y C3a. C3a fomenta la migración y activación de los fagocitos, y C3b se asocia con C4b2a para formar el complejo C4b2a3b, que es la convertasa de C5. El fragmento C5b se une covalentemente a la superficie activadora, convirtiéndose en un punto de formación del complejo de ataque a la membrana. Por su parte C5a y C3a son anafilatoxinas, que se unen a receptores específicos en mastocitos y basófilos, induciendo desgranulación y liberación de histamina aumentando la permeabilidad vascular.

y el flujo sanguíneo local por contracción del músculo liso.

Se dice que una tercera vía de activación del complemento es a través de un mecanismo independiente de anticuerpo, se inicia por una lectina, es decir, una proteína específica de carbohidratos como la presente en la superficie de muchos microorganismos denominada MBL (manosa binding lectin o lectina que une manosa). MBL se pega a los patógenos, activa a una serín proteasa y es capaz de inducir la actividad lítica del complejo de ataque a la membrana y la promoción de la fagocitosis por la vía clásica, en la figura 5. se observan las tres vías de activación del complemento

Vía clásica

Complejo antígeno-anticuerpo
(IgG o IgM)

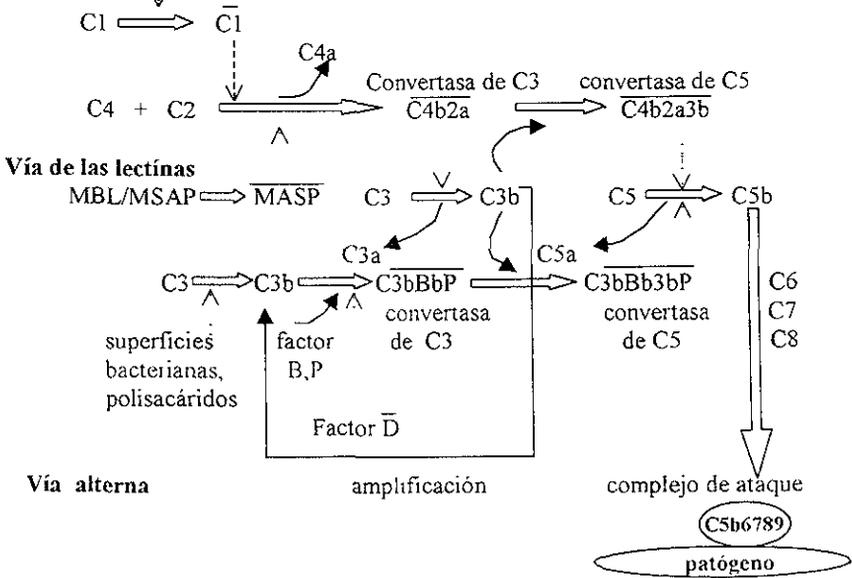


Figura 5. Activación del complemento por las tres vías, clásica, alterna y de las lectinas (38)

El fragmento C3b es el punto de confluencia de las vías de activación, una vez formado C3b, se une covalentemente a las superficies activadoras, y por la simple acción de la vía alterna conduce a la activación del proceso terminal a través del fragmento C5b generado por la convertasa $\overline{\text{C3bBb}}$. De todas las proteínas del complemento, el componente C3 es el de mayor concentración en sangre y tiene proteínas reguladoras que impiden su activación espontánea, C3 está formado por dos cadenas α y β unidas por puentes disulfuro. La cadena α contiene todos los lugares de unión con las membranas y receptores, cuando C3 es activado por la convertasa se producen dos fragmentos procedentes de la cadena α (C3a, C3b). Un enlace tioéster del fragmento C3b queda expuesto al medio, la mayoría de las moléculas de C3b (que está en estado activo se denomina metaestable), reacciona con agua y no participan en la activación de la cascada. Un porcentaje de moléculas de C3b forman uniones covalentes con los patógenos iniciando la vía alternativa, o con las convertasas de C3 (C4b2a, C3bBbP), dando lugar a las C5 convertasas generadas por la vía clásica o alternativa, inician la activación de los factores *terminales del complemento*, para formar el complejo C5b678, la actividad lítica se adquiere cuando el C9 se adhiere para formar el canal cilíndrico transmembranal. Los poros formados en la superficie celular producen lisis por ósmosis y estallamiento.

Cada componente del complemento realiza una función especial, por ejemplo el C1q es capaz de reconocer los complejos antígeno-anticuerpo, la MBL tiene una función equivalente al C1q reconoce azúcares de los patógenos, otros son amplificadores como el C1r, C1s, MASP, C2a, Bb y D. Otros fragmentos de proteínas (C2a y Bb) son capaces de fijar covalentemente a las dos proteasas centrales (C3b y C4b) sobre el patógeno o antígeno cerca del cual se está activando complemento. Los fagocitos y otras células como los eritrocitos tienen estos receptores y por eso su deposición sobre los patógenos o antígenos (opsonización) mejora la fagocitosis y la eliminación de CIC. Además el C5a es un factor quimiotáctico, que atrae monocitos, neutrófilos y macrófagos al lugar de activación del complemento.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde 1862 (16) se han desarrollado diversas metodologías para demostrar la presencia de los complejos inmunes circulantes (CIC) (6,42,43) Sin embargo, cada una de ellas se basa en la detección de sólo algunas de las propiedades fisicoquímicas de la gran heterogeneidad de CIC, lo que provoca que algunas técnicas no detecten la presencia de CIC en tanto que otras sí. Debido a que no se tiene un método capaz de cuantificar la gran variedad de propiedades fisicoquímicas de los diferentes tipos de complejos inmunes

Se realizó un análisis de los métodos más accesibles de realizar en el laboratorio clínico, y que en forma conjunta detecten la presencia de la gran gama de CIC existentes. Estos métodos fueron valorados por su sensibilidad y especificidad, sobre las diversas propiedades fisicoquímicas de los Complejos Inmunes (CI) contenidos en los sueros de los pacientes, entre otras, si son fijadores de complemento vía clásica o vía alterna o si no lo son Con este criterio los métodos evaluados fueron:

- Nefelométrico con PEG (Creighton 1973)
- Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA) (Watanabe 1977)
- ELISA por C1q (Lin 1983)
- Consumo de Complemento (Harkiss 1979)
- Cuantificación del inductor de la vía alterna del complemento (VAC) (Fine 1972)

Todos estos métodos fueron analizados experimentalmente en un grupo de pacientes con enfermedad reumática autoinmune (ERA) y se evaluó la importancia de su complementariedad metodológica en la detección de los diversos tipos de CI

VI. OBJETIVOS

Objetivo General

Detectar la mayor cantidad de CIC de la gran heterogeneidad de CIC existentes en los sueros de pacientes con diversas enfermedades reumáticas autoinmunes y otras enfermedades sugestivas de presencia de CIC, por medio del empleo de diversas metodologías complementarias, para hacer evidente dichos complejos.

Objetivos particulares

1. Seleccionar los posibles métodos complementarios que sirvan para detectar el 100% de los complejos inmunes.
2. Colectar muestras de pacientes con CIC en enfermedades reumáticas autoinmunes y en otras enfermedades con sospecha de presencia de CIC y sujetos sanos de banco de sangre
3. Determinar la sensibilidad y especificidad de las diversas metodologías seleccionadas
 - a) Cuantificación de CIC por Nefelometría LASER
 - b) Determinación de CIC por Anafilaxia Cutánea Pasiva
 - c) Cuantificación de CIC por ELISA con CIq
 - d) Determinación de CIC por Consumo de Complemento
 - e) Determinación de CIC por activación de la Vía Alternativa del Complemento
4. Analizar los resultados obtenidos por los cinco métodos y determinar su complementariedad e importancia de su integración para la adecuada y correcta interpretación en la detección de la presencia de la gran gama de los diversos tipos de CIC

VII. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Con base, en el fundamento de cada método y potencialmente el tipo de complejos que pueden detectar se espera, poder cuantificar con el método nefelométrico, todo tipo de complejos excepto los de naturaleza lipoproteica y los de tamaño grande, que serán eliminados por delipidación y centrifugación, con el método de Anafilaxia Cutánea Pasiva se demostrará la presencia de complejos fijadores de complemento por las dos vías, con los métodos ELISA con C1q y Consumo de Complemento se cuantificarán aquellos complejos fijadores de complemento por la vía clásica y el método de la vía alterna detectará aquellos complejos activadores por esta vía.

En consecuencia se encontrará la mayor sensibilidad y especificidad para detectar la amplia gama de CIC presentes en pacientes con ERAI y/o en otras enfermedades sugestivas de CI. Al complementarse los métodos seleccionados para la detección de las diferentes propiedades fisicoquímicas de la gran heterogeneidad de CIC posibles en cada paciente Los sueros que resulten con CIC por un método no necesariamente tendrán que serlo por los demás Por lo tanto se requiere de diversos métodos complementarios para lograr detectar el 100% de los casos de CIC. Un solo método puede no ser demostrativo de la presencia de CIC

VIII. METODOLOGÍA

1. TIPO DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio de tipo observacional, prospectivo, transversal y comparativo según la clasificación de Méndez

2. UNIVERSO DE TRABAJO

A. GRUPO EXPERIMENTAL

Criterios de inclusión

- a. Cincuenta pacientes, de ambos sexos, 32 de ellos con diagnóstico de LES, 8 con AR, 10 con diagnóstico probable de ERAI (P ERAI)
- b. Pacientes que acudían a la consulta de Reumatología.
- c. Pacientes clasificados de acuerdo a los criterios de la Sociedad Mexicana de Reumatología

Criterios de exclusión

- a. Pacientes que no acudían a la consulta de Reumatología
- b. Pacientes con otros padecimientos no reumatológicos

B. GRUPO CONTROL

Criterios de inclusión

- a. Sueros de 50 sujetos sanos del grupo de donadores del Banco de Sangre del Centro Médico la Raza, IMSS
- b. Edad entre 18 y 50 años
- c. De ambos sexos clínicamente sanos

Criterios de exclusión

- a. Todos los sujetos aparentemente sanos, pero rechazados por algún motivo, al ser entrevistados por el médico del Banco de Sangre

C. VARIABLE DEPENDIENTE

Concentraciones de los CIC, positividad a ellos

D. VARIABLES INDEPENDIENTES

Sexo y edad de los pacientes, tiempo de evolución

El diagnóstico con alguna enfermedad reumática autoinmune o sugestiva de CIC

3. MATERIAL Y MÉTODOS

A. MATERIAL Y EQUIPO

a. Equipo

Refrigerador 4°C

Congelador -70 °C

Centrífuga refrigerada

Centrífuga clínica

Nefelómetro

Espectrofotómetro

Lector de ELISA automático

Incubadora

Baño María

Potenciómetro

Agitador vortex genie

Cronómetro

Agitador magnético

b. Material

Tubos de ensayo 13 x 100

Tubos de centrífuga graduados

Tubos Eppendorf

Vasos de precipitado

Matraces aforados

Pipetas graduadas

Pipetas volumétricas

Pipetas automáticas 5, 10, 20, 50 y 75

Termómetro -10 a 200 ° C

Barra magnética

Membranas de diálisis

Celdas OVEI 055LN Universal Cuvettes

Especificaciones

Toledo OS-211

American

DAMON /IEC DIVISION, PR 6000

Sol-Bat, Mod J 12

Behring Laser Nephelometer

Zeiss, Mod. PM 2 DL

Biodist, LP 400, Sanofi P

MAPSA Mod. EC-445

Precision Scientific, W

Corning, Mod. 7

Lab-Line instruments

Tinemark

Sybron / Thermoline

Especificaciones

Pyrex

Pyrex

Pyrex 250, 500, 1000 mL

Pyrex 250, 500, 1000 y 2000 mL

Pyrex 1, 5, 10 mL

Pyrex 1, 5, 10 mL

Clinicon Mannheim GMBH

Brannan

Behring

Filtros Millipore HA tamaño de poro 0.45	Millipore
Rastrillos	Gillette
Placas inmunolón	Diamedix Microassay
Tijeras	
Gradillas	
Papel indicador	
Jeringas de 1 mL con aguja de 25x16 mm	Plastipack

c. Material biológico

20 cobayos albinos de 300 gr Aproximadamente
 50 sueros de pacientes (32 LES, 8 AR y 10 P. ERAI (Probable Enfermedad Reumática Autoinmune)
 50 sueros de personas clínicamente sanas
 Sangre tipo O, Rh positivo
 Gamma Globulina Humana (Lab. Hyland S.A. de C V)
 Mezcla de sueros humanos normales (como fuente de complemento)

d. Soluciones y reactivos

Sulfato de sodio 0.62 M
 Sulfato de sodio 2.18 M
 Hidróxido de sodio 5 N
 Hidróxido de sodio 3 N
 Amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 8, con cloruro de sodio 0.15 M (PBS)
 Amortiguador salina veronal pH 8.3
 Amortiguador de boratos 0.1 M pH 8.3
 Amortiguador carbonato de sodio 10X, pH 9.8
 Amortiguador veronal gelatina con EGTA 0.01 M, cloruro de magnesio 0.002 M
 EDTA disódica, 0.2 M pH 7.5 (EDTA)
 PEG al 3.6 % p/v en sol. de boratos 0.1 M, pH 8.3
 PEG al 12.5 % p/v en sol. de boratos 0.1 M, pH 8.3

PEG al 2.5 % p/v en sol. de boratos 0.1 M, pH 8.3
 Colorante azul de Evans al 0.5 % p/v en sol. salina estéril
 Solución de p-nitrofenilfosfato (p-NPP)
 Cloruro de sodio 0.85 % p/v
 Salina 0.9 % p/v, pH 7.5
 Eritrocitos de carnero sensibilizados al 0.5 %
 Solución de eritrocitos glutacionados
 Gamma Globulina Humana, Laboratorios Hyland, S.A. de C.V.
 Gamma Globulina Humana Agregada por calentamiento (GGHA)
 Control negativo plasma recalcificado, con azida de sodio 0.1 % p/v
 Control débil positivo: 6% de albúmina sérica bovina y bajo nivel de GGHA,
 con azida de sodio al 0.1 % p/v
 Control fuerte positivo 6% de albúmina sérica bovina y nivel alto de GGHA,
 con azida de sodio al 0.1 % p/v
 Conjugado de anti-IgG más IgM marcado con fosfatasa alcalina con 0.001 M y
 azida de sodio al 0.02 % p/v
 Diluyente sérico contiene albúmina sérica bovina al 0.6 %, tween 20 al 0.05 %
 en PBS 0.01M y azida de sodio 0.002 % p/v
 Heptanol Merck
 Butanol Merck
 Cloroformo Merck
 Inulina Merck
 Glutación reducido Merck

B. TOMA DE MUESTRA

A los pacientes en ayuno de 12 horas se les toma una muestra de sangre venosa,
 entre las 7:00 y 8:00 horas A.M. en tubo serológico de 13 x 100 mm sin
 anticoagulante, dejar reposar la sangre 1 hora para contracción del coágulo y
 posteriormente separar el suero por centrifugación a 1250 g por 10 min
 alícuotar y guardar en tubos Eppendorf y conservar a 20 ° C

C. PREPARACIÓN DE GAMMA GLOBULINA HUMANA AGREGADA POR CALENTAMIENTO (GGHA)(44,45)

Disolver la Gamma globulina humana (GGH) en 2 mL de amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 8, con cloruro de sodio 0.15 M, calentar a 63 °C por 25 min con agitación constante, dejar reposar la GGHA a 4°C en baño de hielo, por una hora y precipitar adicionando sulfato de sodio 2.18 M hasta obtener una concentración final de 0.62 M, resuspender el precipitado en amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 8 con cloruro de sodio 0.15 M, dializar la GGHA con el mismo amortiguador y cuantificar la concentración de proteínas por el método de Lowry (46) alicuotar la GGHA y guardar a -70°C

D. MÉTODOS CLÍNICOS

1. CUANTIFICACIÓN DE COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES POR NEFELOMETRÍA LÁSER

1.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

El método Nefelométrico se basa en la precipitación de los CIC, por la adición de concentración baja de PEG (3 6% del polímero PEG-6000) (47,48) a temperatura ambiente a la cual ocurre la precipitación rápidamente y sin desnaturalización del CI, produciendo una solución turbia, que se cuantifica por Nefelometría (5,49,50) la cual utiliza como fuente de luz una lámpara de Helio-Neón con una longitud de onda de 632.8 nm (fig 6) El rayo del Láser pasa a través de dos rejillas ópticas hacia la cubeta en donde se encuentra la reacción que va a ser medida, posteriormente el rayo que no se desvía en su trayectoria es atrapado en una trampa óptica La luz esparcida, por los CI de la cubeta es dirigida por un sistema de lentes convexas hacia un fotodiodo el cual transforma la energía luminosa en energía eléctrica, solamente la luz desviada en un ángulo de 5 ° y 11 ° es tomada en consideración, la intensidad de la luz desviada es proporcional a la concentración del complejo en la muestra

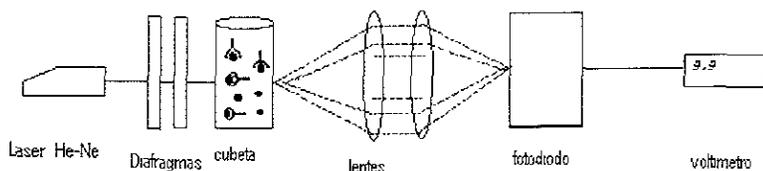


Figura 6. Cuantificación de CIC por nefelometría Láser con PEG

1.2 PROCEDIMIENTO

1.2.1 DELIPIDACIÓN DE LOS SUEROS

En un tubo de ensayo se añaden 1.5 partes de suero y una parte de la mezcla extractiva Heptano-Butanol (20:1 v/v) y se agita medio minuto, centrifugar por 10 minutos a 1600 g y de la fase superior, hacer una dilución de suero 1:10 en amortiguador de boratos 0.1 M, pH 8.3

1.2.1 MEZCLA DE REACCIÓN

Nota Todos los reactivos de la mezcla de reacción excepto, la muestra se filtran en filtros Millipore HA tamaño de poro 0.45 μm para eliminar las impurezas

En una celda, poner 10 μL de la muestra diluida 1:10 en amortiguador de boratos 0.1 M, pH 8.3, 20 μL de EDTA, 20 μL de amortiguador veronal salina pH 8.3, 10 μL de amortiguador de boratos 0.1 M, pH 8.3 y 200 μL de PEG-6000 (3.6% p/v en amortiguador de boratos), agitar e incubar una hora a temperatura ambiente, finalmente agitar suavemente y leer en el Nefelómetro. Preparar el blanco de reactivos con 20 μL de EDTA, 20 μL de amortiguador veronal salina, 20 μL de amortiguador de boratos y 200 μL de PEG-6000. Preparar la curva patrón con GGHA hacer 8 diluciones seriadas dobles y colocar 10 μL de suero humano normal delipidado y diluido 1:10, 20 μL de EDTA, 20 μL de amortiguador veronal salina y 200 μL de PEG-6000 a cada una de las celdas y continuar con el procedimiento arriba descrito (Fig 7)

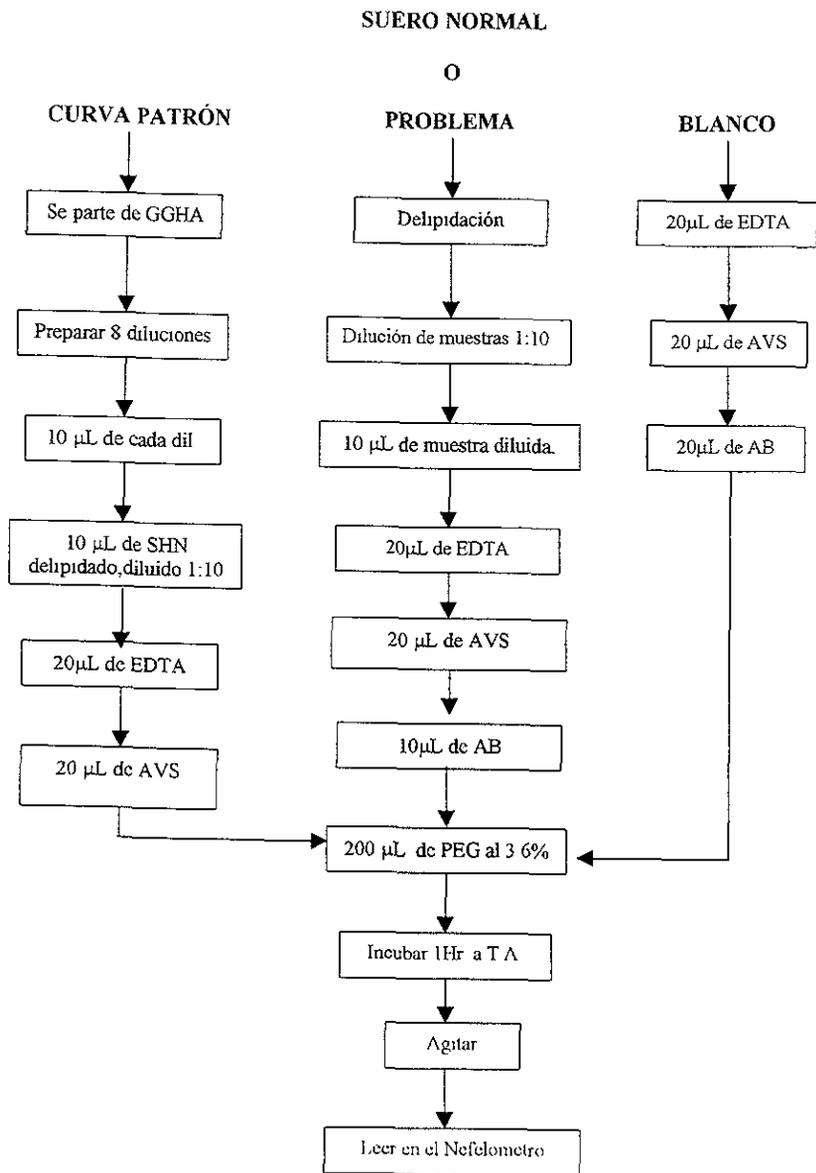


Figura 7. Diagrama de la determinación de CIC por Nefelometría Láser con PEG AVS amortiguador veronal salina, AB: amortiguador de boratos

2.DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES POR ANAFILAXIA CUTÁNEA PASIVA

2.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

Se basa en la reacción específica entre el CIC del paciente y el complemento del cobayo (42,43). La aplicación "in situ" de suero de paciente, deposita al CIC en la piel del cobayo, la activación del complemento (44) trae como consecuencia el incremento de la permeabilidad vascular y esto facilita la salida de líquido y de células hacia el sitio de la lesión, la liberación de factores quimiotácticos, C5a y C5b,6,7 atraen polimorfonucleares quienes durante la fagocitosis generan y liberan al medio los metabolitos de oxígeno, y de anafilotoxinas C3a y C5a, provocando la desgranulación de células cebadas y liberación de histamina endógena que ejerce efectos sobre los endotelios de los vasos sanguíneos, aumentando su permeabilidad vascular, y sobre los músculos lisos promoviendo su contracción (45,46) esta vasodilatación se evidencia por la aplicación intravenosa del colorante azul de Evan's, el cual se extravasa, en la región de la epidermis donde se fijo el complejo inmune del paciente, reacción que se observa macroscópicamente por la presencia de una mancha azul

El paciente que no contiene CIC dará una reacción negativa, por lo que no se observa ninguna mancha de colorante en la piel del cobayo

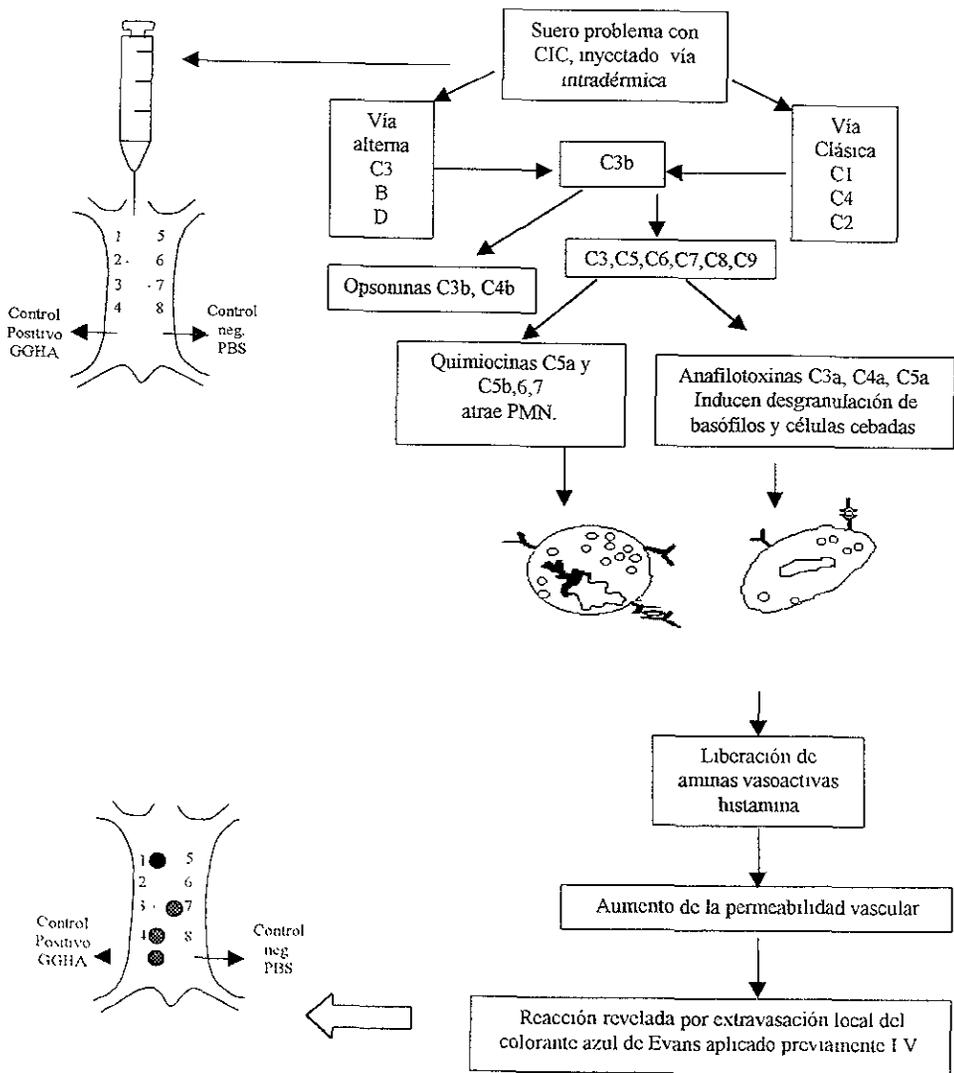


Figura 8. Representa el fundamento de la reacción de Anafilaxia Cutánea Pasiva

2.2 PROCEDIMIENTO

Se emplean cobayos albinos de 300 g aproximadamente, rasurar el abdomen e inocular con una jeringa de 1 mL, vía intradérmica, 0.1 mL de suero normal o problema, se aplican de 8 a 10 muestras, incluyendo un control positivo (GGHA en solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 8.0, con cloruro de sodio 0.15 M) y control negativo (amortiguador de fosfatos 0.2 M, con cloruro de sodio 0.15 M, pH 8.0) dejar reaccionar por 30 minutos e inocular por vía intravenosa 1 mL de colorante azul de Evan's (sol Inyectable 0.5% en solución salina estéril), dejar y después de 10 minutos, observar la reacción en la piel, en caso necesario sacrificar al animal y levantar la piel para observar mejor la reacción de Anafilaxia Cutánea Pasiva que se manifiesta por una mancha azul (Fig.9).

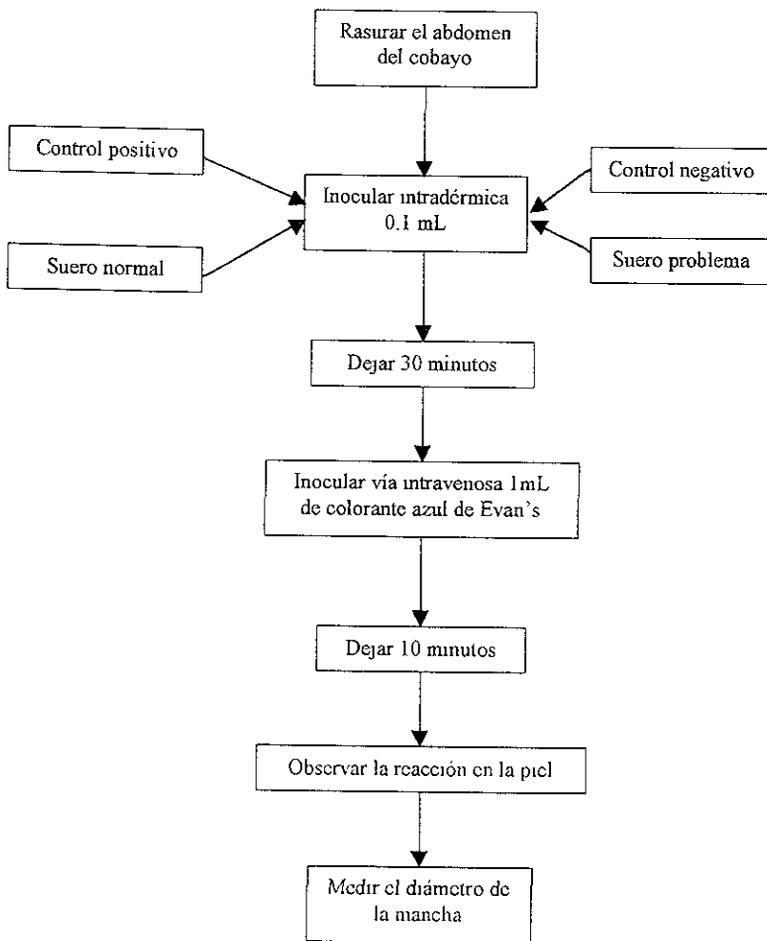


Figura 9. Diagrama de la determinación de CIC por Anafilaxia Cutánea Pasiva

3. CUANTIFICACIÓN DE COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES POR ELISA CON C1q

3.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

El C1q del complemento, adherido a las placas de inmunolón, se incuba con la muestra y si ésta, contiene CIC cuya parte inmunoglobulinica sea del tipo IgG (IgG1, IgG2, IgG3) o IgM. El C1q se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas (54). El CIC adherido a C1q se pone de manifiesto con un conjugado anti-IgG e IgM marcado con fosfatasa alcalina, este conjugado se une a las inmunoglobulinas del CI y se revela con un sustrato p-nitrofenol fosfato (incoloro), el sustrato es hidrolizado por la enzima presente formando el p-nitrofenol de color amarillo (55), la intensidad del color es leída en un lector de ELISA a 405 nm y es proporcional a la cantidad del CIC presente en la muestra (fig 10)

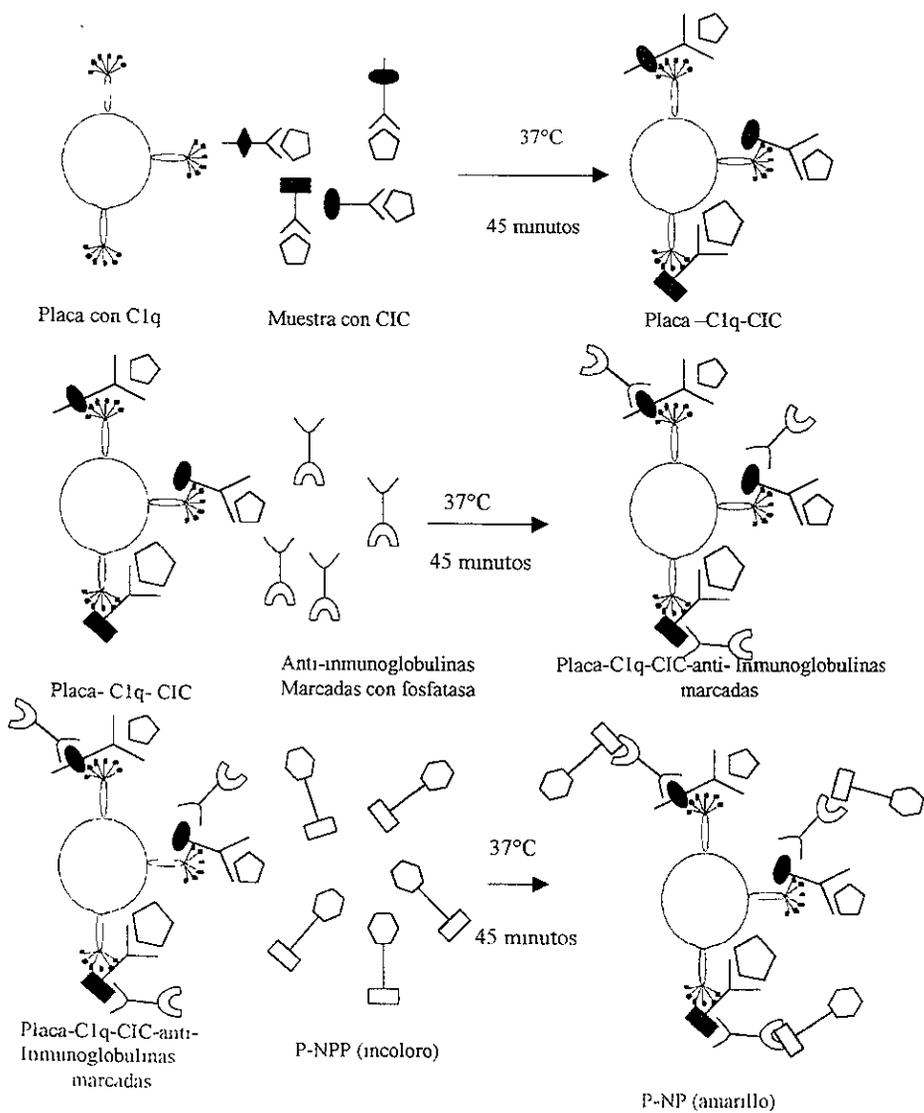


Figura 10. Muestra el principio de la determinación de CIC por ELISA con C1

3.2 PROCEDIMIENTO

3.2.1 DILUCIÓN DE LA MUESTRA

Diluir las muestras empleando 5 μL del suero problema, el suero control y la curva patrón con 200 μL del diluyente sérico, dilución final 1:41

3.2.2 REACCIÓN

Colocar 100 μL de las diversas muestras, suero control y en estudio. Reservar un pozo para cada muestra, control o patrón y agregar 100 μL del diluyente sérico para el blanco. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos, lavar tres veces con solución salina isotónica (0.9% p/v, pH 7.4) con intervalos de 5 minutos en agitación constante, eliminar y adsorber el exceso sobre papel secante.

Adicionar 100 μL del conjugado Anti-inmunoglobulinas IgG e IgM marcado con fosfatasa alcalina en amortiguador Tris (0.0025M, albúmina sérica bovina 0.2% p/v, cloruro de magnesio 0.001 M, cloruro de sodio 0.02% p/v) en cada pozo. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos, nuevamente lavar 3 veces con solución salina isotónica, con intervalos de 5 minutos con agitación constante, eliminar y adsorber sobre papel secante.

Colocar 100 μL de sustrato de p-NPP (Solución de para nitrofenol fosfato 1mg/mL). Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, parar la reacción por la adición de 100 μL de hidróxido de sodio 3M a cada pozo. Se lee la absorbancia a 405 nm contra el blanco de reactivos en un lector de ELISA (fig 11)

CURVA PATRÓN

MUESTRAS

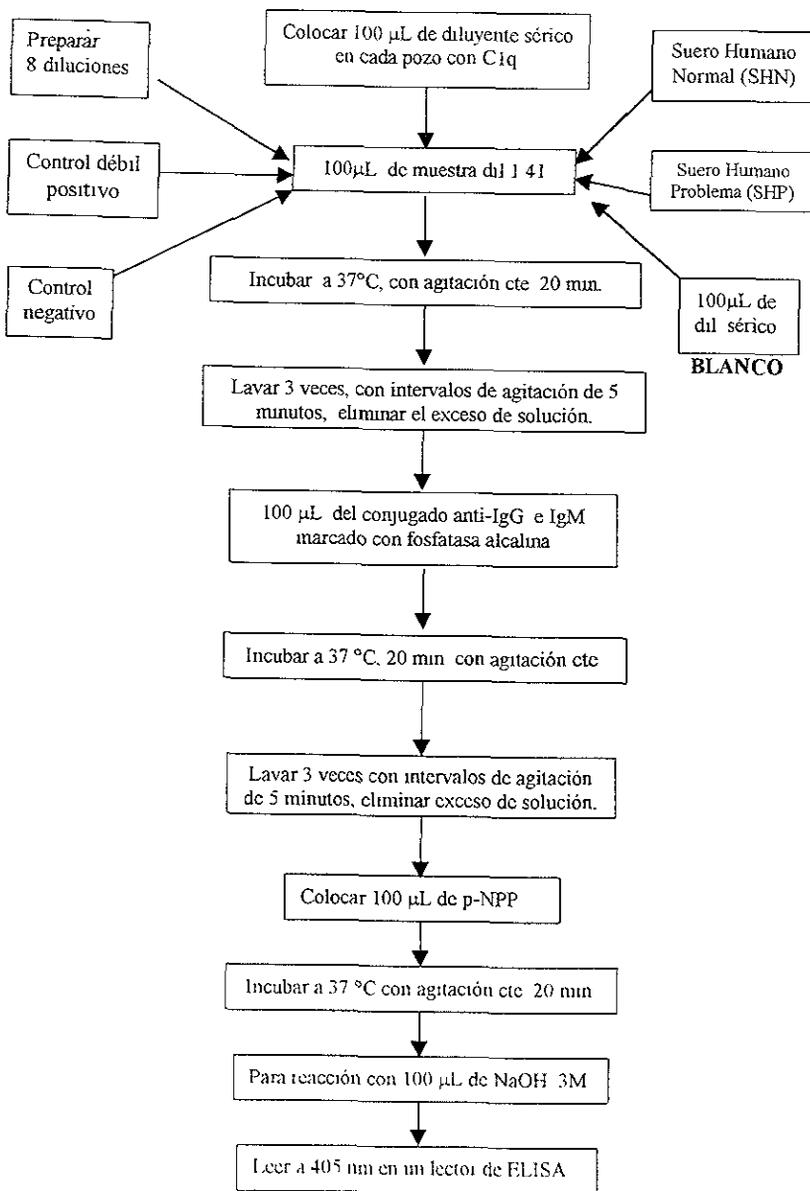


Figura 11. Diagrama de la determinación de C1q por ELISA con C1q

4. DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES POR CONSUMO DE COMPLEMENTO

4.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

Los complejos inmunes son precipitados del suero con PEG (56), éstos se ponen en contacto con el complemento humano de título conocido, el cual por medio de su unidad de reconocimiento el C1q, se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas del complejo y después de un período de 30 minutos de incubación, al complemento residual se le adiciona glóbulos rojos de carnero sensibilizados, los cuales se unen al complemento, después de otro período de incubación se presenta la lisis de los eritrocitos y la intensidad del color se lee a 530 nm y se hace el cálculo correspondiente (fig.11)

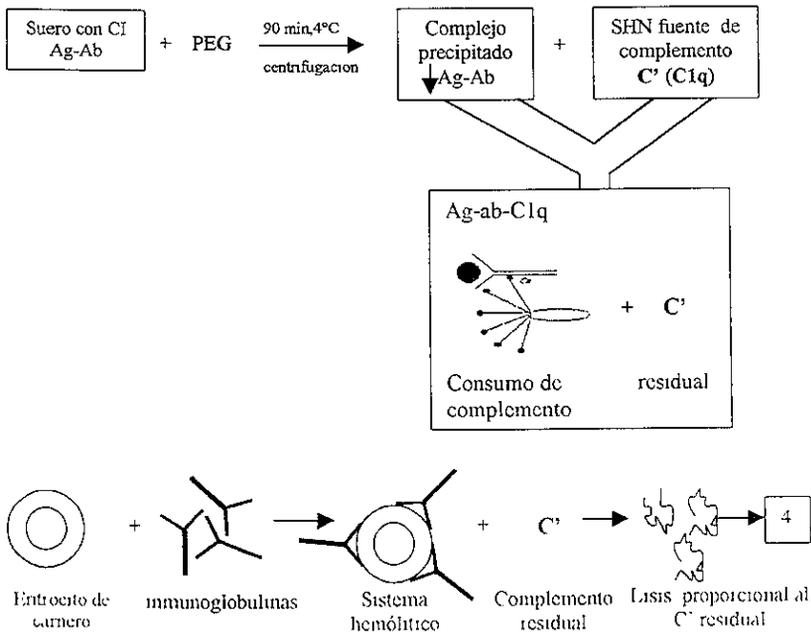


Figura 11. Fundamento de la determinación de CIC por consumo complemento

4.2 REACCIÓN DE CONSUMO DE COMPLEMENTO

A 0.2 ml de suero normal o problema se adiciona 50 μ L de amortiguador de boratos 0.1 M, pH 8.3, 50 μ L de EDTA disódica 0.2 M, pH 7.5 y 0.1 mL de PEG al 12.5 % en amortiguador de boratos, agitar y dejar 90 min a 4 °C, centrifugar a 1700 g , 10 minutos a 4 °C, descartar el sobrenadante, el precipitado se resuspende y se lava adicionando 1 mL de PEG al 2.5% p/v, nuevamente centrifugar a 1700 g por 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende en 50 μ L de amortiguador veronal gelatina pH 7.4, adicionar 20 μ L de complemento humano (mezcla de SHN) e incubar 30 min. a 37°C, colocar los tubos a 4 °C en baño de hielo y a cada muestra agregar 0.68 mL de amortiguador veronal gelatina y 0.25 mL de eritrocitos de carnero sensibilizados al 0.5%, incubar 30 minutos a 37 °C, centrifugar a 1700g por 10 min a 4° C, finalmente el sobrenadante se lee a 530 nm En forma adecuada y bajo las mismas condiciones, se prepara el blanco de 0% de hemólisis y el control 100% de hemólisis

CURVA CONTROL

Se utiliza la GGHA diluida en amortiguador de veronal gelatina pH 7.4, y se hacen 8 diluciones seriadas dobles

CONTROL NEGATIVO

Preparar un blanco con 70 μ L de amortiguador veronal gelatina pH 7.4

CONTROL 100 % DE HEMÓLISIS

Preparar con 20 μ L de suero humano normal (complemento), 50 μ L de amortiguador veronal gelatina pH 7.4 (fig 12)

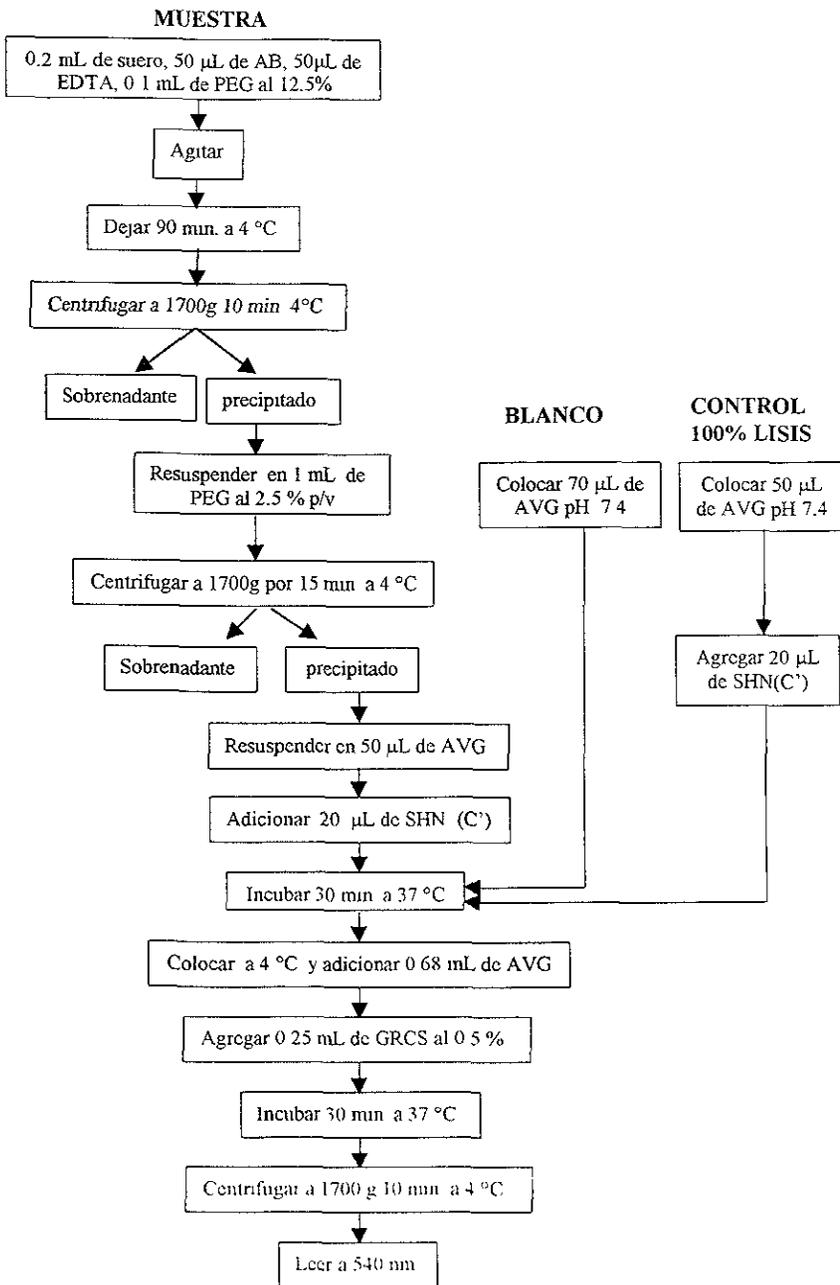


Figura 12. Determinación de CIC por consumo de complemento AB amortiguador de boratos, AVG Amortiguador veronal gelatina, C complemento

5.DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES POR LA VÍA ALTERNA DEL COMPLEMENTO

5.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

Hay complejos que activan la vía alterna del complemento, para su activación requiere de iones Mg^{++} pero no de iones Ca^{++} , por esto se le agrega EGTA(57), como agente quelante preferentemente del Ca^{++} y se agrega un exceso de Mg^{++} para asegurar que la activación del complemento sea por la vía alterna y no por la vía clásica, que requiere necesariamente del calcio para formar el complejo trimolecular ($C1q,C1r,C1s$) Se emplean eritrocitos glutationados que tienen una mayor estabilidad, y son más resistentes a la lisis inespecífica, sirven como indicadores de la fijación del complemento por vía alterna, la cual si se activa por los CI, entonces los estos eritrocitos glutationados se lisarán y la intensidad del color se lee a 541 nm

Como fuente de complemento se emplea suero humano normal Como control positivo se emplea la inulina, como inductor de la vía alterna del complemento, marcando la eficacia de la activación del complemento del suero humano normal (fig.13).

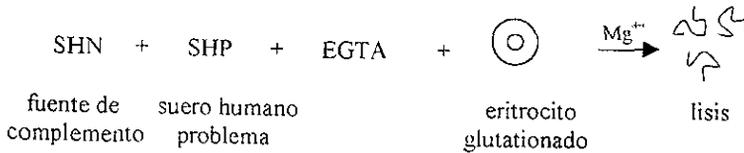


Figura 13. Activación de la vía alterna del complemento por CIC

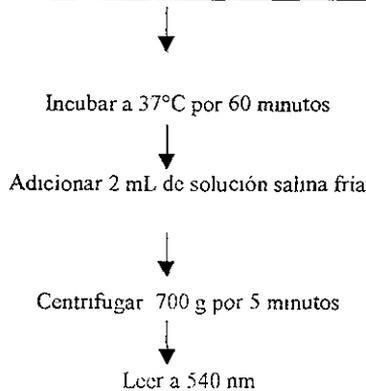
5.2 PROCEDIMIENTO

Preparación de eritrocitos glutacionados (ER-GI)

Se extraen 5 mL de sangre O, Rh positivo, con 0.2 mL de citrato de sodio 0.5 M, se lavan los eritrocitos tres veces con cloruro de sodio 0.85 % p/v, se deja en el tubo el paquete de células, se pone en un tubo de centrifuga graduado de 15 mL 0.061g de Glutati6n reducida (GSH), 0.4 mL de agua y gotas de hidr6xido de sodio 5N hasta disoluci6n total, se agita, se ajusta el pH a 9 con hidr6xido de sodio 1 N, aforar a un volumen de 1 mL con agua. Añadir 0.3 mL de eritrocitos del paquete celular previamente lavado al Glutati6n y mezclar, incubar 30 min A 37°C, lavar con soluci6n salina fría dos veces, lavar con amortiguador veronal gelatina hasta que el sobrenadante este claro y resuspender en 2 mL de amortiguador veronal gelatina. Ajustar los eritrocitos a 5×10^8 células por mL o a una absorbancia de 0.1 a 541 nm (58)

$$\frac{\text{Volumen inicial} \times \text{D.O}}{\text{D.O obtenida}} = \text{volumen requerido}$$

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
	control	control	control	control	control	paciente	control	control
	Negativo	positivo	negativo	positivo	negativo			negativo
	Inulina	Inulina	ER-GL	de lisis	SHN	SHP	vía clásica	sin C'
Inulina	50µL	50µL						
A de C'	75µL	55µL	125µL		100µL	100µL	100µL	100µL
ER-GL	100µL	100µL	100µL	100 µL	100µL	100µL	100µL	100µL
SHN		20µL			25µL	20µL	20µL	
Agua				125µL				
SHP						5µL		
GGHA							5µL	5µL



1. Blanco de control negativo de Inulina, 2. Control positivo de Inulina, 3. Blanco de amortiguador de complemento con EGTA, 4. control 100 % de hemólisis, 5. Control de SHN, 6. Suero problema, 7. Control de GGHA, 8. Blanco de GGHA sin suero
A.de C': amortiguador de complemento, ER-GL: eritrocitos glutacionados, SHN: suero humano normal, SHP: suero humano problema, GGHA: gamma globulina humana agregada

Figura 14. Determinación de CIC por la activación de la vía alterna de complemento

E.MÉTODOS ESTADÍSTICOS (60)

Los métodos estadísticos que se utilizarán para el análisis son a) métodos descriptivos como media, desviación estándar, coeficiente de variación y porcentajes de sumas positivos, b) análisis de regresión lineal, c) t de student para la comparación entre los grupos enfermo y control, d) análisis de correlación entre métodos y e) valoración clínica por medio de la sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, eficiencia

Se utilizará un paquete estadístico para realizar los análisis como el SPSS o statgraphics.

Media aritmética de un conjunto de n observaciones X_1, X_2, \dots, X_n es igual a la suma de las observaciones dividida entre n. Es una medida de tendencia central y se expresa en forma simbólica, la media muestral es:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Desviación estándar, es una medida de la variación entre los miembros de una muestra estadística, esta representada por la fórmula

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

La desviación estándar se da en las unidades físicas de las observaciones y esto representa una gran ventaja

Coeficiente de variación, es una medida de dispersión relativa, pues esta exenta de unidades y se expresa en porcentaje, se usa para comparar distribuciones con diferentes unidades o para comparar las dispersiones de dos distribuciones diferentes su fórmula es:

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} (100)$$

Análisis de regresión lineal, es útil para determinar la forma probable de la ecuación entre las variables (la ecuación que relaciona a ambas variables) cuando hay un fenómeno de causa efecto, su objetivo principal es el de predecir o estimar el valor de una variable dependiente (Y) correspondiente al valor dado de la otra variable independiente (X)

$$\hat{Y} = a + bX$$

El análisis de correlación, consiste en la medición del grado o intensidad de asociación entre dos variables sin importar cual es causa y cual es efecto. Cuando se puede demostrar que la variación de una variable está de algún modo asociada con la variación de otra, entonces se puede decir que las dos variables están correlacionadas. Una correlación puede ser positiva cuando al aumentar una variable la otra también aumenta, o negativa cuando al aumentar una variable la otra disminuye. El coeficiente de correlación de Pearson está dado por

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - n \bar{X} \bar{Y}}{\sqrt{(\sum X_i^2 - n \bar{X}^2)(\sum Y_i^2 - n \bar{Y}^2)}}$$

Es importante determinar el modelo matemático a utilizar y si se conoce que es lineal, se procede a ajustar a una recta llamada recta de regresión lineal o recta de ajuste. El método más empleado es por mínimos cuadrados, que consiste en ajustar la recta que cumpla con la condición de que la suma de los cuadrados de las desviaciones de cada valor observado Y de su correspondiente valor de predicción, sea mínima

$$\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \text{ sea mínima}$$

Distribución t-student, es la distribución de la variable aleatoria bajo la hipótesis de que v es un entero positivo llamado grados de libertad de la distribución t, X y Y son variables aleatorias independientes de las cuales X es normal con media y varianza 1, y Y tiene una distribución Ji-cuadrada con v grados de libertad

Valoración clínica de los cinco métodos para detectar CIC. (59)

Las características diagnósticas de los cinco métodos de laboratorio son definidas por su sensibilidad y especificidad diagnósticas y por su valor predictivo.

La sensibilidad diagnóstica (S_D) señala la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo padece una enfermedad en este caso ERAI.

$$S_D = \frac{PV}{PV + NF} \times 100$$

Mientras que la **especificidad diagnóstica de una prueba (E_D)** da cuenta de la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo está sano.

$$E_D = \frac{NV}{PF + NV} \times 100$$

PV Positivo verdadero = enfermos con prueba positiva

PF Positivo falso = sanos con prueba positiva

NV Negativo verdadero = sanos con prueba negativa

NF: Negativo falso = enfermos con prueba negativa

Una prueba perfecta tendría un 100% de sensibilidad y un 100 % de especificidad

El valor predictivo de los métodos utilizados para determinar CIC señala la probabilidad de que la prueba refleje con exactitud la presencia o ausencia de enfermedad **El valor predictivo positivo (VPP)** es la probabilidad de que la enfermedad este presente cuando la prueba es positiva

$$VPP = \frac{PV}{PV + PF} \times 100$$

El valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad de que este presente la enfermedad cuando el resultado es negativo

$$\text{VPN} = \frac{NV}{NF + NV} \times 100$$

La eficiencia (EF) de una prueba indica el porcentaje de pacientes que se clasifican correctamente y tienen la enfermedad de acuerdo con los resultados

$$\text{EF} = \frac{PV + NV}{PV + PF + NV + NF} \times 100$$

IX. RESULTADOS

1. NEFELOMETRÍA LÁSER CON PEG

En la tabla 1 se muestra la curva de calibración y la relación existente entre las diferentes concentraciones de GGHA, así como la GGH sin agregar y su lectura en volts, el coeficiente de correlación (r) en ambos casos fue excelente. Las rectas en la gráfica 1 muestran pendientes distintas lo que indica que "*per se*" la GGH soluble no interfiere en las lecturas producidas por el complejo de GGHA.

TABLA 1

Curva de calibración con GGHA y GGH no agregada

Concentración En $\mu\text{g/mL}$ de proteína (X)	Lectura en volts (Y)	
	GGHA (A)	GGH sin agregar (B)
1084	4.96	0.14
542	2.48	0.09
271	1.23	0.08
135	0.61	0.07
68	0.30	0.06
34	0.14	0.05
17	0.06	0.04
8	0.02	0.04

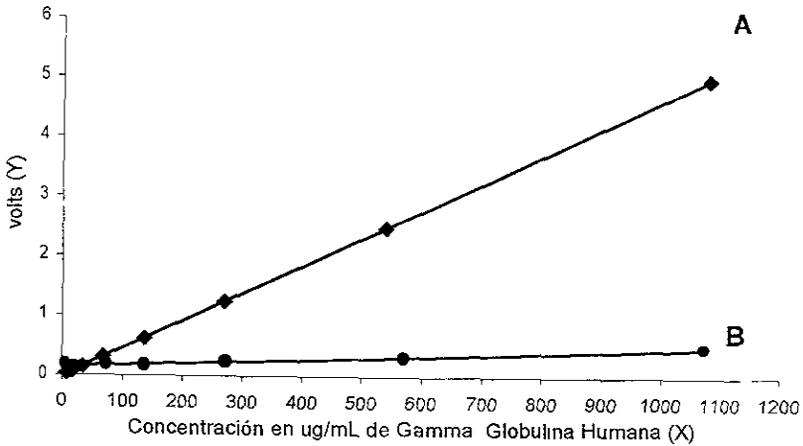
$$r = 0.991$$

$$\hat{Y} = -0.0147 + 0.459X$$

$$r = 0.931$$

$$\hat{Y} = 0.045 + 0.0186X$$

GRÁFICA 1



Gráfica 1 Relación entre las diferentes concentraciones y su lectura en volts
GGHA (A) GGH (B)

Los valores de referencia se obtuvieron del grupo de 50 donadores del banco de sangre (tabla 2), todos en condiciones muy parecidas de salud y clasificados como sanos, los sueros se delipidaron. El intervalo de corte fue $X+2S = 645 \mu\text{g/mL}$, por encima de este dato se consideran resultados positivos. Estos sueros sin delipidar mostraron lecturas más elevadas, y en general un coeficiente de variabilidad mucho mayor que en los delipidados, esto es debido a la concentración de lípidos encontrada en los sueros de los pacientes y que interfiere dando turbidez, por lo que se hace necesaria la delipidación.

TABLA 2

Sueros humanos normales delipidados y sin delipidar, la concentración del complejo esta dada en $\mu\text{g/mL}$

Suero	Delipidado	no delipidado	Suero	Delipidado	No delipidado
1	476	432	26	454	844
2	476	542	27	693	367
3	389	246	28	563	476
4	259	476	29	216	341
5	324	389	30	324	497
6	754	1126	31	606	519
7	324	411	32	389	476
8	259	606	33	281	801
9	216	495	34	411	1278
10	216	866	35	367	456
11	150	671	36	563	757
12	757	888	37	237	476
13	411	823	38	367	671
14	367	2405	39	346	454
15	324	649	40	346	476
16	519	649	41	259	432
17	389	497	42	216	454
18	389	649	43	216	324
19	302	779	44	367	563
20	259	432	45	324	367
21	251	909	46	628	757
22	367	628	47	346	432
23	281	757	48	541	584
24	346	606	49	411	584
25	432	389	50	432	757

No delipidado $\bar{X} = 631.2 \mu\text{g/mL}$ $S = 323 \mu\text{g/mL}$ $C.V = 51.17\%$ $\bar{X} + 2S = 277 \mu\text{g/mL}$

Delipidado $\bar{X} = 379 \mu\text{g/mL}$ $S = 133 \mu\text{g/mL}$ $C.V = 35\%$ $\bar{X} + 2S = 645 \mu\text{g/mL}$

Para ver el efecto del PEG-6000, la prueba se realizó con y sin PEG. En la tabla

3 y gráfica 2, se observa que el efecto del PEG es de amplificar la reacción de precipitación del complejo presente (GGHA), ya que en ausencia del mismo, el complejo por sí solo, provoca lecturas menores pero diferentes, las pendientes de las dos rectas son distintas

TABLA 3

Efecto del polietilenglicol sobre el complejo inmune

Concentración en µg/mL de GGHA (X)	Lectura en volts (Y)	
	Sistema con PEG (A)	Sistema sin PEG (B)
1084	5.14	1.45
542	2.56	0.73
271	1.27	0.45
135	0.63	0.29
68	0.31	0.20
34	0.15	0.16
17	0.06	0.14
8	0.03	0.13

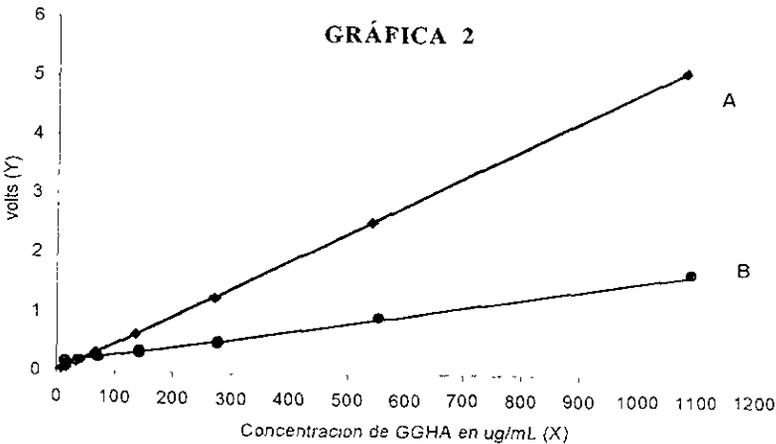
$r = 0.991$

$\hat{Y} = -0.01436 + 0.47X$

$r = 0.931$

$\hat{Y} = 0.12 + 0.122X$

Además se comprobó que en la curva de calibración con el sobrenadante



Gráfica 2 Muestra la diferencia de pendientes entre los sistemas con PEG(A) y sin PEG (B) sobre las lecturas obtenidas con las diferentes concentraciones de GGHA

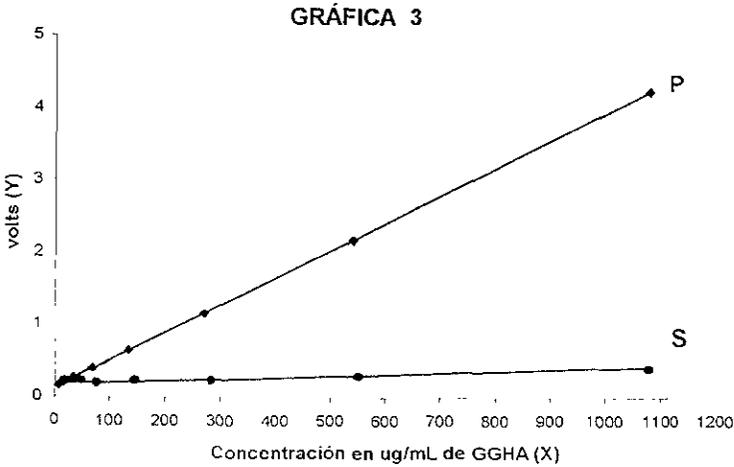
obtenido después de centrifugar la GGHA delipidada, no contiene a estos complejos proteicos (tabla 4 y gráfica 3) Esto demuestra que la delipidación y la centrifugación no afectan al complejo inmune

TABLA 4
Efecto de la delipidación y centrifugación sobre el CI (GGHA)

Concentración En µg/ml de GGHA (X)	Lectura en volts (Y)	
	Precipitado (P)	sobrenadante (S)
1084	4.24	0.23
542	2.18	0.11
271	1.15	0.06
135	0.64	0.03
68	0.38	0.02
34	0.25	0.01
17	0.18	0.00
8	0.15	0.00

$r = 0.987$
 $\hat{Y} = 0.123 + 0.38X$

$r = 0.059$
 $\hat{Y} = 0.004 + 0.02X$



Gráfica 3. Muestra como al delipidar la GGHA, el precipitado (P), contiene el CI y el sobrenadante (S) no

La tabla 6 muestra el resumen de sueros de pacientes que resultaron positivos por Nefelometría Láser

TABLA 5

Sueros de pacientes analizados por Nefelometría Láser con PEG

Padecimiento	sueros analizados	sueros positivos	% de positivos por enfermedad	% de positivos del total de 50 SHP
LES	32	22	68.7	44
AR	8	2	25.0	4
P ERAI	10	3	30.0	6
Total	50	27		54

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

AR: Artritis Reumatoide

P. ERAI: Probable Enfermedad Reumática Autoinmune

2. ANAFILAXIA CUTANEA PASIVA

La GGHA se utilizó como control positivo, la cual manifestó una mancha circular promedio de 0.8 cm de diámetro, considerada como una reacción PCA positiva y se inoculó una solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0 con cloruro de sodio 0.15 M como control negativo y no se presentó reacción. También se analizaron 50 sueros normales, los resultados están en la tabla 8, el intervalo de corte fue de 0-5.76 mm. Por encima de este dato se consideran valores positivos.

TABLA 6

Resultados de los sueros humanos normales analizados por PCA

No de suero	PCA (mm)	No. de suero	PCA(mm)
1	2	26	2
	2	27	2
3	0	28	3
4	0	29	4
5	2	30	10
6	2	31	5
7	2	32	2
8	2	33	5
9	3	34	4
10	1	35	1
11	2	36	2
12	3	37	2
13	2	38	1
14	5	39	3
15	4	40	2
16	2	41	2
17	2	42	2
18	1	43	2
19	2	44	2
20	1	45	1
21	2	46	2
22	2	47	2
23	3	48	3
24	2	49	6
25	1	50	2
\bar{X} 2.02 mm	S 1.87 mm	C V 93%	$\bar{X} \pm 2S$ 5.76 mm

Valor promedio del control positivo, 0.8 cm. n=10

Valor promedio del control negativo, 0.1 cm n=10

Los resultados de los sueros de pacientes están contenidos en la tabla 7

TABLA 7

Sueros de pacientes analizados por PCA

Padecimiento	sueros analizados	sueros positivos	% positivos por enfermedad	% de positivos del total de 50 SHP
LES	32	26	81.2	52
AR	8	6	75.0	12
P-ERAI	10	6	60.0	12
<i>Total</i>	50	38		76

LES Lupus Eritematoso Sistémico

AR Artritis Reumatoide

P-ERAI Probable Enfermedad Reumática Autoinmune

3. ELISA CON C1q

La curva de calibración se muestra en la tabla 8 y gráfica 4, en ella se aprecia una relación directa entre la concentración de GGHA y la absorbancia a 405 nm, con una correlación excelente ($r = 0.99$)

TABLA 8

Curva de calibración con GGHA para el método de ELISA con C1q

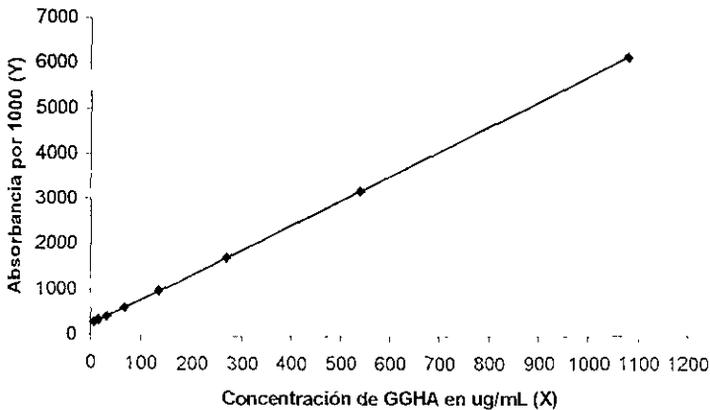
Concentración de GGHA. En $\mu\text{g/mL}$ (X)	absorbancia por 1000 (Y)
1084	6159.42
542	3200.10
271	1720.40
135	977.86
68	612.06
34	426.42
17	333.60
8	284.4

$$\hat{Y} = b + m X$$

$$\hat{Y} = 240.78 + 5.46 X$$

$$r = 0.99$$

GRÁFICA 4



Gráfica 4. Relación entre las diferentes concentraciones de GGHA y las absorbancias

Se emplearon 10 sueros control negativos, 10 sueros débil positivos y 50 sueros de personas sanas, de este grupo tenemos los siguientes resultados: $\bar{X} = 2.54$ $\mu\text{g/ml}$, $S = 4.56$ $\mu\text{g/ml}$, $\bar{X} \pm 2S$, $\bar{X} + 2S = 11.66$ $\mu\text{g/ml}$, los datos se encuentran en la tabla 9, además se presenta el resumen de la positividad de los 50 sueros de pacientes en la tabla 10

TABLA 9
Sueros normales analizados por ELISA con Clq

No. de suero	concentración	No. de suero	concentración
1	1.50	26	2.60
2	14.69	27	3.06
3	2.42	28	2.42
4	0.95	29	4.62
5	11.57	30	0.58
6	4.62	31	2.42
7	4.43	32	0.00
8	2.42	33	0.00
9	0.00	34	0.00
10	0.00	35	6.38
11	0.58	36	1.50
12	0.00	37	14.70
13	0.00	38	2.41
14	6.08	39	0.93
15	2.60	40	11.59
16	0.95	41	4.62
17	2.42	42	4.40
18	4.69	43	2.45
19	1.50	44	0.50
20	11.57	45	0.00
21	4.43	46	0.00
22	0.00	47	0.00
23	0.00	48	6.08
24	6.08	49	2.58
25	0.00	50	0.50

$\bar{X} = 2.54$ $\mu\text{g/mL}$ $S = 4.56$ $\mu\text{g/mL}$ $C.V. = 179.5\%$ $\bar{X} + 2S = 11.66$ $\mu\text{g/mL}$

TABLA 10

Sueros de pacientes analizados por ELISA con C1q

Padecimiento	sueros analizados	sueros positivos	% positivos por enfermedad	% de positivos del total de 50 SHP
LES	32	16	50	32
AR	8	3	37.5	6
P ERAI	10	3	30	6
Total	50	22		44

LES Lupus Eritematoso Sistémico

AR: Artritis Reumatoide

P. ERAI: Probable Enfermedad Reumática Autoinmune

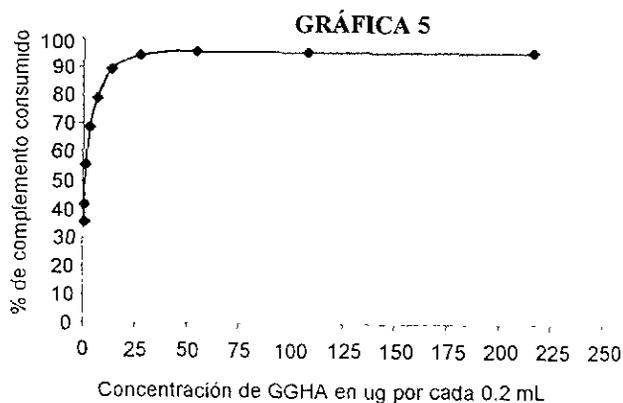
4. CONSUMO DE COMPLEMENTO

Se utilizó la GGHA como un complejo fijador de complemento vía clásica, se trabajaron 10 concentraciones diferentes, y una mezcla (pool) de sueros de personas sanas (normales) con título de complemento conocido, los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 11 Así como la curva de consumo de complemento en la gráfica 5

TABLA 11

Consumo de complemento de la GGHA utilizada como complejo inmune

Dilución	concentración de GGHA en $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$	% de complemento
1:30	216.80	96.34
1:60	108.40	96.34
1:120	54.20	96.34
1:240	27.10	94.70
1:480	13.55	89.58
1:960	6.77	79.15
1:1920	3.38	68.45
1:3840	1.69	55.00
1:7680	0.84	41.33
1:15360	0.42	35.50



Gráfica 5. Muestra el consumo de complemento por la GGHA

Los valores obtenidos en el grupo de sujetos sanos son, $\bar{X} = 8.2 \%$, $S=4.85 \%$, el limite superior considerado la percentil 95.45%, fue $\bar{X} + 2S=17.9 \%$, los valores están en la tabla 12 y los resultados de los 50 pacientes analizados en la tabla 13

TABLA 12

Sueros de personas sanas analizadas por consumo de complemento

No. de suero	% de complemento consumido	No. de suero	% de complemento consumido
1	9.1	26	15.3
2	2.0	27	8.4
3	2.0	28	14.0
4	12.0	29	10.3
5	12.5	30	14.0
6	9.7	31	7.9
7	9.8	32	6.0
8	6.5	33	9.5
9	2.6	34	10.1
10	2.1	35	8.3
11	7.8	36	1.3
12	12.7	37	2.0
13	1.5	38	9.7
14	9.5	39	14.2
15	6.5	40	10.0
16	15.2	41	1.8
17	7.0	42	1.0
18	13.0	43	10.2
19	4.0	44	16.1
20	2.1	45	1.0
21	9.4	46	9.0
22	10.5	47	14.1
23	0.0	48	11.8
24	14.1	49	16.0
25	8.1	50	6.5

$\bar{X} = 8.2 \%$

$S = 4.85 \%$

$C.V. = 59.1 \%$

$\bar{X} + 2S = 17.9 \%$

TABLA 13

Sueros de pacientes analizados por consumo de complemento

Padecimiento	sueros analizados	sueros positivos	% positivos por enfermedad	% de positivos del total de 50 SHP
LES	32	22	68.7	44
AR	8	3	50.0	6
P. ERAI	10	4	40.0	8
Total	50	29		58

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

AR: Artritis Reumatoide

P. ERAI: Probable Enfermedad Reumática Autoinmune

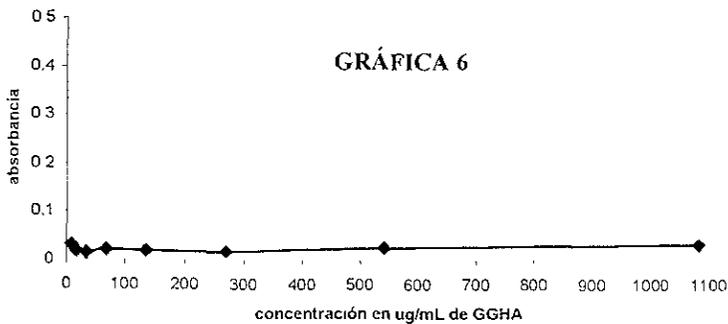
5. VIA ALTERNA DE COMPLEMENTO

Se utilizó la Inulina como activador de la vía alterna del complemento y mostró un promedio de activación de 53.46%. Se probó la GGHA y el resultado fue negativo, los resultados se observan en la tabla 14 y se ve como la GGHA en presencia de suero humano normal da un ligero aumento en las absorbancias, pero no activa la vía alterna del complemento

TABLA 14

Datos que demuestran que la GGHA no activan la vía alterna del complemento

Concentración de en $\mu\text{g/mL}$	absorbancia Con SHN	absorbancia sin SHN	% de activación vía alterna
1084	0.135	0.032	0
542	0.129	0.025	0
271	0.120	0.017	0
135	0.118	0.019	0
68	0.098	0.021	0
34	0.100	0.015	0
17	0.120	0.018	0
8.5	0.116	0.030	0



Gráfica 6. Muestra la falta de activación de la vía alterna del complemento por la GGHA

TABLA 15

Sueros humanos normales analizados por activación de la vía alterna del complemento

No. de suero	% de activación	No. de suero	% de activación
1	0.20	26	0.00
2	0.71	27	1.40
3	0.10	28	0.10
4	0.50	29	1.50
5	0.70	30	0.00
6	0.10	31	1.70
7	0.60	32	0.10
8	0.50	33	1.80
9	0.20	34	0.20
10	2.90	35	2.00
11	2.80	36	0.00
12	2.90	37	0.30
13	0.00	38	2.45
14	0.40	39	0.30
15	0.00	40	2.30
16	0.00	41	0.00
17	0.50	42	2.58
18	0.90	43	0.10
19	0.00	44	0.00
20	0.98	45	2.86
21	0.00	46	2.40
22	0.20	47	2.70
23	0.98	48	0.10
24	0.10	49	0.00
25	1.20	50	0.40

$\bar{X} = 0.86\%$

$S = 0.905\%$

$CV = 105\%$

$\bar{X} + 2S = 2.671\%$

TABLA 16

Sueros de pacientes analizados por activación de la vía alterna de complemento

Padecimiento	sueros analizados	sueros positivos	% positivos por enfermedad	% de positivos del total de 50 SHP
LES	32	14	43.7	28
AR	8	5	62.5	10
P.ERAI	10	3	30.0	6
Total	50	22		44

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

AR: Artritis Reumatoide

P. ERAI: Probable Enfermedad Reumática Autoinmune

6. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

La tabla 17 muestra los resultados obtenidos por los cinco métodos en los SHN y sus valores de corte normal, que servirán de parámetro para evaluar la anormalidad de los SHP, tabla 18

TABLA 17

Resultados de los SHN obtenidos por los cinco métodos

No. Suero	Nefelometría ug/mL	PCA mm	ELISA ug/mL	Consumo de Complemento %	Vía alterna %	No. Suero	Nefelometría ug/mL	PCA Mm	ELISA ug/mL	Consumo de Complemento %	Vía alterna %
1	476.0	2	1.50	9.10	0.20	26	454.0	2	2.60	15.30	0.00
2	476.0	2	14.69	2.00	0.71	27	693.0	10	3.06	8.40	1.40
3	389.0	0	2.42	2.00	0.10	28	563.0	3	2.42	14.00	0.10
4	259.0	0	0.95	12.00	0.50	29	216.0	4	4.62	10.30	1.50
5	324.0	2	11.57	12.50	0.70	30	324.0	10	0.58	14.00	0.00
6	754.0	2	4.62	9.70	0.10	31	606.0	5	2.42	7.90	1.70
7	324.0	2	4.43	9.80	0.60	32	389.0	2	0.00	6.00	0.10
8	259.0	2	2.42	6.50	0.50	33	281.0	5	0.00	9.50	1.80
9	216.0	3	0.00	2.60	0.20	34	411.0	4	0.00	10.10	0.20
10	216.0	1	0.00	2.10	2.90	35	367.0	1	6.38	8.30	2.00
11	150.0	2	0.58	7.80	2.80	36	563.0	6	1.50	1.30	0.00
12	757.0	3	0.00	12.70	2.90	37	237.0	2	14.70	2.00	0.30
13	411.0	8	0.00	1.50	0.00	38	367.0	1	2.41	9.70	2.45
14	367.0	5	6.08	9.50	0.40	39	346.0	3	0.93	14.20	0.30
15	324.0	4	2.60	6.50	0.00	40	346.0	6	11.59	10.00	2.30
16	519.0	2	0.95	15.20	0.00	41	259.0	4	4.62	1.80	0.00
17	389.0	2	2.42	7.00	0.50	42	216.0	3	4.40	1.00	2.58
18	389.0	1	4.69	13.00	0.90	43	216.0	7	2.45	10.20	0.10
19	302.0	8	1.50	4.00	0.00	44	367.0	2	0.50	16.10	0.00
20	259.0	1	11.57	2.10	0.98	45	324.0	1	0.00	1.00	2.86
21	251.0	9	4.43	9.40	0.00	46	628.0	10	0.00	9.00	2.40
22	367.0	2	0.00	10.50	0.20	47	346.0	2	0.00	14.10	2.70
23	281.0	3	0.00	0.00	0.98	48	541.0	9	6.08	11.80	0.10
24	346.0	10	6.08	14.10	0.10	49	411.0	2	2.58	16.00	0.00
25	432.0	1	0.00	8.10	1.20	50	432.0	4	0.50	6.50	0.40

RESÚMENES ESTADÍSTICOS: VALORES NORMALES. ESTUDIO DE CORTE

Estadísticos	Nefelometría	PCA	ELISA	Consumo de	Vía alterna
Muestrales	Ug/mL	mm	ug/mL	Complemento %	%
\bar{X}	379 ug/mL	2mm	2.54ug/mL	8.20%	0.86%
S	133 ug/mL	1.87mm	4.56ug/mL	4.85%	0.91%
Valores Normales ($\bar{X} \pm 2S$)	113-645 ug/mL	0-5.76 mm	0-11.66ug/mL	0-17.90%	0-2.67%

TABLA 18

Resultados de los SHP obtenidos por los cinco métodos

No.	Padeci miento	Nefelo metría ug/mL	PCA mm	ELISA ug/mL	Cons. de C' %	Vía de alterna %	No.	Padeci miento	Nefelo metría ug/mL	PCA Mm	ELISA ug/mL	Cons de C' %	Vía de alterna %
1	LES	1039+	20+	40.51+	91.30+	5.16+	129	LES	1126+	10+	1.13-	45.92+	16.63+
4	LES	736+	21+	2.15-	28.30+	8.50+	130	LES	497+	5-	18.53+	32.50+	7.75+
6	LES	736+	12+	14.32+	65.20+	3.02+	133	LES	563-	13+	0.00-	19.30+	0.00-
7	LES	757+	13+	15.05+	29.71+	0.00-	137	LES	324-	10+	0.00-	1.90-	16.37+
9	LES	930+	16+	13.58+	23.03+	17.39+	138	LES	866+	6+	4.24-	63.48+	0.00-
11	LES	1169+	15+	6.26-	79.71+	3.01+	156	LES	649+	2-	26.59+	28.40+	0.00-
14	LES	1321+	15+	55.89+	2.32-	0.00-	157	LES	476-	10+	11.94+	69.43+	0.00-
15	LES	974+	15+	76.40+	10.50-	0.00-	2	AR	476-	8+	26.60+	50.30+	0.00-
18	LES	757+	10+	0.00-	56.64+	0.00-	25	AR	450-	3-	8.57-	13.10-	1.80-
19	LES	1082+	3-	15.05+	0.00-	0.00-	31	AR	658+	8+	8.64-	8.40-	12.80+
20	LES	932+	12+	15.70+	22.01+	1.80-	80	AR	470-	4+	5.82-	5.60-	11.20+
24	LES	1184+	7+	6.81-	2.98-	1.90-	128	AR	563-	6+	186.0+	40.88+	0.00-
26	LES	957+	1-	4.80-	11.20-	0.00-	143	AR	367-	10+	0.00-	20.30+	13.98+
28	LES	671+	10+	2.05-	48.95+	1.14-	144	AR	649+	10+	0.00-	9.40-	16.82+
29	LES	432-	7+	76.80+	29.50+	4.90+	154	AR	324-	7+	17.61+	1.98-	4.53+
72	LES	497-	25+	11.75+	46.85+	12.27+	131	P.ERAI	216-	10+	0.59-	12.39-	20.40+
73	LES	606-	15+	0.00	82.93+	10.96+	132	P.ERAI	324-	10+	0.00-	13.33-	0.00-
74	LES	4074+	23+	18.50+	4.53-	0.00-	134	P.ERAI	866+	2-	0.00-	11.33-	0.23-
77	LES	476-	2-	4.24-	2.10-	15.20+	136	P.ERAI	671+	8+	15.05+	2.86-	15.02+
79	LES	670+	15+	50.40+	22.18+	0.00-	139	P.ERAI	432-	3-	6.08-	12.24+	0.00-
83	LES	714+	2-	5.89-	44.05+	0.72-	140	P.ERAI	519-	2-	2.60-	22.18+	0.00-
84	LES	2058+	2-	0.00-	10.84-	0.00-	141	P.ERAI	693+	8+	18.46+	22.01+	0.00-
85	LES	324-	8+	0.00-	9.80-	15.30+	142	P.ERAI	213-	1-	14.13+	15.39+	0.00-
87	LES	714+	15+	8.64-	26.54+	8.50+	153	P.ERAI	367-	15+	0.00-	2.09-	19.09+
127	LES	184-	10+	17.02+	19.30+	0.00-	155	P.ERAI	281-	8+	0.00-	32.60+	1.71-

P.ERAI= probable enfermedad reumática autoinmune. + = Resultado positivo, - = Resultado negativo

Otros estudios realizados a los sueros de los pacientes, relacionados con la positividad o negatividad se observa en la tabla 19

TABLA 19
Características de los sueros problema

No	Suero	Latex	WR	CH50	C3	C4	AAN	a-DNA	nef	PCA	ELISA	Con C'	via alt
1	LES			63	52	11	N	N	P	P	P	P	P
4	LES			10	89	4	162	2180	P	P	N	P	P
6	LES			60	87	18	39	250	P	P	P	P	P
7	LES			70	40	70	670	1657	P	P	P	P	N
9	LES			10	89	4	162	2180	P	P	P	P	P
11	LES			38	28	4	256	N	P	P	N	P	P
14	LES			79	154	60	31	162	P	P	P	N	N
15	LES			70	53	10	256	16	P	P	P	N	N
18	LES	N	10	80	11	5			P	P	N	P	N
19	LES	N	20	72	30	14			P	N	P	N	N
20	LES			79	68	58	N		P	P	P	P	N
24	LES			66	59	23		N	P	P	N	N	N
26	LES			50	65	9	256	256	P	N	N	N	N
28	LES			73	98	9			P	P	N	P	N
29	LES			95	83	8	64	64	N	P	P	P	P
72	LES			95	83	8	64	64	N	P	P	P	P
73	LES			98	96	18		1258	N	P	N	P	P
74	LES			86	47	18			P	P	P	P	N
77	LES			158	67	8	256	N	N	N	N	N	P
79	LES			62	36	4	16	16	P	P	P	P	N
83	LES			100	60	69	256	16	P	N	N	P	N
84	LES			60	23	6	64	N	P	N	N	N	N
85	LES			50	14	5	1190	243	N	P	N	N	P
87	LES			60	57	6	16	16	P	P	N	P	P
127	LES						N	N	N	P	P	P	N
129	LES			72	96	60	N	N	N	P	N	P	P
130	LES			100	139	30	N	N	N	N	N	P	P
133	LES				201	27		N	N	P	N	P	N
137	LES			79	180	46	N	N	N	P	N	N	P
138	LES			79	103	64	N	N	N	P	N	P	P
156	LES			84	134	69	N		P	N	P	P	N
157	LES	N	10	62	47	9			N	P	P	P	N
2	AR	P	160				N	N	N	P	P	P	N
25	AR	N	N	80	69	25	N	N	N	N	N	P	N
31	AR	P	10240				N	N	P	P	N	N	P
80	AR	P	10240	72	67	23	N	256	N	N	N	N	P
128	AR	P	10240	7	167	60	16	N	N	P	P	P	N
143	AR	N	20	70	100	60			N	P	N	P	P
144	AR			125	116	66	N		P	P	N	N	P
154	AR	N	10	85	148	42	N	N	N	P	P	N	P
131	P ERAI			98	80	40			N	P	N	N	P
132	P ERAI			99	73	35			N	P	N	N	P
134	P ERAI			110	122	35			N	P	N	N	N
136	P ERAI						N		P	P	P	N	P
139	P ERAI			95	100	40			N	N	N	P	N
140	P ERAI			85	89	27			N	N	N	P	N
141	P ERAI			100	70	25			P	P	P	P	N
142	P ERAI	P	20	115	77	40			N	N	N	P	N
153	P ERAI			79	20	12		N	N	P	N	N	P
155	P ERAI			70	98	62		N	N	P	N	P	N

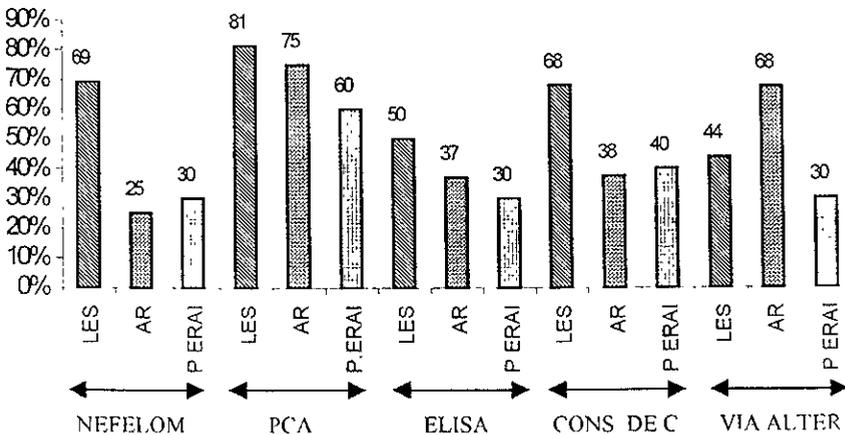
W.R = Waller Rose, P = positivo, N = negativo, CH50 = Complemento hemolítico al 50%,
 C3 = componente C3 del complemento, C4 = componente C4 del complemento, AAN = anticuerpos
 antinucleares, a-DNA = anticuerpos anti-DNA,
 Valores Normales Latex = neg, WR = <80, CH50 = 95-150 U/mL, C3 = 47-131 mg/dL, C4=20-50
 Mg/dL, AAN = <1 64, a-DNA = neg

TABLA 20

Resumen de resultados de los pacientes reportados en porciento de positivos por padecimiento y relacionado con el el porciento global de positivos obtenido por cada método

PADEC	SUEROS ANAL	NEFELOM	PCA	ELISA	CONS DE COMP	VÍA ALTERNA DE COM
LES	32	22	26	16	22	14
	100%	69%	81.25	50%	68.75%	43.70%
AR	8	2	6	3	3	5
	100%	25%	75%	37.5%	37.5%	67.5%
P.ERAI	10	3	6	3	4	3
	100%	30%	60%	30%	40%	30%
TOTAL	50	27	38	22	29	22
GLOBAL	100%	54%	76%	44%	58%	44%

GRÁFICA 7



Gráfica 7. En la gráfica se observa como la mejor prueba para detectar CIC en las enfermedades estudiadas es el PCA

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS V 9 0 y los resultados se presentan en el siguiente cuadro

CUADRO 1

Método	Grupo	N	Media	Desviación Estándar	T calculada	P
Nefelometría	E	50	719.26 µg/mL	596.15	4.032	0.000
	S	50	367.40 µg/mL	159.21		
PCA	E	50	9.48 mm	5.832	8.221	0.000
	S	50	2.44mm	1.631		
ELISA	E	50	16.69µg/mL	30.317	3.13	0.003
	S	50	3.157µg/mL	3.815		
Consumo de complemento.	E	50	26.555 %	23.473	5.37	0.000
	S	50	8.364%	4.685		
Vía alterna de Complemento	E	50	5.362%	6.743	4.67	0.000
	S	50	.855%	.996		

Al comparar los resultados estadísticos para cada uno de los métodos se observa un comportamiento similar para todos, una mayor variabilidad del grupo enfermo que el sano y los promedios de ambos grupos son significativamente diferentes ya que las significancias de las comparaciones son todas inferiores a 0.05

CUADRO 2

Grupo control, individuos sanos

		Nefelometría	PCA	ELISA	Consumo de complemento	Vía alterna
Nefelometría	Correlación de Pearson	1 000	099	- 095	192	-013
	sig (2 colas) N	50	50	50	50	50
PCA	Correlación de Pearson	099	1 000	-.121	292	-.171
	sig.(2 colas) N	50	50	50	50	50
ELISA	Correlación de Pearson	- 095	-.121	1 000	- 126	- 063
	sig.(2 colas) N	50	50	50	50	50
Consumo de complemento	Correlación de Pearson	.192	292	-126	1 000	-.131
	sig (2 colas) N	50	50	50	50	50
Vía alterna	Correlación de Pearson	- 013	- 171	- 063	- 131	1 000
	sig (2 colas) N	50	50	50	50	50

Interpretación: Para los controles (individuos sanos) sólo existe correlación ($p = 0.039, < 0.05$) entre las pruebas PCA y Consumo de complemento y existe relación inversa entre Nefelometría y ELISA, entre Nefelometría y Vía alterna, entre PCA y ELISA, entre PCA y Vía alterna, entre Consumo de Complemento y ELISA, Vía Alterna y ELISA, entre Consumo de complemento y Vía alterna. Con lo cual se ve que Vía alterna tiene una relación inversa con todas las demás, ELISA tiene relación inversa con todas las pruebas.

CUADRO 3
Pacientes con LES

		Nefelometría	PCA	ELISA	Consumo de complemento	Vía alterna
Nefelometría	Correlación De Pearson	1.000	.304	.031	-.130	- 221
	sig (2 colas) N	32	.091 32	.867 32	.479 32	224 32
PCA	Correlación De Pearson	.031	1.000	.176	.251	.167
	sig (2 colas) N	.091 32	32	.334 32	.166 32	.360 32
ELISA	Correlación De Pearson	.031	.176	1.000	-.126	-.269
	sig (2 colas) N	.867 32	.334 32	32	.494 32	137 32
Consumo de complemento	Correlación De Pearson	- 130	251	-.126	1.000	- 018
	sig (2 colas) N	.479 32	.166 32	.494 32	32	924 32
Vía alterna	Correlación De Pearson	-.221	.167	-.269	-.018	1 000
	sig (2 colas) N	.224 32	360 32	.137 32	924 32	32

Interpretación: Se observa que para individuos con LES la prueba de Vía alterna tiene relación inversa con todas las demás pruebas, excepto con PCA, al igual que Consumo de Complemento que tiene una relación inversa con todas excepto con PCA

CUADRO 4
Pacientes con AR

		Nefelometria	PCA	ELISA	Consumo de complemento	Vía alterna
Nefelometria	Correlación de Pearson	1.000	187	188	.069	306
	sig.(2 colas) N	8	657 8	655 8	871 8	461 8
PCA	Correlación de Pearson	.187	1.000	-179	.119	.527
	sig.(2 colas) N	.657 8	8	.671 8	.778 8	179 8
ELISA	Correlación de Pearson	.188	-.179	1.000	.573	-.554
	sig.(2 colas) N	.655 8	671 8	8	.138 8	154 8
Consumo de complemento	Correlación de Pearson	.069	.119	573	1.000	-.598
	sig.(2 colas) N	.871 8	778 8	.138 8	8	118 8
Vía alterna	Correlación de Pearson	.306	.527	-.554	-.598	1.000
	sig.(2 colas) N	.461 8	.179 8	.154 8	118 8	8

Interpretación: Se puede observar que no existe correlación entre ninguna de las pruebas. Sin embargo, se observa una relación inversa entre PCA y ELISA entre Consumo de Complemento y Vía alterna y entre ELISA y Vía alterna es decir, al aumentar los niveles de una los de la otra disminuye.

CUADRO 5

Pacientes con Probable enfermedad reumática autoinmune (P. ERAI)

		Nefelometría	PCA	ELISA	Consumo de complemento	Vía alterna
Nefelometría	Correlación	1.000	- 258	266	- .169	- .210
	De Pearson		472	.458	.641	.560
	Sig.(2 colas) N	10	10	10	10	10
PCA	Correlación	- .258	1 000	- .232	- .303	.687
	De Pearson	.472		.520	.394	.028
	Sig.(2 colas) N	10	10	10	10	10
ELISA	Correlación	.266	- .232	1.000	- .045	- .143
	De Pearson	.458	.520		.902	.693
	Sig.(2 colas) N	10	10	10	10	10
Consumo de complemento	Correlación	- .169	- .303	- .045	1.000	- .599
	De Pearson	.641	.394	.902		.067
	Sig.(2 colas) N	10	10	10	10	10
Vía alterna	Correlación	- .210	.687	- .143	- .599	1 000
	De Pearson	.560	.028	.693	.067	
	Sig.(2 colas) N	10	10	10	10	10

Interpretación: Se observa que Nefelometría tiene relación inversa con todas las pruebas excepto ELISA, PCA tiene relación inversa con todas excepto con Vía alterna ELISA tiene relación inversa con todas las pruebas excepto con Nefelometría y Consumo de complemento tiene relación inversa con todas y Vía alterna tiene relación inversa excepto con PCA

En el cuadro 6 se observa la única correlación entre el PCA y el Consumo de Complemento, esto ocurre en la población sana, pero no en la población enferma, como era de esperarse debido a la gran heterogeneidad de los CIC existentes También se observan relaciones inversas entre los métodos (valores negativos), esto significa que cada método esta cuantificando CIC diferentes y que no son del mismo tipo, pero cuantificables por los diferentes métodos

XI. VALORACIÓN CLÍNICA DE LOS CINCO MÉTODOS EMPLEADOS PARA DETECTAR CIC

En la tabla 21 se resume los valores obtenidos de la valoración clínica de los métodos, encontrando que el PCA es la prueba más sensible, es la que detecta menos falsos negativos, el Consumo de Complemento es la prueba con mayor especificidad diagnóstica, porque identifica al sano al 100%, pero su sensibilidad diagnóstica es del 56% lo cual significa, que no esta detectando a todos los enfermos en esta población, debido a que es una población heterogénea y no tiene por lo tanto la suficiente sensibilidad, en esta prueba el valor predictivo positivo también es del 100 % y significa que no hay falsos positivos o sanos con prueba positiva.

La mejor prueba para detectar a los sanos es el consumo de complemento y a los enfermos es el PCA.

El PCA tiene un 79% de valor predictivo negativo, que significa que detecta a los enfermos, porque cuantifica menos falsos negativos, y por lo tanto identifica a un mayor número de pacientes

La Eficiencia de la prueba marca al PCA, como a la mejor, porque cuantifica a los pacientes con la enfermedad

TABLA 21

Valores en porcentaje de la valoración clínica de cada método

	Nefelometria	P C A	ELISA	Cons de C'	Via alterna
S _D	56 %	76 %	44 %	56 %	44 %
E _D	94 %	90 %	96 %	100 %	92 %
VPP	90 %	88 %	91 %	100 %	84 %
VPN	68 %	79 %	63 %	69 %	62 %
EF	75 %	83 %	70 %	78 %	68 %

XII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el propósito de detectar la mayor cantidad de Complejos Inmunes Circulantes en pacientes con enfermedades reumáticas autoinmunes, se eligieron métodos con fundamentos diferentes que fueran complementarios, sencillos y de bajo costo, ya que no existe ningún método que sea capaz de cuantificar en su totalidad los diferentes tipos de CIC en los diversos padecimientos

El estudio realizado respondió al objetivo general, cuantificando el 98% de los CIC empleando los cinco métodos seleccionados.

Los métodos distinguen los controles sanos y los pacientes, ya que en todos existe una diferencia significativa entre las medias de los dos grupos porque la probabilidad es menor que 0.05.

El PCA fue el mejor método para detectar CIC, 76% en forma global, y por padecimiento, LES 81.25%, AR 75%, P.ERAI 60% (tabla 20 y fig 7). La positividad encontrada es más alta que la reportada en la literatura (13,61), excepto una variante de precipitación con PEG, que reporta el 86% de positividad en pacientes con AR (17).

Una revisión general de la positividad a los CIC en otros padecimientos y la aplicación de otros métodos diferentes a los aquí estudiados, indica que no es alta, sino semejante a la encontrada en este estudio, algunos ejemplos son los resultados obtenidos en el síndrome de Sjögren, la pancreatitis crónica idiopática, cáncer (13, 41%, 67%) y hepatitis (63%), la variabilidad también esta en función del método aplicado por ejemplo, el Radioinmunoensayo con células Raji que tiene una positividad del 57%, inhibición de la aglutinación (59%), precipitación con PEG (47%) así como la combinación de los últimos dos métodos dio 73% de positivos (13) En la mayoría de los estudios la positividad es baja sin importar padecimiento o método empleado, no hay una cuantificación aproximada al 100% Estas diferencias en positividad se deben probablemente a que no se está empleando el método apropiado, para la etapa

en que el CI este circulante y al tipo de padecimiento en estudio

En estudios realizados donde se comparan diferentes métodos (6,31) los análisis de correlación estadística, muestran coeficientes de correlación bajos e incluso valores negativos, indicando que los métodos dan resultados opuestos con el mismo suero. Esto también sucede en el presente estudio, aunque el objetivo no es comparar los métodos, sino ver si se complementan para cuantificar el 100% de los CIC, corroboramos que los coeficientes de correlación son bajos o hay ausencia de la misma, lo que nos confirma que, cada método está detectando complejos inmunes diferentes, lo que apoya la propuesta de que para cuantificar los CI es preciso la aplicación de diferentes métodos debido a la heterogeneidad fisicoquímica y funcional de los complejos, diferencia de tamaño, isotipo, carga, naturaleza del antígeno, la proporción Ag-Ab, y la capacidad para enlazar complemento

Solamente se encontró una correlación en el grupo control (cuadro 2) entre el PCA y el Consumo de complemento, pero no, en los diferentes grupos de pacientes, esto quizás explique la existencia de cierta homogeneidad en los complejos inmunes de personas sanas y una mayor heterogeneidad en los pacientes. Los cinco métodos empleados detectan CIC de diferentes clase esto es corroborado por las relaciones inversas encontradas

En los cuadros 3,4,5 se resume el estudio de correlación de Pearson por cada grupo de estudio LES, AR, P ERAI, nuevamente no se encuentra ninguna correlación, los datos negativos indican que cuando una variable crece la otra disminuye, la significancia α es grande. Estas relaciones inversas y la falta de correlación confirman la búsqueda de la complementariedad entre los métodos

El bajo grado de correlación entre los métodos, la baja frecuencia de positividad en pacientes con CIC (13,61) y también el comportamiento errático por la diferencia en el estado o fase de la enfermedad, la clase de padecimiento, y de los niveles de CIC, es donde radica la dificultad para elegir y aplicar un método o un conjunto de métodos

Para el medico es indispensable conocer que importancia debe dar al resultado

de cada examen de laboratorio, misma que varía en función de la calidad, con esta finalidad se realizó la valoración clínica de los cinco métodos (tabla 21), de la cual se desprende que el método con mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica es el PCA con 76% y 90% respectivamente, el PCA clasifica correctamente los pacientes que tienen la enfermedad y los clasifica mejor que los cuatro métodos restantes, es la prueba que detecta menos falsos negativos. Sin embargo, el Consumo de Complemento tiene sensibilidad y especificidad diagnóstica de 56% y 100% respectivamente esto indica que el método clasifica perfectamente al sano pero no así al enfermo.

Para que una prueba sea perfecta debe tener 100% de sensibilidad y 100% de especificidad diagnóstica (59) desafortunadamente esta prueba esta muy lejos de existir y en este caso los cinco métodos que se valoraron, no tienen la sensibilidad del 100%, la prueba que más se acercó, fue el PCA con un 76% seguida de nefelometría Láser con PEG con 56%, Consumo de Complemento con un 56%, ELISA y Vía Alterna de Complemento con un 44% (tabla 21).

En especificidad, el Consumo de Complemento es la prueba que mejor da cuenta de la probabilidad de obtener un resultado negativo, cuando el individuo está sano, con un 100%, seguida de la ELISA con 96%, Nefelometría-Láser con PEG 94% y vía alterna 92 % y PCA con un 90 % esto significa que todas las pruebas son específicas

El Consumo de Complemento tuvo el mayor valor predictivo positivo (enfermos con prueba positiva), con 100% Por otra parte la prueba con mayor valor predictivo negativo (enfermos con prueba negativa) fue el PCA con un 79% Por lo tanto la mejor prueba para clasificar al enfermo fue el PCA y para clasificar mejor al sano fue el Consumo de Complemento

En la tabla 20 se observa que el PCA, detecta mayor cantidad de positivos en la población de enfermos con un 76%, seguido de Consumo de Complemento (58%) y Nefelometría (54%) y por padecimiento el PCA dio mayor positividad, LES (81 25%), AR (75%), P ERAI (60 %)

Los resultados obtenidos conducen a la observación de que en un mismo

padecimiento se están detectando diversos tipos de complejos pero, ¿Qué tipo de complejo están detectando los métodos de acuerdo a los padecimientos estudiados?. Para tratar de entender esto, tenemos que en el LES hay anticuerpos antinucleares (AAN), anti-DNA simple o de doble cadena, anti-histonas, anti-proteínas nucleares (42), autoanticuerpos para la región semejante a colágeno del C1q (62) etc. y los antígenos identificados en los complejos inmunes depositados son DNA, histonas, componentes de los nucleosomas y crioglobulinas (4). Los CI en LES contienen 3 clases de inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA, tienen C3 y el tipo de complejo suele ser muy pequeño y es poco frecuente encontrar C1q (48) y no son precipitados por PEG al 2%, esto explica porque el complemento y el C3 están bajos

En la AR el tipo de complejo inmune contiene más N-acetilglucosamina (10) y este mayor contenido puede ser el responsable de inducir la producción del factor reumatoide y formación del CI, es conocido que la IgG del suero de pacientes con AR está deficiente en galactosa revelando una N-acetilgalactosamina como el azúcar terminal. La AR es caracterizada por la presencia en el suero de altos niveles de CI detectables por un número de pruebas, aunque la naturaleza de esos complejos permanece sin aclarar es posible que el proceso de la formación de CI puede estar asociada con la glicosilación alterada de la IgG

En la literatura se menciona dos tipos de factor reumatoide (FR) en los pacientes con AR, el cual es un autoanticuerpo predominante de la clase IgM dirigidos contra el isotipo IgG (9,39) estos complejos activan vía clásica del complemento. El otro FR es del tipo IgG y la subclase IgG4, es el mayor componente en el líquido sinovial y suero, los CI en el líquido sinovial muestran CI tipo IgG-IgG conteniendo FR IgG subclase IgG4 (29)

En los pacientes con AR también se encuentran anti-histonas y los complejos inmunes en AR son más grandes y frecuentemente contienen C1q, los complejos inmunes en AR son precipitados por PEG al 2% (48). La IgM activa vía clásica y la IgG4 no, pero si activan la vía alternativa (38). Estos son algunos

de los posibles complejos que los métodos detectaron.

En las enfermedades reumatológicas autoinmunes como el LES y la AR se observan como una característica propia de estos padecimientos el nivel de complemento y C3 bajos, así como el C4, el cual es variable. El complemento bajo y el C3 bajo se puede explicar porque el C3b se intercala en el enrejado de los complejos inmunes causando solubilidad de los precipitados inmunes (22) o bien a que el complejo se adhiera al tejido consumiéndolo y provocando daño.

Con respecto a las metodologías empleadas el LES mostró mayor positividad por todos los métodos, excepto la vía alterna, mientras que en AR la mayor positividad esta en el PCA y vía alterna de complemento

Los Complejos inmunes en AR tienen C1q presente, esto evita probablemente que no se active la vía clásica del complemento pero que guíe la activación de la vía alterna, a través de la IgG4 Este C1q del CI en AR no esta unido a la IgG4 que también suele estar presente Si el complejo inmune tiene IgA, IgD, IgE no se activa el complemento vía clásica, pero complejos inmunes con IgA activan frecuentemente la vía alterna (63), C1q puede enlazar a C3b e interferir con la activación de la vía alterna (54) si los CIC precipitan y se depositan en tejidos entonces no pueden ser cuantificados como CIC.

En cada método, hay algunas consideraciones que se deben tomar en cuenta, como posibles interferencias y la habilidad en el manejo de los métodos

Algunos riesgos de alteración en la detección de los CIC, como la turbidez, se resolvió en la nefelometría con la delipidación, la cual no afecta al complejo artificial de GGHA según se demuestra en la tabla 4 y gráfica 3, sin embargo la delipidación puede afectar a los CIC que contengan antígenos de origen lipoproteico además la centrifugación puede arrastrar algunos CI que se hayan adherido por su gran tamaño o bien que el complejo sea tan pequeño que no precipite con PEG

La anafilaxia cutánea pasiva es de fácil realización cuando se ha llevado un ligero entrenamiento para el manejo de los cobayos Las posibles interferencias se eliminan al 100% cuando el manejo es correcto Esta prueba fue la que

arrojo más resultados positivos, quizá por ser una prueba “ *in vivo*”, con todas las características naturales de la reacción, propicia para activar las diferentes vías de activación del complemento.

El método ELISA con C1q queda restringido únicamente a los CIC capaces de fijarse al C1q, los CIC en LES no contiene C1q, por lo tanto tienen la posibilidad de unirse al C1q de la placa de reacción, y la positividad fue del 50%, comparada con la de AR que fue de 30%, la posible explicación es que los CIC de AR tienen C1q en su estructura y posiblemente exista un impedimento estérico que impida llevarse a cabo la reacción, reflejándose en la baja positividad. Además, ELISA sólo detecta CIC en cuya estructura este alguna inmunoglobulina fijadora de C1q, los complejos que en su estructura contengan IgA no serán detectados.

En el Consumo de Complemento, los puntos críticos son el manejo del complemento y del sistema hemolítico, los CIC detectados son principalmente activadores del complemento vía clásica, pero sin descartar la activación de la vía alterna, esto posiblemente explica el ligero aumento en la positividad con respecto a los demás métodos. Este aumento no es considerable pues sigue siendo bajo, si el método fuera capaz de cuantificar todos los complejos tanto los activadores de vía clásica como los de la vía alterna la positividad hubiera sido mayor, por esto me inclino por la propuesta, de que sólo cuantificara los CIC activadores de Vía Clásica como lo expresa el fundamento en la figura 11. Un factor importante para la activación “*in vitro*” de la vía alterna es el pH de 6.4 (64), condición que no tiene esta técnica.

Con respecto a la Vía alterna de complemento, es una técnica muy delicada con la cual se deben incluir varios blancos y controles para asegurar que no hay interferencias y eliminar la posibilidad de falsos positivos. La positividad en AR es mayor comparada con los otros dos padecimientos. Esto se explica porque uno de los componentes principales es la presencia de complejos con IgG en los CIC en AR, también la presencia de otras inmunoglobulinas como la IgA activadora de esta vía.

Los estudios reportados en la literatura muestran comparaciones de métodos, para saber cuales correlacionan, pero en ninguno hay una respuesta clara al problema de la cuantificación de la gran heterogeneidad de los CIC

No existe referencia bibliográfica que hable acerca de la complementariedad de los métodos, por lo tanto no se puede confrontar ningún resultado con este tipo de estudio. Sin embargo la complementariedad de los métodos se consiguió porque hubo cuantificación de CIC del 98%

La propuesta de la complementariedad de los métodos es buena, pero también se deben realizar estudios de otro tipo, como son fisicoquímicos, bioquímicos, inmunológicos y genéticos para caracterizar a los CIC en las diferentes etapas de los padecimientos.

El estudio arroja un resultado importante, el mejor método para detectar CIC fue un método "in vivo" el PCA, para los tres tipos de padecimientos estudiados, si se hubiera tipificado el CIC que había en estos sueros probablemente tendríamos mayores respuestas a las incógnitas existentes

XIII. CONCLUSIONES

- 1 No se puede utilizar un sólo método, para detectar CIC, porque sólo se detectarían algunos CI de la amplia gama de CI existentes
2. Los CIC pueden variar su concentración en circulación, por depósito en los tejidos, razón para tomar muestra en diferentes tiempos o fases de la enfermedad.
3. Los métodos detectaron diferentes tipos de CIC como se demuestra con los resultados y el suero que resultó positivo por un método, no lo fue necesariamente por los demás.
- 4 Las determinaciones de CIC son importantes para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo terapéutico
- 5 Los CIC se deben caracterizar antes de que se fijen al tejido y produzca daño, ya fijados los complejos será difícil detectarlos en suero, pero cabe la posibilidad de darles seguimiento por métodos histoquímicos.
6. Hace falta, mayor conocimiento del complejo inmune cuantificado. La caracterización de los complejos inmunes, ayudaría a aclarar los mecanismos de formación y daño, esto permitiría ayudar al paciente, dándole el tratamiento adecuado, dependiendo de que es lo que origina la enfermedad, ya sea bloqueando el mecanismo de daño, el receptor o el supresor causante
- 7 Todos los métodos, excepto la Nefelometría, cuantificaron los CIC que fueron activadores del sistema complemento, por la vía clásica o por la vía alterna y por lo tanto la positividad se vio restringida a estas propiedades, quedando sin detectar los complejos no fijadores de complemento. Con la Nefelometría se trató de cuantificar todos los complejos, sin embargo la positividad fue baja y los factores que contribuyeron, fueron la centrifugación y la delipidación probablemente, debido a pérdida de CIC de tipo lipoproteico, de tamaño muy pequeño o muy grande, esto justificaría la baja positividad alcanzada por este método

8 Las metodologías seleccionadas fueron sencillas de realizar, y la complementariedad entre los métodos quedó demostrada por la positividad encontrada. La complementariedad de los métodos es necesaria debido, a la incapacidad de un sólo método para cuantificar *todos los tipos de CIC* existentes en los diversos padecimientos y en las diversas etapas de la enfermedad

XIV. SUGERENCIAS

- 1 Delimitar la fase de la enfermedad para realizar un estudio semejante, pero controlando estrictamente parámetros como, edad, sexo, medicamentos, etc y hacer diversos grupos de pacientes, para comparar la variación en las diversas etapas
- 2 Continuar con la búsqueda de métodos complementarios dado que la gama de CI es cada día mayor y la heterogeneidad es muy amplia
- 3 En los pacientes que hubo positividad a los Complejos Inmunes Circulantes, identificar las características físicas, químicas y biológicas del complejo, por medio de diferentes técnicas como son cromatográficas, de resonancia magnética nuclear, microscópicas, fluorescencia, gradiente de densidad etc
- 4 Debido a que los CI, pueden estar depositados se recomienda tomarles muestra a los pacientes en diferentes fases de la enfermedad y de esta forma aumentar la posibilidad de encontrar un resultado positivo y de identificar al CIC
- 5 El estudio se debe realizar con un grupo interdisciplinario para hacer una integración de los resultados y así enfocar la búsqueda y la respuesta del origen del daño causado por los complejos inmunes y a su vez estos puedan ser de utilidad para el tratamiento de los pacientes
- 6 Con los resultados que se obtengan, el tratamiento para los pacientes podría ser en varios sentidos remoción de los CIC de la circulación, por plamáferesis, intercambio plasmático Por manipulación de la respuesta inmunológica del huésped provocando tolerancia, inmunosupresión específica, inmunopotenciación y autohemoterapia, así como el bloqueo o la estimulación de la parte bioquímica afectada

XV. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Lamers M. Factors influencing the development of immune-complex diseases *Allergy* 1981; 36. 527-535.
- 2.-Mohan C, Datta SK. Lupus: Key Pathogenic mechanisms and contributing factors. *Clin Immunol Immunopathol* 1995, 77 209-220
- 3.-Takazoe K, Shimada T, Nakano H, et al. Massive uncomplicated vascular immune complex deposits in the kidney of a patient with systemic lupus erythematosus. *Clin nephrol* 1997; 48(3). 195-198.
- 4.-Ambrus JL Jr, Sridhar NR. Immunologic aspects of renal disease, *JAMA* 1997; 278(22): 1938-1945.
- 5.-Gaytan AM. Nefelometría de rayo láser. ¿Una Mejor metodología? *Arch Invest Med* 1990, 21: 79-86.
- 6.-Migliorini P, D' Amelio R, Passaleva A, et al. Comparison of pathologic and normal sera by immune complex determination five disease groups within 190 samples are discriminated by computer-selected combinations of 13 methods *Clin immunol Immunopathol* 1984, 32. 298-315.
- 7.-Hsueh EC, Gupta RK, Glass EC, Yee R, Qi K, Morton DL. Positron emission tomography plus serum TA90 immune complex assay for detection of occult metastatic melanoma *J Am Coll Surg* 1998, 187 (22): 191-197
- 8.-Quist AP, Bergman AA, Remann CT, Oscarsson SO, Sundqvist BU. Imaging of single antigens, antibodies and specific immunocomplex formation

by scanning force microscopy *Scanning Microsc* 1995; 9: 395-400

9.-Jarvis JN, Diebold MM, Chadwell MK, Iobidze M, Moore HT Composition and biological behaviour of immune complexes isolated from synovial fluid patients with juvenile rheumatoid arthritis (JRA) *Clin Exp Immunol* 1995, 100 514-518

10.-Bond A, Kerr MA, Hay FC. Distinct oligosaccharide content of rheumatoid arthritis derived immune complexes *Arthritis Rheum* 1995; 38 744-749

11.-Ouaaz F, Ruscetti FW, Dugas B, Mikovits J, Agut H, Debre P. Role of IgE immune complexes in the regulation of HIV-1 replication and increased cell death of infected U1 monocytes involvement of CD23/Fc epsilon RII-mediated nitric oxide and cyclic AMP pathways *Mol Med* 1996, 2 38-49

12.-Robinson LA, Howell DN, Wigfall DR, Foreman JW Appearance of immune complex glomerulonephritis following the onset of type 1 diabetes mellitus in a child *A J Kidney Dis* 1997, 30 713-716

13.-Dass TK, Aziz M, Rattan A Prognostic significance of circulating immune complex in cancer patients *Jpn J Cancer Res* 1991 82 1284-1291

14.-Hsueh EC, Gupta RK, Qi K, Yee R, Leopoldo ZC, Morton DL TA90 immune complex predicts survival following surgery and adjuvant vaccine immunotherapy for stage IV melanoma *Cancer J Sci Am* 1997, 3 364-370

15.-Nomoto Y, Kuwano K, Hagimoto N, Kunotake R, Kwasaki M, Hara N Apoptosis and Fas/Fas ligand mRNA expression in acute immune complex alveolitis in mice *Eur Respir J* 1997, 10 2351

- 16.-Raynaud AG De L'asphixie locale et de la gangrene symetrique extremities *Rignoux* (Paris) 1862; 6 9
- 17.-Jans H, Dybkjaer E, Halberg P, Circulating immune complexes in healthy persons. *Scand J Rehumatology* 1982; 11: 194-198
- 18.-Costa JJ, Weller FP, Galli JS The cells of the allergic response. *JAMA* 1997, 278 1815-1822
- 19.-Benaceraft B, Inanue R. *Inmunología*. 2ª ed. Buenos Aires editorial Panamericana, 1986 216
- 20.-Fornasieri A, Armelloni S, Bernasconi P, Li M, De septis CP, Sinico RA High binding of immunoglobulin M Kappa reumatoid factor from type II cryoglobulins to cellular fibronectin. a mechanism for induction of in situ immune complex glomerulonephritis?. *Am J Kidney Dis* 1996, 27: 476-483
- 21.-Sacks SH, Zhou W, Sheerin NS. Complement synthesis in the injured kidney does it have a role in immune complex glomerulonephritis? Comment? *J Am Soc Nephrol* 1996, 7 2314-2319
- 22.-Sanchez-Cuenta JM Complement mediated solubilization role of the complement in the clearance of circulating immune-complexes *Allergol Immunophatol* 1994; 22 197-203
- 23.-Chapel H, Haeney M *Inmunología clínica*. México Editorial El Manual Moderno, 1992 221-237
- 24.-Morgan BP, Walport MJ Complement deficiency and disease *Immunol today* 1991, 12 301-306

- 25.-Daha MR. The possible role of membrane complement regulators in vasculitis *Behring Inst Mitt* 1993, 92: 184-190.
- 26.-Szucs G, Kawai M, Kiss E, Csipo I, Szegedi G. Correlation of IgG Fc receptors on granulocytes with serum complex level in systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1995; 42: 577-580.
- 27.-Balow J. Kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1991, 11: 113-115.
- 28.-Nasonova VA, Alekberova SV, Balavanova RM, Sadawaska W. Clinico - Immunological Characteristics of patients with rheumatoid arthritis and symptoms of cutaneous vasculitis *Klin Med Mosk* 1990, 68: 33-37.
- 29.-Zack DJ, Stempniak M, Wong LA, Weisbart HR. Localization of a Fc-binding reactivity to the constant region of human IgG 4, implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1995, 155: 5057-5063.
- 30.-Roccatello D, Piccitto G, Ropolo R, Coppo R, Quattrocchio G. Kinetics and fate of IgA-IgG aggregates as a model of naturally occurring immune complexes in IgA nephropathy *Lab Inv* 1992, 66: 86-95.
- 31.-Ritzmann SE, Daniels JC. Immune complexes: Characteristics, clinical correlations, and interpretative approaches in the clinical laboratory *Clin chem* 1982, 28: 1259-1271.
- 32.-Procaccia S, Bianchi PG, Colucci A, Blasio R, Ardizzone S, et al. Detection of rheumatoid factors of different isotypes and of circulating immune complexes in patients with inflammatory bowel disease *Boll Ist Sieroter Milan* 1990, 69: 413-421.

- 33.-Litvinov SV, Malivonova TF Circulating immune complexes in cancer patients *Exp biol Med* 1988, 105 573
- 34.-Wong JH, Xu-SH, Skinner KA, Foshag LJ, Morton DL Propective evaluation of the use of antigen-specific immune complexes in predicting the development of recurrent melanoma. *Arch-Surg* 1999, 126: 1450-4
- 35.-Allen A, Feehaly J IgA glycosylation in IgA nephropathy *Adv Exp Med Biol* 1998; 435. 175-183
- 36.-Virella G. Immune complex diseases *Immunol ser* 1993, 58:329-341.
- 37.-Davis KA, Hird V, Steward S A study of in vivo complex formation and clearance in man *J Immunol* 1990, 144: 4613-4320
- 38.-Regueiro JR, López LC. *Inmunología: biología y patología del sistema inmune*. España Editorial Médica Panamericana, 1996 3,27-33,132,142-146,150-152
- 39.-Rojas EO *Inmunología (de memoria)*. México Editorial Médica Panamericana S A , 1996 99-125
- 40.-Steengaard J, Johansen SA Biochemical aspects of immune complex formation and immune complex diseases *Allergy* 1980, 35: 457-472
- 41.-Barnett EV Circulating immune complexes; their immunochemistry detection and importance *Am Int med* 1979, 91(3): 430-440
- 42.-IUIS/WHO Working group Laboratory investigations in clinical immunology methods, pitfalls, and clinica indications A second

IUIS/WHO report *Clin Immunol Immunopathol* 1988, 49 478-497

43.-James BP *Use and interpretation of test in clinical immunology* 8th edition USA: Specialty Laboratories, Inc. 1991: 22,38,39,50,202,208,209

44.-William AC. *Methods in immunology and immunochemistry*. New York Academic Press, 1976 vol 5 204.

45.-Kauffman RH, Van Es LA, And Daha MR Aggregate human immunoglobulin G stabilized by albumin. a standard for immune complex detection. *J Immunol Methods* 1979; 31 11-22.

46.-Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr LA, Randall RJ Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193 265-275

47.-Creighton WD, Lambert PH, Miescher PA Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol *J Immunol* 1973, 111 1219-1227

48.-Chia, Barnett EV, Yamagata J, Knutson D, Restivo C, Furst D Quantitation and characterization of soluble immune complexes precipitated from sera by polyethylene glycol (PEG) *J Exp immunol* 1979, 37 399-407

49.-Schultz-Ellison G, Charland C, Driscoll J, Thayer W A rapid method for immune complex detection PEG insolubilization combined with laser nephelometry. *J Immunol meth* 1979; 31 31-40

50.-Roberts-Thompson PJ, Bragley J.A Nephelometric study of the reaction of monoclonal rheumatoid factor with heat aggregated gamma globulin and sera from patients with immune complex diseases *Clin Exp Immunol* 1979 37

- 51.-Watanabe N, Ovary Z. Antigen and antibody detection by in vivo methods, A reevaluation of passive cutaneous anaphylactic reactions *J Immunol Meth* 1977, 14: 381-390
- 52.-Vaz NM, Levine BB, Ovary Z. The nature of antigen-antibody complexes initiating PCA reactions in the guinea pig *Proc Soc Exp Biol* 1970; 133. 1293-1296
- 53.-Barrett TJ. *Immunología médica*. 5ª ed. México: editorial interamericana Mc Graw – Hill, 1990 204-208, 324-355.
- 54.-Lin TM, et al An enzyme-linked immunoassay for circulating immune complexes using solid phased goat C1q. *J Immunol Method* 1983, 63 187-205
- 55.-Barrett TJ *Immunología médica*. 5ª ed México editorial interamericana Mc Graw- Hill, 1990. 204, 205
- 56.-Harkiss GD, Brown DL Detection of immune complexes by new assay, the polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC) *Clin Exp Immunol* 1979, 36 117-129
- 57.-Fine DP. C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA. *J immunol* 1972, 109 807-809
- 58.-Arroyave CM Lysis of human Erythrocytes due to activation of the alternate complement pathway by nephritic factor (C3Nef) *J Immunol* 1974, 113 768

59.-Gonzalez BJ, *Tecnología y métodos de laboratorio clínico*. México Salvat, 1990 61-62

60.-Marques de C MJ. *Probabilidad y estadística: para ciencias químico biológicas*. México. Mc Graw Hill, 1991 420-424

61.-Onodera M, Okozaki K, Morita M, Nishimori I, Yamamoto Y Immune complex specific for the pancreatic duct antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren syndrome. *Autoimmunity* 1994, 19(1) 23-29

62.-Uwatoko S, Mannik M Low molecular weight C1q-binding IgG in patients with systemic lupus erythematosus consists of autoantibodies to the autoantibodies to the collagen -like region of C1q. *J Clin Invest* 1988, 82 816-824

63.-Valim YM, Lachman PJ The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes A systematic study using chimeric anti-NIP antibodies with human Fc regions *Clin Exp Immunol* 1991, 84 1-8

64.-Fishelson Z, Horstmann R D, Müller-Eberhard HJ Regulation of the alternative pathway of complement by pH. *J Immunol* 1987, 138 3392-3395

65.-Sturfelt G, Bengtsson A Klint C, Sjöholm A, Truedsson L Novel roles of complement in systemic lupus erythematosus-hypothesis for a pathogenetic vicious circle. *J Rheumatol* 2000, 273 663