

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y**  
**BIOQUÍMICAS**  
**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS**  
**DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)**



**ESTANDARIZACIÓN DEL METODO DE INMUNODIFUSION**  
**RADIAL PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD**  
**HEMOLITICA TOTAL DEL COMPLEMENTO**

Trabajo de grado de especialidad para optar el título de Especialidad en Diagnostico de Laboratorio en Salud: Mención Inmunología

**POR: LIC. SHIRLEY VIVIANA PELÁEZ VARGAS**

**TUTOR: DR. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA, ESP.**

**LA PAZ – BOLIVIA**  
**Abril, 2013**

## **DEDICATORIA**

*A mis queridos papás Mario y Carmen por el apoyo incondicional brindado en cada momento de mi vida.*

*En especial a Iván y a mis hijos Alejandro y Nataly por ser mi apoyo moral, sentimental y motivación constante para seguir adelante día a día.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios Creador por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que fuera posible alcanzar este logro.

Agradecer a toda mi familia, que siempre me ha brindado su apoyo y confianza para alcanzar mis objetivos

Un agradecimiento especial a mí asesor, Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya por todo su tiempo, apoyo, comprensión, dedicación y sabiduría que impartió para que se pueda realizar este trabajo.

A mis amigos, Ana Cruz, José Luis Choquehuanca, Diego Bonifaz, Patricia Poma, que siempre me apoyaron incondicionalmente, gracias por su amistad y colaboración brindada.

Al Instituto SELADIS y todo el personal por haberme colaborado en todo momento, por su sincera amistad y por su acogida durante este tiempo para realizar la especialidad.

## TABLA DE CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| <b>I.INTRODUCCION</b>                                  | 1  |
| <b>II.MARCO TEORICO</b>                                | 3  |
| A. Vía clásica   | 5  |
| B. Vía alterna   | 11 |
| a) Vía alternativa en estado de reposo                 | 11 |
| b) Amplificación de la vía alternativa                 | 13 |
| C. Vía de la lectina                                   | 13 |
| D. Complejo de ataque a membrana                       | 15 |
| E. Receptores para factores del complemento            | 16 |
| a) CR1 (receptor de complemento tipo 1, CD35)          | 16 |
| b) CR2 (receptor de complemento tipo2, CD21)           | 16 |
| c) CR3 (receptor de complemento tipo3,MAC-1,CD11bcd18) | 17 |
| d) CR4 (CD11c CD18, p 150,95)                          | 17 |
| F. Mecanismos de regulación del complemento            | 17 |
| a) Inhibición de C1                                    | 18 |
| b) Inhibición de C4                                    | 19 |
| c) Inhibición de C3                                    | 19 |
| d) Inhibición del MAC                                  | 20 |
| G. Funciones del complemento                           | 20 |
| a) Acción citolítica del complemento                   | 21 |
| b) Acción anafilotoxina del complemento                | 22 |
| c) Acción quimiotáctica                                | 22 |
| d) Acción facilitadora de la fagocitosis               | 22 |
| H. Deficiencias congénitas                             | 23 |
| a) Deficiencias de componentes de la vía clásica       | 23 |
| 1) Deficiencia del componente C1                       | 24 |
| 2) Deficiencia del componente C2                       | 24 |
| 3) Deficiencia del componente C4                       | 24 |
| b) Deficiencias de componentes de la vía alterna       | 27 |
| 1) Deficiencia del factor D                            | 27 |
| 2) Deficiencia de properdina                           | 27 |
| c) Deficiencia del componente C3                       | 28 |
| d) Deficiencia de los componentes del MAC              | 28 |
| 1) Deficiencias del componente C5                      | 28 |
| 2) Deficiencias del componente C6                      | 28 |
| 3) Deficiencias del componente C7                      | 29 |
| 4) Deficiencias del componente C8                      | 29 |
| 5) Deficiencias del componente C9                      | 29 |

|  |    |
|--|----|
| I. Determinación de las pruebas de laboratorio para la cuantificación de la actividad hemolítica del complemento | 30 |
| a) Alternativas metodológicas  | 30 |
| b) Pruebas para la valoración del complemento  | 31 |
| 1) Fundamento del método CH50  | 31 |
| 2) Inmunodifusión radial   | 32 |
| 3) Método de Elisa   | 33 |
| <b>III. ANTECEDENTES</b>   | 34 |
| <b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>  | 35 |
| <b>V. JUSTIFICACION</b>  | 36 |
| <b>VI. OBJETIVOS</b>   | 37 |
| A) Objetivo principal  | 37 |
| B) Objetivos específicos   | 37 |
| <b>VII. DISEÑO METODOLÓGICO</b>  | 38 |
| A) Tipo de estudio   | 38 |
| B) Población en estudio  | 38 |
| <b>VIII. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA</b>   | 39 |
| A) Tamaño de la muestra  | 39 |
| B) Criterios de inclusión  | 39 |
| C) Criterios de exclusión  | 39 |
| <b>IX. CONTEXTO Y LUGAR</b>  | 40 |
| <b>X. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | 40 |
| A) Materiales  | 40 |
| 1. Materiales  | 40 |
| 2. Equipos   | 40 |
| 3. Reactivos   | 41 |
| B) Métodos   | 41 |
| 1. Producción de hemolisina  | 41 |
| 2. Protocolo de realización de la prueba de CH50% mediante Diluciones en tubo                                    | 43 |
| a) Preparación de la suspensión de glóbulos rojos  | 43 |
| b) Ajuste de concentración celular de los GRC por espectrofotometría   | 44 |
| c) Sensibilización de glóbulos rojos de carnero  | 44 |
| d) Preparación de la batería de diluciones en tubo para realizar CH50%   | 45 |
| e) Cálculo de resultados de la prueba de CH50%   | 46 |
| 3. Método de ELISA para la determinación de CH100% (HUMAN)   | 46 |
| a) Preparación de reactivos  | 46 |
| b) Muestras  | 47 |
| c) Procedimiento   | 48 |
| 4. Preparación de placas de IDR para la determinación de la actividad Hemolítica total del complemento.          | 49 |

|   |           |
|---|-----------|
| 5. Estandarización de la prueba de IDR que mide la actividad Hemolítica total del complemento   | 51        |
| 6. Determinación de la reproducibilidad del estudio   | 53        |
| 7. Determinación de la repetibilidad del estudio  | 53        |
| 8. Realización del control de calidad de la prueba de IDR   | 53        |
| <b>XI. RESULTADOS</b>   | <b>54</b> |
| A) Estandarización de la prueba de IDR que mide la actividad Hemolítica total del complemento CH100%  | 55        |
| B) Determinación del promedio y desviación estándar para la obtención del rango de referencia de la técnica de IDR  | 60        |
| C) Determinación de la repetibilidad y reproducibilidad de la prueba de IDR que determina la actividad hemolítica total del complemento                       | 62        |
| D) Correlación de resultados de la técnica de dilución en tubos respecto al Método de ELISA que evalúa la actividad hemolítica total del Complemento          | 64        |
| E) Correlación de IDR frente al ELISA CH100% tomando en cuenta los Valores normales, altos y bajos de ambas técnicas  | 65        |
| F) Correlación de resultados de la técnica de IDR frente a la técnica de dilución en tubos  | 66        |
| G) Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y Concordancia de la técnica de ELISA CH100% frente al CH50%                          | 67        |
| H) Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y Concordancia de la técnica de ELISA CH100% frente a la técnica de IDR estandarizada | 68        |
| <b>XII. DISCUSIÓN</b>   | <b>70</b> |
| <b>XIII. CONCLUSIONES</b>   | <b>74</b> |
| <b>XIV. RECOMENDACIONES</b>   | <b>75</b> |
| <b>XV. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>76</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura N°1 Esquema de vías de activación del Complemento  | 4  |
| Figura N°2 Unión de la unidad C1q al Fc de las Inmunoglobulinas,<br>unidas a su vez a la membrana celular         | 6  |
| Figura N°3 Unión de C1 a las porciones Fc de la Inmunoglobulina IgG e IgM   | 7  |
| Figura N°4 Esquema de activación de la Vía clásica del Sistema del Complemento                                    | 10 |
| Figura N°5 Esquema de activación de la Vía alterna del Sistema del Complemento                                    | 12 |
| Figura N°6 Vía de activación de las lecitina de la Cascada del Complemento  | 14 |
| Figura N°7 Vía lítica del Sistema del Complemento   | 15 |
| Figura N°8 Funciones del Sistema del Complemento  | 21 |
| Figura N°9 Placa de Inmunodifusión radial con pozos para el sembrado de<br>las muestras, controles y calibradores | 51 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla N°1 Protocolos evaluados para determinar los títulos óptimos de la hemolisina y del suero control de la prueba de CH50% por el método en tubo  | 43 |
| Tabla N°2 Protocolo de las Diluciones seriadas de las muestras, controles positivo y negativo para la determinación de CH50% por el método de dilución en tubo   | 45 |
| Tabla N°3. Protocolos de trabajo para estandarizar la técnica de Inmunodifusión radial que mide la actividad hemolítica total del Complemento tomando en cuenta varios parámetros.                                       | 52 |
| Tabla N°4 A. Protocolo N°1 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero pre- incubadas a 37° por 30 minutos e incubados luego a T A° por 48 horas.        | 55 |
| Tabla N°4 B. Protocolo N°2 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero incubadas a temperatura ambiente por 48 horas.                                    | 56 |
| Tabla N°4 C. Protocolo N°3 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero pre- incubadas a 37° por 30 minutos e incubados luego a T° ambiente por 18 horas. | 57 |
| Tabla N°4 D. Protocolo N°4 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero incubadas a T° ambiente por 18 horas.   | 58 |
| Tabla N°4 E. Protocolo N°5 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero pre- incubadas a 37°C por 30 minutos e incubados luego a 4°C por 48 horas.        | 59 |
| Tabla N°4 F. Protocolo N°6 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero incubadas por 48 horas a T° ambiente.   | 60 |
| Tabla N°5. Determinación de la Repetibilidad del estudio calculando el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación  | 62 |
| Tabla N°6. Determinación de la Reproducibilidad del estudio calculando el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación   | 63 |
| Tabla N°7 Correlación de la técnica de dilución en tubos respecto al método ELISA que mide la actividad hemolítica total del Complemento   | 64 |
| Tabla N°8 Correlación de IDR frente al ELISA CH 100% (gold estándar) tomando en cuenta los valores normales, altos y bajos de ambas técnicas   | 65 |



|  |    |
|--|----|
| Tabla N°9 Correlación de IDR que es la técnica estandarizada frente a la técnica de dilución en tubos  | 66 |
| Tabla N°10 Determinación de la correlación de resultados entre sueros con valores normales y sueros con valores anormales de la prueba de ELISA CH100% frente al CH50%   | 67 |
| Tabla N°11 Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica ELISA CH100% frente al CH50%  | 67 |
| Tabla N°12 Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica ELISA CH100% frente a la técnica de IDR estandarizada para determinar la actividad hemolítica total del Complemento | 68 |
| Tabla N°13 Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica ELISA CH100% frente a IDR   | 69 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Gráfico N°1 | Distribución según sexo y edad de los pacientes cuyos sueros fueron utilizados para la estandarización de la prueba de IDR que mide la actividad hemolítica total del Complemento | 54 |
| Gráfico N°2 | Determinación de los puntos de cohorte que permiten diferenciar los bajos, normales y altos de la actividad hemolítica total del Complemento                                      | 61 |

## RESUMEN

El sistema del complemento es un complejo constituido por más de 30 proteínas plasmáticas y de membrana, en el cual la activación enzimática secuencial de sus componentes genera una cascada biológica que permite que se puedan cumplir diferentes funciones. En el presente trabajo se ha estandarizado una técnica que permite medir la actividad hemolítica total del complemento por Inmunodifusión radial, la misma que reduce costos, tiempo y material, de la cual los valores obtenidos se los relaciona con el método de ELISA que determina la actividad hemolítica total del complemento (estándar de oro) y la técnica de dilución en tubos de uso rutinario en el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.

En el proceso de estandarización se evaluó el título óptimo de la hemolisina para la sensibilización de los glóbulos rojos, las condiciones de preparación del gel de agarosa que contiene los glóbulos rojos sensibilizados, se determinó los puntos de corte para establecer niveles altos y bajos de la actividad del complemento y se determinó la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba estandarizada.

Con los resultados obtenidos, se determinó que el ajuste de concentración celular de los glóbulos rojos de carnero debe realizarse por espectrofotometría a la densidad óptica de 0.500 leído a una longitud de onda de 540 nm, la hemolisina debe ser diluida 1/150. Estos parámetros producían resultados con mejor repetitividad y reproducibilidad. En pacientes sin enfermedad los valores de referencia se encuentran en el rango de 8.34 y 5.58 mm de diámetro con un valor promedio de 6,96 mm. Los pacientes con actividad hemolítica total del complemento (CH100) disminuida, mostraron un valor promedio de 4.10 mm con límites superior de 4,83 mm de diámetro. Estos hallazgos nos muestran que la zona de duda “área gris” para el método estandarizado estaría comprendida entre los valores de 4.84 a 5,57 milímetros de diámetro. Se determinó que la técnica de Inmunodifusión radial (IDR) y dilución en tubos tienen una Sensibilidad de 88% y

Especificidad de 73 % y una Sensibilidad de 75% y Especificidad del 65% respectivamente en correlación a la técnica de ELISA ( $p < 0.005$ ). Finalmente los coeficientes de variación ( $p < 0.005$ ) de los ensayos de repetitividad y reproducibilidad de la prueba de IDR fueron 4,8% y 4,9% respectivamente. Con los resultados obtenidos del presente estudio se determinó que la prueba de IDR estandarizada es un método alternativo para determinar los niveles de CH100 de los pacientes por poseer mayor sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y repetitividad que el método de dilución en tubos que se utiliza de manera rutinaria en el laboratorio.

## ABSTRACT

The complement system is a complex consisting of more than 30 plasma and membrane proteins, in which sequential enzymatic activation of their biological components allows to fulfill different biological functions. In this work, a technique to measure the total hemolytic activity of complement by radial immunodiffusion has been standardized, it reduces costs, time and material, of which all values were related to the ELISA method that determines the activity total hemolytic complement (gold standard) and the tube dilution technique routinely used in the Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory of the SELADIS Institute.

In the standardization process it was evaluated the optimal degree of hemolysin for the sensitization of the red blood cells, the conditions of the agarose gel preparation containing red blood cells sensitized, was determined the cutoff points to establish high and low levels of complement activity and determined the diagnostic sensitivity and specificity of the standardized test.

With the results obtained, it was determined that the cell concentration of sheep red blood cells must be performed spectrophotometrically at the optimum density of 0.500 and measure at 540 nm of wavelength, the hemolysin should be diluted 1/150. These parameters produced results with better repeatability and reproducibility. Patients without disease showed reference values in a range of 8.34 and 5.58 mm in diameter with an average value of 6.96 mm. Patients with total hemolytic activity of complement (CH100) increased, showed an average value of 4.10 mm and a upper limits in diameter of 4.83 mm. These findings show that the area of doubt "gray area" for the standardized method would fall between the values of 4.84 to 5.57 mm in diameter. It was determined that the method of radial immunodiffusion (RID) and dilution tubes have a 88% sensitivity and specificity of 73% and a sensitivity of 75% and specificity 65%, respectively, in correlation to ELISA results ( $p < 0,005$ ). Finally repeatability and

reproducibility test showed coefficients of variation ( $p < 0.005$ ) of 4.8% and 4.9% respectively for the RID method. With the results of this study was determined that the IDR standardized method is an alternative method to determine levels of CH100 of patients, due to possess greater sensitivity, specificity, reproducibility and repeatability than the tube dilution method used in a routinely manner in the laboratory.

## Palabras claves

|         |                                       |
|---------|---------------------------------------|
| SiC:    | Sistema del complemento               |
| C:      | Complemento                           |
| Ag:     | Antígeno                              |
| Ac:     | Anticuerpo                            |
| Ig:     | Inmunoglobulina                       |
| CH50% : | Complemento hemolítico 50%            |
| MHC:    | Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| MBL:    | Lectina de unión a manosa             |
| P:      | Properdina                            |
| MAC:    | Complejo de ataque a la membrana      |
| CR:     | Receptor de Complemento               |
| LES:    | Lupus eritematoso sistémico           |
| IDR:    | Inmunodifusión radial                 |
| NaCl:   | Cloruro de Sodio                      |
| GRc:    | glóbulos rojos de carnero             |

## I. INTRODUCCIÓN

El Sistema del complemento (SiC) es un complejo constituido por más de 30 proteínas plasmáticas y de membrana, en el cual la activación enzimática secuencial de sus componentes genera una cascada biológica que permite que se puedan cumplir diferentes funciones. Las proteínas del complemento desempeñan un papel importante en la respuesta inmune natural o inespecífica y promueven la inflamación y la destrucción de microorganismos, constituyen elementos importantes para el desarrollo de la respuesta inmune adquirida o específica<sup>1</sup>

La activación del Sistema del Complemento puede ocurrir por tres vías. La vía alterna, filogenéticamente más antigua, es activada principalmente por polímeros (ej. polisacáridos) y superficies de origen microbiano<sup>1</sup>. La vía clásica es iniciada por el reconocimiento de complejos antígeno-anticuerpo (IgM, IgG1 e IgG3, principalmente). Por último, la vía de las lectinas es iniciada por lectinas que reconocen residuos de manosa en las superficies microbianas, tales como la MBL (lectina de unión a manosa). Todas estas vías de activación conducen a una fase efectora común, que culmina con el ataque lítico a membranas.<sup>3</sup>

Para la comprensión de los métodos de cuantificación del SiC o de sus componentes individuales, así como para interpretar adecuadamente los resultados de laboratorio, es necesario tener claros los aspectos básicos de la cascada general, sus componentes e interacciones además de su regulación.

La deficiencia total de una proteína del complemento es rara. La ausencia o la reducción de un componente del complemento suele ser consecuencia del consumo debido a la activación. Puede deberse a una enfermedad autoinmunitaria o a una infección frecuente. La medición del complemento hemolítico 50% (CH50%) por el método de Inmunodifusión radial o por ELISA se recomienda actualmente como parte del protocolo de diagnóstico de la Inmunodeficiencia primaria, también puede proporcionar



información importante para muchas otras patologías, como el lupus eritematoso sistémico (LES) e infecciones bacterianas.<sup>2</sup>

Es por esta razón que el método de CH50 se utiliza como prueba de exploración para detectar una deficiencia en las vías del complemento clásica y terminal. Mide la lisis de eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos después de añadir suero fresco. El resultado se expresa como la cantidad recíproca de la dilución que produce la lisis del 50 % de los eritrocitos (glóbulos rojos),<sup>3</sup> pero esta técnica tiene la desventaja de ser tediosa en cuanto al tiempo en que se demora al realizar la prueba y el gran consumo de los reactivos que se utiliza ya que se realiza por duplicado.

Si con la detección sistemática se descubre una deficiencia en una de las vías del complemento, se puede medir el nivel de cada componente del complemento por separado. Las deficiencias de componentes específicos del complemento están relacionadas con una gran variedad de estados patológicos. Por ejemplo, la deficiencia de C3 está relacionada con una elevada sensibilidad a las infecciones bacterianas.<sup>4</sup>

Es así que en el Instituto SELADIS se quiere estandarizar una técnica que permite medir la actividad hemolítica total del complemento por Inmunodifusión radial, de la cual los valores obtenidos se los relaciona con el método de ELISA que determina la actividad hemolítica total del complemento que es el gold estándar y la técnica de dilución en tubos que se realizaba anteriormente, pero el inconveniente que presentaba esta técnica es que era muy tediosa

## II. MARCO TEÓRICO

A finales del siglo XIX Paul Ehrlich usó el término "Complemento" (C) para designar la actividad del suero sanguíneo que podía complementar la capacidad de los anticuerpos específicos de lisis bacterias, pero recién por el año 1895 Jules Bordet descubre este componente, caracterizado frente a los anticuerpos por su termolabilidad. En 1907 Ferrata inicia la caracterización de sus componentes utilizando métodos de diálisis. Por razones netamente cronológicas, los componentes que se iban descubriendo iban recibiendo denominaciones a base de números tras la letra "C", razón por la cual, su orden de actuación, en general no guarda relación con su nomenclatura <sup>5</sup>

En la activación del complemento se pone en marcha una serie de reacciones consecutivas en cascada, de tal forma que a partir de cada una de ellas se genera un producto activo que además de determinar que la reacción consecutiva prosiga, puede tener diferentes acciones biológicas importantes en la defensa del organismo.

Las proteínas del complemento desempeñan un papel importante en la respuesta inmune natural o inespecífica y promueven la inflamación y la destrucción de microorganismos, constituyen elementos importantes para el desarrollo de la respuesta inmune adquirida o específica<sup>1</sup>

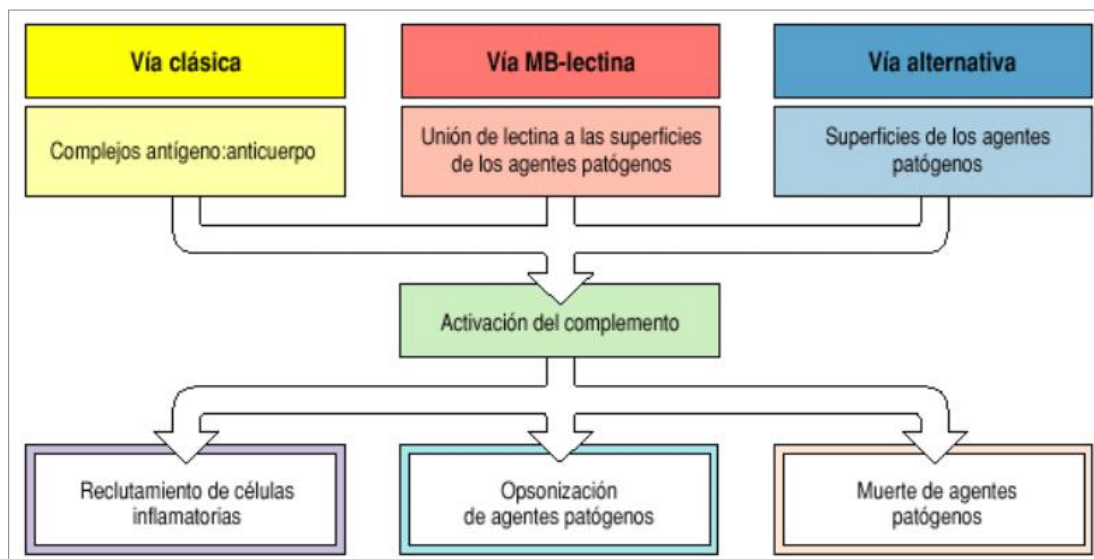
Varias proteínas del complemento son divididas durante la activación del SiC por acción de serin proteasas y los fragmentos están designados con sufijos en subíndices (por ejemplo, C3 se divide en dos fragmentos, C3a y C3b). Normalmente, los fragmentos más grandes se designan como "b" y los pequeños como "a". La nomenclatura cambia para C2, por razones históricas: el fragmento mayor se denomina C2a y el menor C2b.

El hepatocito es el principal productor de factores del complemento como ser el C3, C6, C9 y el inhibidor de C1 además del properdin y el Factor B. No obstante, por ejemplo

los componentes de C1 son sintetizados por las células epiteliales del intestino y del sistema genito-urinario y los adipocitos sintetizan factor D. Los fibroblastos producen C2, C3, C5 y C9, en el riñón se produce el C3 y C4. Se ha observado que los macrófagos activados producen algunos factores del complemento; sin embargo, esto solo tiene importancia, en el foco inflamatorio. Las citocinas inflamatorias (IL1, IL6 y TNF) e IFN-gamma incrementan la síntesis de algunos factores del complemento en el hígado, como el C3, C6 y C9 mencionados anteriormente<sup>6</sup>

Actualmente se reconocen tres vías de activación del complemento; éstas son la vía clásica, dependiente de complejos antígeno (Ag) – anticuerpo (Ac) o por la proteína C reactiva; la vía alterna, iniciada por sustancias localizadas en la superficie de microorganismos y la vía de la lectina que se une a la manosa (LUM), conocida también como la vía clásica independiente de anticuerpos.

**Figura N°1. Esquema de vías de activación del Complemento**



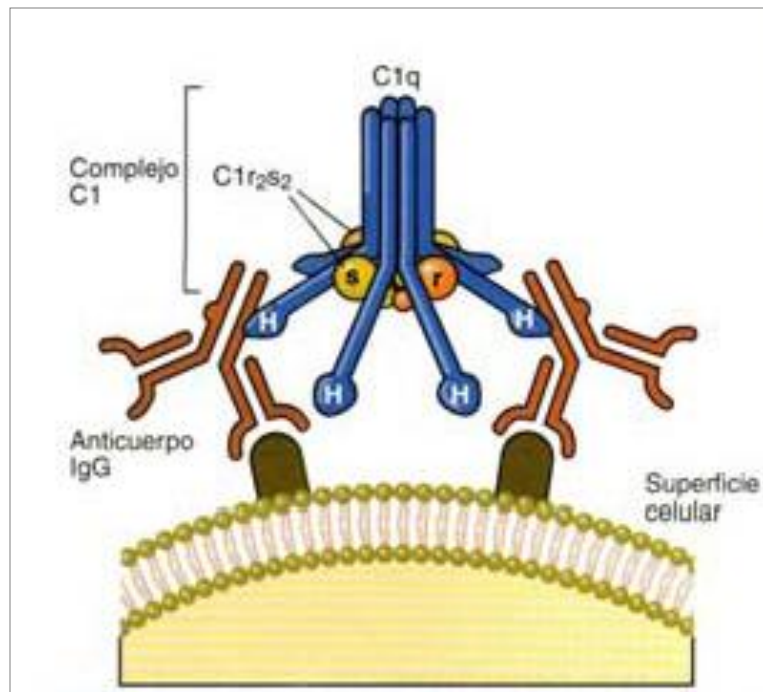
<sup>20</sup> Janeway, Charles A. Inmunobiología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.

### A. VIA CLASICA

Existen algunos activadores no inmunológicos de esta vía; por ejemplo ciertas cepas de *E. coli* y *Salmonella*, de baja virulencia, virus de la parainfluenza o VIH, e incluso algunas células apoptóticas, que interactúan directamente con C1q, dando lugar a la activación de C1, y a su vez la activación del sistema clásico en ausencia de anticuerpo, esto en la mayoría de los casos ayuda a los procesos de defensa naturales del organismo. De la misma manera, otras estructuras como cristales de urato, proteínas básicas mielínicas, endotoxinas bacterianas, DNA desnaturalizado, y polianiones como la heparina, también pueden activar directamente esta vía. Por ejemplo, la activación por cristales de urato contribuye a la inflamación asociada a la gota<sup>7</sup>.

La subunidad C1q se fija al anticuerpo en los sitios de unión que son el dominio CH2 de la IgG y el CH4 de la IgM. El CH2 constituye el primer dominio del segmento Fc del anticuerpo, en él se unen lateralmente algunas cadenas de carbohidratos y permite modificar la estructura espacial de la molécula de Ig G.<sup>6</sup> El CH4 presente en la Ig M participa en la activación del sistema del complemento, además, a través de él se une a los receptores Fc de los macrófagos. Este fenómeno es el primero que ocurre en la activación mediada por anticuerpos de la vía clásica del complemento y es el que pone en marcha la cascada de reacciones subsiguientes. El fragmento C1q va a activar a las dos subunidades C1r, que actuará sobre las dos C1s que, entonces, adquieren actividad de esterasa de tipo serina, responsable de iniciar las fases siguientes. Las serín proteasas son hidrolasas que degradan enlaces peptídicos de péptidos y proteínas y que poseen en su centro activo un aminoácido de serina esencial para la catálisis enzimática, cortan la cadena polipeptídica en el lado carboxilo de aminoácidos específicos, esto es, que reconocen secuencias en su la estructura primaria.<sup>8</sup>

**Figura N°2. Unión de la unidad C1q al Fc de las inmunoglobulinas, unidas a su vez a la membrana celular**



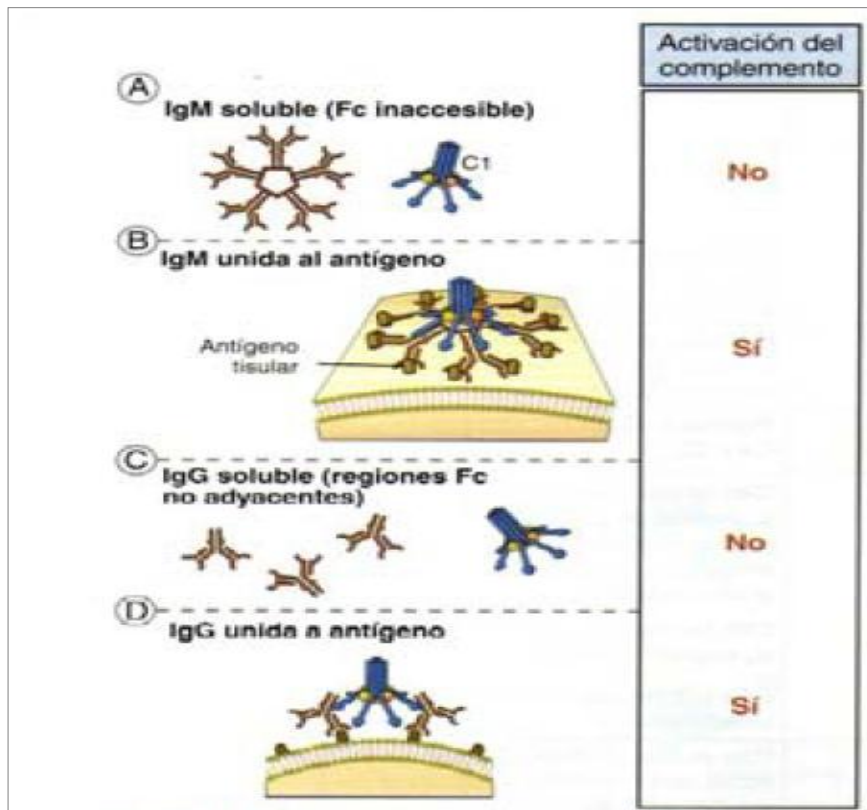
<sup>1</sup> Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular

Para que se produzca la activación de C1q, éste debe estar unido por su región globular al menos a dos dominios de distinta fracción Fc. Esto implica que los anticuerpos, para activar al complemento, han de encontrarse con la disposición espacial apropiada que permita a C1q acoplarse a varios de ellos al mismo tiempo (complejos Ag-Ac dispersos sobre una superficie celular pueden no llegar a activar el complemento). C1q, por otra parte, solo se une a inmunoglobulinas cuando éstas, a su vez, se encuentran unidas a sus antígenos y éstos están integrados en una misma superficie (membrana celular).

Dado que cada molécula de Ig G sólo tiene una región Fc, deben acercarse múltiples moléculas de Ig G para que se pueda unir a C1q y múltiples Ac IgG quedan agrupados únicamente cuando se unen a un Ag multivalente. Aunque la IgM libre (circulante) es

pentamérica no se une a C1q aparentemente porque las regiones Fc de la IgM libre son inaccesibles para el C1q. La unión de IgM a un antígeno induce un cambio de conformación que expone los sitios de unión para que se pueda unir a C1q.<sup>1</sup>

**Figura N° 3. Unión de C1 a las porciones Fc de la Inmunoglobulina Ig G e Ig M.**



<sup>1.</sup> Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular

Este concepto es importante para comprender por qué complejos antígeno-anticuerpo solubles no conectados con membranas, pueden convivir en el suero con los factores del complemento sin llegar a activarlos y que, por el contrario, si se activan cuando tales complejos quedan atrapados sobre algún tejido, originando, en este caso, un proceso inflamatorio localizado.<sup>9</sup>

La activación de C1q provoca que una molécula de C1r del complejo C1qr2s2 pierda por autocatálisis un trozo de bajo peso molecular, quedando activada. Esta molécula, a su vez, activa a la otra molécula de C1r. Las dos moléculas de C1r atacan a las dos moléculas de C1s liberándose dos trozos de bajo peso molecular y dejando expuestos sus dominios catalíticos.

C1s del complejo C1q2r2s va a actuar sobre el factor C4 produciendo su escisión en dos moléculas, una pequeña, C4a, que se difunde a la fase fluida y otra mayor, C4b, que se une por enlace covalente de tipo éster o amida, a la superficie celular. Esta fracción C4b unida a la membrana, en presencia de iones  $Mg^{++}$ , forma un complejo con la fracción C2. C1s también actúa sobre C2, provocando la escisión de esta molécula en dos fragmentos, uno menor C2b y otro mayor C2a. Este último se une al C4b para formar el complejo C4b2a (convertasa C3 de la vía clásica), que tiene actividad esterásica<sup>10</sup>

C4 es una glicoproteína sérica que consta de tres cadenas polipeptídicas,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , unidas por enlaces disulfuro. Codificada dentro del sistema principal de Histocompatibilidad (MHC), en humanos presenta dos isotipos C4A y C4B, es el primer sustrato de C1 tras su activación. Aunque carece de actividad enzimática, presenta en su cadena a un enlace tioéster interno que tras la activación genera un carbonilo altamente reactivo, capaz de formar enlaces covalentes con superficiesceptoras, inmunocomplejos, membranas celulares, etc.<sup>11</sup>

C2 es una glicoproteína que consta de una única cadena de unos 100 kDa de peso molecular. Es sustrato de C1, posterior a la activación de C4. Es una serín proteasa, altamente homóloga al factor B de la vía alternativa, estando ambos genes fuertemente ligados dentro del MHC, y próximos al de C4. Igual que factor B, constituye un tipo de serín proteasa distinto.<sup>12</sup>

El complejo C4b2a, cuyo centro activo se encuentra en el componente C2a, actúa sobre el factor C3 que se transforma por proteólisis en dos fragmentos activos: la anafilotoxina

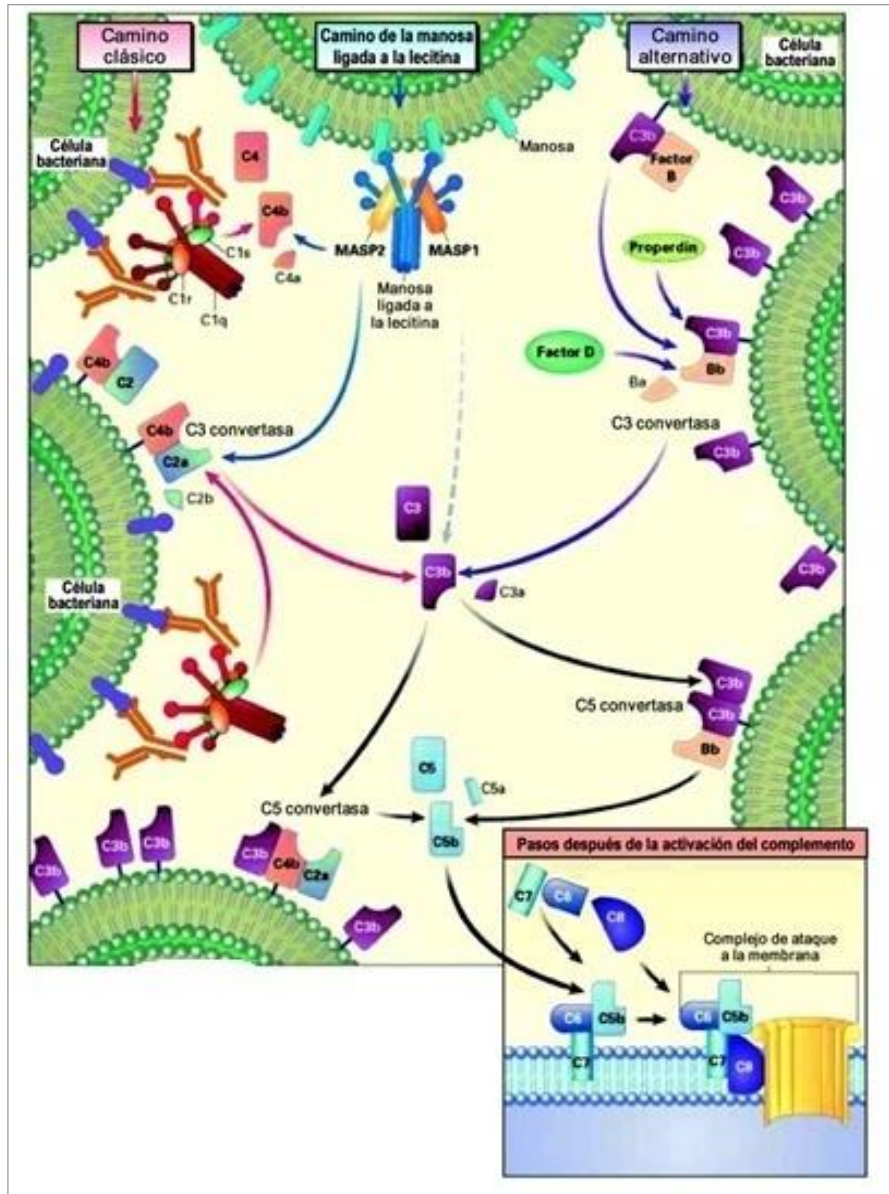
C3a, que pasa al medio líquido, y el fragmento C3b que se une a la membrana celular mediante un enlace de tipo éster o amida. Al complejo formado por C4b2a3b se le denomina convertasa de C5 de la vía clásica ya que tiene capacidad de actuar sobre este factor, siendo éste el primer paso de la denominada vía lítica.

El factor C3b unido a la membrana celular también puede ser captado por los fagocitos, que al presentar receptores de membrana para C3b, se facilita de esta forma el proceso de la fagocitosis (opsonización)

La anafilotoxina C3a, por otra parte, potencia la inflamación al inducir la degranulación de los basófilos y mastocitos y liberar, por tanto, mediadores de la inflamación. El incremento de la permeabilidad capilar facilita el acceso al foco de nuevos factores del complemento y de inmunoglobulinas desde la sangre, así como la llegada de fagocitos que son movilizados por la actividad quimiotáctica del propio C3a y otros factores quimiotáxicos del foco inflamatorio



Figura N°4. Esquema de activación de la Vía clásica del Sistema del Complemento



<sup>13</sup> Waport, M. NEJM; 2001. 344(14): 1058-1066

## **B. VIA ALTERNA**

Llamado así porque fue descubierta posterior a la vía clásica, aunque filogenéticamente es probable que sea la más antigua y para su activación no requiere la presencia del anticuerpo por lo que es un mecanismo de defensa importante en los estadios iniciales de la infección cuando todavía no se han sintetizado cantidades importantes de anticuerpos. Funciona de forma continua a un bajo nivel y solo en presencia de determinados factores se amplifica, esta vía se encuentra en dos estados, de reposo y en activación.

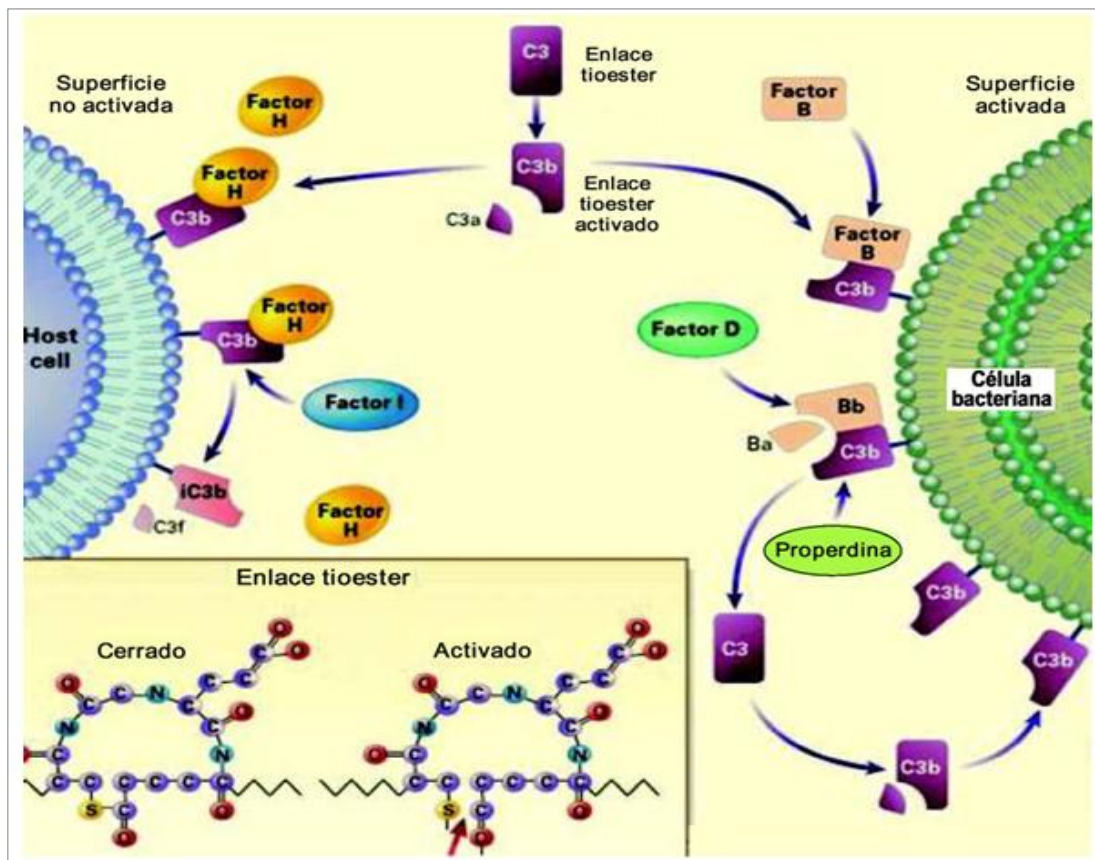
### **a) Vía alternativa en estado de reposo**

En condiciones normales, en el plasma, el factor C3 se escinde continuamente y de forma lenta, en un proceso que se denomina marcapasos de C3, dando lugar a C3b y quedando así su enlace tioéster interno expuesto. Si no se une a la superficie de algún microorganismo C3b permanece en fase fluida y se combina con una molécula de agua C3(H<sub>2</sub>O), quedando así su enlace tioéster hidrolizado y el C3b inactivo. En presencia de iones magnesio el C3(H<sub>2</sub>O) puede enlazar otra proteína circulante, el factor B es equivalente al factor C2 de la vía clásica.<sup>14</sup>

El factor D circula en la sangre de forma activada aunque no es perjudicial para el organismo, debido a su baja concentración. Este factor tiene actividad esterasa de tipo serina y puede actuar sobre el complejo C3(H<sub>2</sub>O) y el factor B como resultado rompe a B en una pequeña fracción, Ba, que se libera y en una de mayor peso molecular, Bb, que se mantiene unida al complejo (C3bBb). Este complejo, que permanece en la fase fluida, tiene actividad convertasa de C3 de la vía alternativa, es decir que puede degradar a C3 en dos fracciones: C3a y C3b, radicando la actividad proteolítica del complejo en la molécula Bb.<sup>15</sup>

El factor C3b puede unirse covalentemente mediante enlace éster o amida a las membranas celulares, captando más factor B y amplificando el proceso, lo que permitiría la entrada en la vía lítica. No obstante, en condiciones normales o de reposo, esto no ocurre ya que C3b tiene una vida media muy corta. Por otra parte, los sistemas de regulación que se comentarán más abajo mantienen en un bajo nivel el funcionamiento de este circuito.

**Figura N°5. Esquema de activación de la Vía alternativa del sistema del Complemento**



<sup>13</sup> Waport, M. NEJM; 2001. 344(14): 1058-1066

### **b) Amplificación de la vía alternativa**

Cuando C3b se une a las membranas de bacterias, hongos y parásitos, los mecanismos de regulación que bloquean la amplificación en el estado de reposo no funcionan. El factor C3b sobre estas membranas capta factor B formando el complejo C3bB sobre el que actúa el factor D liberando Ba y quedando el complejo C3bBb que tiene actividad convertasa de C3, siendo Bb la molécula responsable de la actividad proteolítica. Esa convertasa libera más factor C3b que al formar C3bBb3b retroalimenta el circuito y consigue su amplificación.<sup>16</sup>

El complejo C3bBb3b además puede actuar sobre C5 (C3bBb3b es la convertasa de C5 de la vía alternativa) e iniciar la vía lítica que lleva a la lisis de los gérmenes. C3b puede unirse a receptores en la membrana de los fagocitos lo que favorece la fagocitosis. Por otra parte el fragmento C3a, por su actividad de anafilotoxina, activa mastocitos y basófilos, induciendo la liberación de mediadores químicos por parte de estas células, lo que potencia la inflamación.<sup>17</sup>

La properdina (P) es una proteína constituida por 4 subunidades aparentemente idénticas asociadas entre sí de manera no covalente. Este factor se une al complejo C3bBb, que es lábil, dando lugar a C3bBbP que es más estable y así disminuir su degradación y permitir que continúe la cascada del complemento.

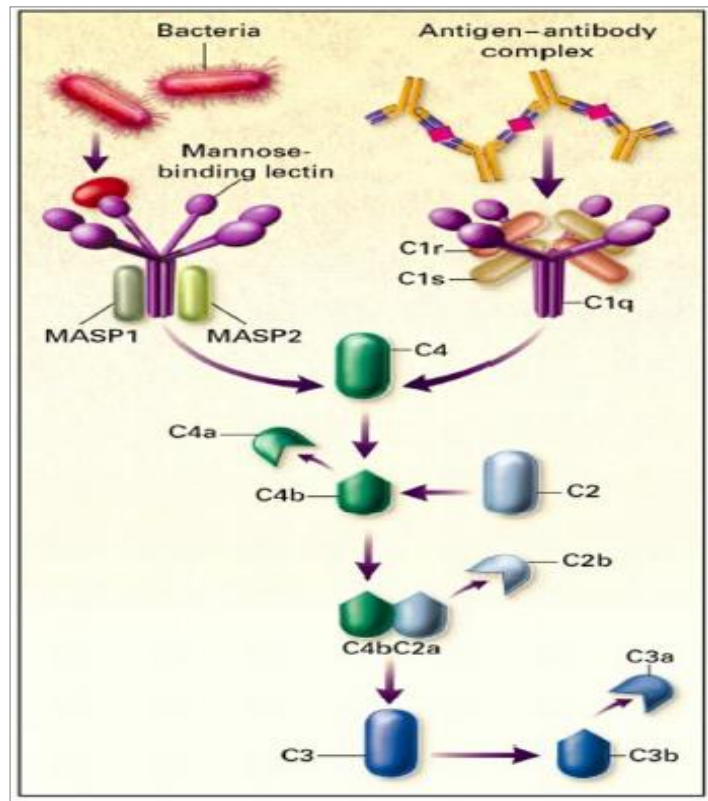
### **C. VÍA DE LA LECTINA**

La vía de la lectina es muy similar a la vía clásica. Se inicia por el enlace de la lectina de unión de manosa (MBL) a la superficie de las bacterias que contiene polisacáridos ricos en este carbohidrato. El enlace de la lectina al patógeno produce la asociación de dos serinas proteasas, MASP-1 y MASP-2 (proteasas de serina asociadas a MBL). MASP-1 y MASP-2 son similares a C1r y C1s, respectivamente y MBL es similar a C1q. La formación del complejo trimolecular MBL/MASP-1/MASP-2 produce la activación de las MASPs y la subsecuente ruptura de C4 en C4a y C4b. El fragmento C4b se enlaza a

la membrana y el fragmento C4a es liberado al medio. Las MASPs activadas también rompen C2 en C2a y en C2b. C2a se enlaza a la membrana en asociación con la C4b, mientras que C2b es liberada al microambiente. El complejo C4bC2a resultante es una C3 convertasa, la cual rompe C3 en C3a y C3b. C3b se enlaza a la membrana en asociación con C4b y C2a, mientras que C3a es liberado al microambiente. El complejo resultante C4bC2aC3b es una C5 convertasa. Con la generación de C5 convertasa concluye la vía de la lectina.<sup>18</sup>

Las actividades biológicas y las proteínas reguladoras de la vía de la lectina son las mismas que las de la vía clásica.

**Figura N° 6. Vía de activación de las lectinas de la Cascada del Complemento**



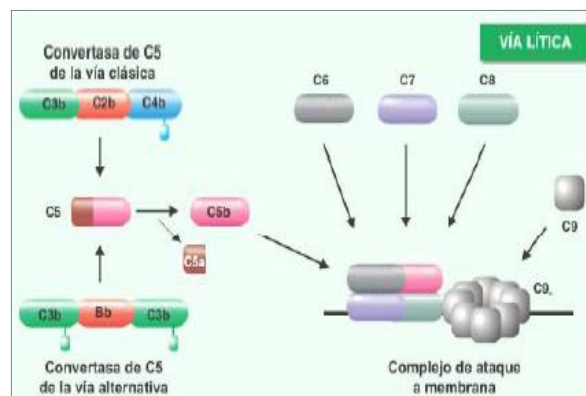
<sup>13</sup> Waport, M. NEJM; 2001. 344(14): 1058-1066

### D. COMPLEJO DE ATAQUE A MEMBRANA (MAC)

Las enzimas convertasas de C5 (C4b2a3b y C3bBb3b), formadas ya sea en la vía clásica o en la alternativa, actúan fijando el factor C5 a C3b, que es escindido por los factores con actividad esterasa en 2 fragmentos, la anafilotoxina C5a, que pasa al medio fluido y el fragmento C5b de mayor peso molecular que se une no covalentemente a C3b. La fracción C5b capta C6 y C7 de la fase fluida, formando un complejo estable C5b67 con actividad quimiotáctica y capacidad de fijación a las membranas.

Si al complejo C5b67 se une la fracción C8, C5b678 es ya citolítico, pues el factor C8 modifica su configuración espacial ofreciendo zonas hidrofóbicas que determinan su inserción en la membrana. Este grupo de moléculas, adquiere la capacidad de interactuar con moléculas de C9 formando el complejo C5b6789. Las moléculas de C9 (en número de 1 a 18) sufren cambios en su configuración, desplegándose y presentando más zonas hidrofóbicas que potencian y aceleran la penetración de este complejo de ataque a la membrana (MAC, Membrane Attack Complex), dando origen a la formación de poros de alrededor de 100 Amstrongs que facilitan la entrada de agua, sodio extracelular y otros iones, con pérdida del potasio y calcio intracelular.<sup>1</sup> El arrastre de sodio permite el paso de agua al interior de la célula y en consecuencia esta célula blanco se hincha y sufre un fenómeno de lisis osmótica.

**Figura N° 7. Vía lítica del Sistema del Complemento**



<sup>16</sup> Schumaker VN, Zavodszky P, Poon PH. Activation of the first component of complement.

## **E. RECEPTORES PARA FACTORES DEL COMPLEMENTO**

Muchas de las funciones del complemento se llevan a cabo tras la unión de fragmentos de algunos factores del complemento a receptores específicos presentes en la superficie de varios tipos de células. Los mejor conocidos son los que tienen como ligando a fragmentos de C3.

El C participa en la regulación de la respuesta inmunológica de tipo humoral. La síntesis de anticuerpos, así como la activación del linfocito B requieren de algunas señales coestimuladoras donde participan el C3d (unido al antígeno) y el complejo CD21-CD19-CD81 (presente en la célula B)

### **a) CR1 (Receptor de complemento tipo 1, CD35).**

Sus ligandos son los fragmentos C3beta, iC3beta y C4beta. Se encuentra sobre todo en las células del sistema fagocítico mononuclear, en los neutrófilos, en los linfocitos T y B y en los eritrocitos. En las células fagocitarias facilita la fagocitosis de partículas opsonizadas por sus ligandos. En los eritrocitos facilita su unión a inmunocomplejos opsonizados por C3beta y C4beta. Estos inmunocomplejos son retirados de la superficie de los hematíes en el hígado y bazo por los fagocitos. De esta forma los hematíes quedan con sus receptores libres para continuar el aclaramiento de inmunocomplejos de la circulación<sup>19</sup>

### **b) CR2 (Receptor de complemento tipo 2, CD21).**

Sus ligandos son C3b, la forma inactiva iC3b y sus fragmentos de degradación C3delta y C3deltagamma. Este receptor se encuentra en las células dendríticas foliculares y en algunas células epiteliales.

El CR2 también se encuentra en las células B formando un complejo trimolecular junto con otras dos proteínas, CD19 y CD81. Este complejo es el llamado correceptor del

linfocito B y envía señales al interior de la célula B que facilitan su respuesta una vez unida al antígeno por su receptor (inmunoglobulina + moléculas Ig-alfa e Ig-beta).

En las células dendríticas foliculares CR2 sirve para atrapar en los centros germinales complejos Ag-Ac opsonizados por iC3beta o C3deltagamma.

El CR2 es el receptor usado por el virus de Epstein-Barr para invadir a las células B. Este virus es el causante de la enfermedad mononucleosis infecciosa y está relacionado con tumores como el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo<sup>5</sup>

**c) CR3 (Receptor de complemento tipo 3, Mac-1, CD11bCD18).**

Se encuentra en fagocitos mononucleares, neutrófilos, células cebadas y NK. La cadena beta de CR3 (CD18) se encuentra en otras dos moléculas (LFA-1 y p150,95). CR3, LFA-1 y p150,95 pertenecen a la familia de las integrinas.

El ligando de CR3 es iC3b por lo que participa en la fagocitosis de partículas opsonizadas por este factor. Pero en los fagocitos y neutrófilos se une también a ICAM-1. Esta molécula se encuentra en los endotelios por lo que facilita el anclaje de fagocitos a las células endoteliales para posteriormente abandonar los vasos por diapédesis.

**d) CR4 (CD11cCD18, p150,95).**

Su ligando es también iC3b y probablemente la función de CR4 es similar a la de CR3. CR4 es abundantemente expresado por las células dendríticas por lo que se usa como marcador para identificarlas.<sup>6</sup>

**F. MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL COMPLEMENTO**

Dado el gran potencial lesivo del sistema del complemento, éste debe de encontrarse estrechamente regulado por diversos mecanismos y moléculas, al objeto de evitar la lisis de las células autólogas del individuo donde asienta. El mecanismo más simple de



regulación es la baja concentración y labilidad de muchos de sus factores, sin embargo existen factores que actúan regulando la cascada del complemento en distintos puntos estratégicos. Los principales puntos de acción de estos factores se encuentran inhibiendo el C1, el C4, el C3 o inhibiendo el MAC.

a) **Inhibición de C1.** En este fenómeno interviene el inhibidor de la C1 esterasa (C1inh) que bloquea la formación de C3b convertasa de la vía clásica por su capacidad de unión y neutralización de los fragmentos C1r y C1s. En los casos de deficiencia en C1inh aparece el edema angioneurótico hereditario, porque el C1 activado degrada elevadas cantidades de C2 produciendo un acúmulo de C2b. Este factor es degradado anormalmente por plasmina, lo que da lugar a C2-Kinina que es un potente vasodilatador y aumenta la permeabilidad vascular produciendo los edemas característicos del cuadro clínico mencionado.<sup>17</sup>

Esta enfermedad es una variante del angioedema, se produce como consecuencia de una deficiencia del inhibidor del primer componente de la cascada del complemento, que se llama C1 inhibidor (C1q). Esta proteína se encarga de inhibir el complemento y otros sistemas de regulación celular. Cuando el C1 inhibidor es deficitario o mal funcionante, se generan moléculas que aumentan la inflamación y la permeabilidad de los vasos dando lugar a la salida de líquidos que se acumulan y provocan edemas.

El angioedema hereditario se produce como consecuencia de un defecto genético: una mutación en el gen del C1 inhibidor que se localiza en el cromosoma 11q11-q13.1. El defecto se transmite a los descendientes con herencia autosómica dominante. Esto quiere decir que si se padece, se transmite a todos los hijos. Es suficiente la existencia del gen anormal en uno de los 22 cromosomas no sexuales, ya sea procedente del padre o de la madre para que se manifieste la enfermedad. También existe una forma de angioedema adquirido causada por el consumo elevado de C1 inhibidor.<sup>21</sup>

**b) Inhibición de C4.** El C4 puede ser inhibido por:

- El factor C4BP (C4-binding protein), que tiene la capacidad de captar C4b facilitando su disociación del complejo C4b2a e inhibiendo, por tanto, la actividad de convertasa de C3.
- El factor I (FI) es una esterasa de tipo serina que circula en forma activada. El C4b disociado es susceptible de ser atacado por el factor I y ser degradado en C4c y C4d.
- Los receptores de membrana DAF (factor acelerador de la degradación) y la MPC (cofactor proteínico de membrana) se encuentran ampliamente distribuidos en células inmunes y no inmunes. Tienen la capacidad de inhibir la unión, facilitar la disociación de C4b y C2a (DAF) o favorecer que el factor C4b pueda ser degradado por el FI (MCP). Estos receptores son de gran importancia en los mecanismos de prevención de lisis de las células autólogas (de la propia persona).

**c) Inhibición de C3.** La regulación de C3, al ser éste el factor central en la activación del complemento, es probablemente el mecanismo de regulación más importante. En este sentido interviene:

- El **factor H** (FH) es una proteína plasmática homóloga que tiene la capacidad de unir C3b en la fase fluida.
- Otro regulador importante es el **Factor I** que ataca entonces C3b liberando una pequeña fracción C3f y convirtiéndolo en iC3b.

Un defecto en este tipo de regulación acontece en un tipo de glomerulonefritis (membranosa tipo II), en la que aparecen autoanticuerpos (factores nefríticos) que se une al complejo C3bBb, estabilizándolo y haciéndolo resistente a la acción de FH. Los receptores de membrana CR1, DAF y MCP actúan sobre el C3b de forma semejante a su actuación sobre C4b: inhiben la unión o facilitan la disociación C3bBb (CR1, DAF) o

actúan como cofactores del factor I en la degradación de C3b unido a la membrana (CR1, MCP). En este caso C3b también se degrada a iC3b, sobre el que el factor I puede seguir ejerciendo su actividad catalítica originando las fracciones C3c y C3d. Todos estos mecanismos inhiben la capacidad de C3b de formar convertasa de C5, así como de que C3b medie la adherencia celular. Sin embargo, C3b sí mantiene la capacidad de adherencia a células fagocíticas por los receptores de estas células para iC3b (CR1, CR3 y CR4).

**d) Inhibición del MAC.** En este sentido actúan:

- La proteína S (vitronectina) es una glucoproteína plasmática con capacidad para unirse al complejo C5b67 impidiendo que éste se una a la membrana celular.
- El CD59 que es una proteína ampliamente distribuida en las membranas celulares que inhibe la inserción de C9 en el complejo C5b-8.
- El factor de restricción homóloga (Homologous Restriction Factor, HRF) también está ampliamente distribuido en la membrana de las distintas células y presenta una función equivalente al CD59.<sup>17</sup>

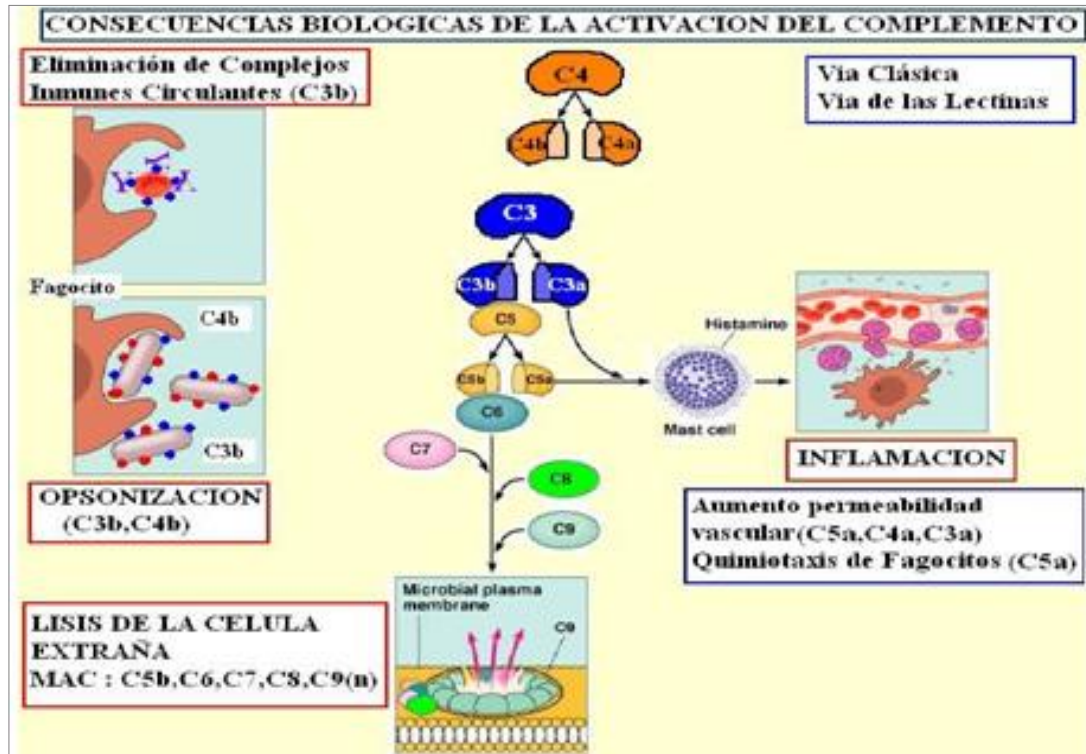
## **G. FUNCIONES DEL COMPLEMENTO**

El complemento posee una gran variedad de funciones, esencialmente dirigidas a la eliminación de microorganismos y que actúan como parte de la respuesta inmune innata o potenciando la acción de los anticuerpos en la respuesta inmune humoral.

Entre las funciones más importantes tenemos las siguientes:

- a) Citolítica,
- b) Anafilotóxica,
- c) Quimiotáctica y
- d) Facilitadora de la fagocitosis (opsonización)

Figura N°8 Funciones del Sistema del Complemento



<sup>16</sup> Schumaker VN, Zavodszky P, Poon PH. Activation of the first component of complement

#### a) Acción citolítica del complemento

Una vez puesta en marcha la cascada del complemento, si se forma el complejo final C5b67, y sobre él se acopla la fracción C8 y moléculas de C9, se produce la lisis de las células sobre cuyas membranas se ha adosado dicho complejo. La lisis se produce por la formación de múltiples poros formados por el complejo C5b6789, entonces este efecto se puede alcanzar por medio de la unión Ag-Ac (vía clásica) o por la activación de gérmenes (vía alternativa). Por uno u otro mecanismo se produce la lisis de gran número de bacterias, tales como *bacteridium*, *salmonella*, *shigella*, *escherichia*, *vibrio*, *treponema* y otras células. Todas estas acciones se agrupan bajo la denominación conocida de citotoxicidad dependiente del complemento.

**b) Acción anafilotóxica del complemento**

Los fragmentos pequeños C3a, C4a y C5a actúan sobre receptores específicos (C3aR, C5aR) y producen respuestas inflamatorias locales similares, y por ello frecuentemente se denominan anafilotoxina (anafilaxis es una respuesta inflamatoria sistémica aguda). C3a y C5a pueden activar mastocitos y basófilos que en consecuencia, liberan mediadores de la inflamación.

Los tres fragmentos inducen la contracción del músculo liso e incrementan la permeabilidad vascular lo que facilita la afluencia de leucocitos y moléculas al foco inflamatorio.<sup>20</sup>

**c) Acción quimiotáctica**

La fracción C5a especialmente y C3a poseen una potente actividad quimiotáctica, que determina la atracción de leucocitos al foco inflamatorio.

**d) Acción facilitadora de la fagocitosis**

Los macrófagos y polimorfonucleares, neutrófilos presentan en sus membranas receptores (CR1, CR3 y probablemente CR4) capaces de unir la molécula C3b y sus derivados resultantes de la activación del complemento. De esta forma, si el C3b está fijado sobre la superficie de un germen, los fagocitos pueden conectar con éste mediante los receptores para C3b, facilitándose así, el fenómeno de la fagocitosis. Esta actividad facilitadora de la fagocitosis se denomina opsonización. La fagocitosis de microorganismos dependiente de C3b e iC3b es probablemente el mayor mecanismo de defensa frente a las infecciones bacterianas.<sup>22</sup>

## H. DEFICIENCIAS CONGENITAS

Las patologías asociadas a deficiencias, ya sean heredadas o adquiridas de alguno de los componentes del complemento ponen de manifiesto la importancia de este sistema. La mayoría de las deficiencias del complemento se transmiten de forma autosómica recesiva con excepción de la deficiencia de C1 inhibidor que lo hace de forma autosómica dominante y del defecto de properdina que se transmite de forma recesiva asociada al cromosoma X.

La expresión clínica de deficiencias de complemento es muy variable, los individuos con deficiencias genéticas de componentes del sistema del complemento tiene una mayor susceptibilidad a infecciones, enfermedades reumáticas, angioedema o pueden permanecer asintomáticos.<sup>23</sup>

Las deficiencias congénitas de los componentes individuales de la vía clásica y alternativa del sistema del complemento, dan lugar a un conjunto de enfermedades de frecuencia relativamente baja. Las personas con deficiencias en estas funciones muestran una susceptibilidad elevada a las infecciones piógenas recurrentes por microorganismos que habitualmente son eliminados por fagocitosis y, en algunos casos, se asocian con enfermedades autoinmunes. Cuando las deficiencias del complemento comprometen la formación del complejo de ataque a la membrana, asociado con la lisis de las bacterias fuera de los fagocitos, los pacientes también tienen aumentado el riesgo de infectarse con *Neisseria*.

Las deficiencias de las vías de activación del sistema de complemento se clasifican en:

### a. Deficiencias de componentes de la vía clásica:

- 1) Deficiencia del componente C1.
- 2) Deficiencia del componente C2.
- 3) Deficiencia del componente C4.

**b. Deficiencias de componentes de la vía alternativa:**

- 1) Deficiencia del factor D.
- 2) Deficiencia de properdina.

**c. Deficiencia de C3.****d. Deficiencias de componentes del complejo de ataque a la membrana (MAC):**

- 1) Deficiencia del componente C5.
- 2) Deficiencia del componente C6.
- 3) Deficiencia del componente C7.
- 4) Deficiencia del componente C8.
- 5) Deficiencia del componente C9.

**a. Deficiencias de componentes de la vía clásica.**

Los pacientes que presentan trastornos congénitos de los componentes C1, C2 ó C4 no pueden activar la vía clásica del complemento; sin embargo, conservan la capacidad para activar la vía alternativa y por consiguiente, el sistema del complemento puede participar en la defensa contra algunas infecciones, particularmente las causadas por microorganismos gramnegativos. La deficiencia de estos componentes de la vía clásica produce regularmente manifestaciones autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES).<sup>24</sup>

## 1) Deficiencia del componente C1:

La deficiencia del primer componente de la vía clásica de activación del complemento es de herencia autosómica recesiva y es el resultado de la ausencia o disminución de los niveles de uno o más de los componentes que forman parte de C1.

La herencia autosómica recesiva se presenta cuando el gen está ubicado en uno de los autosomas (pares de cromosomas 1 a 22). Esto significa que afecta a hombres y mujeres por igual. "Recesivo" significa que para que se presente un determinado rasgo son

necesarias dos copias del gen, uno heredado de la madre y el otro, del padre. Se dice que una persona que tiene sólo un gen recesivo es "portadora" del rasgo o enfermedad; sin embargo, el hecho de "portar" una copia del gen no le ocasiona ningún problema de salud. La mayoría de las personas desconoce que porta un gen recesivo para una enfermedad hasta que tienen un hijo con dicha enfermedad. Una vez que los padres han tenido un hijo con un rasgo o enfermedad recesiva, las probabilidades de que tengan otro hijo con este mismo trastorno son de una en cuatro (o de un 25 por ciento). Esto significa que hay un 75 por ciento de probabilidades de que otro hijo no contraiga este rasgo o enfermedad.<sup>25</sup>

La deficiencia selectiva y completa de C1s se caracteriza por la ausencia de la actividad de CH50 y la actividad funcional de C1 se presenta por debajo del 10 %. Los niveles de C1s se encuentran sumamente bajos, mientras que los niveles de C1r y C1q permanecen normales.

Las deficiencias congénitas de C1q son raras y pueden tener 2 formas de presentación: en unos casos no se produce la molécula y en otros ocurre la síntesis de una proteína defectuosa.

En la deficiencia de C1r/C1s, aunque existe una disminución de la actividad de CH50, los niveles de los componentes C2, C3, y C4 de la vía clásica se mantienen normales. Esta deficiencia se asocia con síndrome de lupus, infecciones piógenas y con shock séptico que puede ser fatal para el paciente.

## 2) Deficiencia del componente C2:

La deficiencia del componente C2 es la deficiencia del sistema del complemento más común, que tiene una incidencia de 1:10000 individuos y sus manifestaciones aparecen tempranamente dentro de los primeros años de la vida. Se conocen 2 formas de esta deficiencia: la homocigótica, con una prevalencia que ha sido calculada en 1 caso por cada 10 000 a 40 000 personas; y la heterocigótica, que se puede encontrar en el 12 % de



la población. Este desorden se presenta tanto de forma autosómica dominante, como recesiva<sup>26</sup>

Aproximadamente el 50 % de los pacientes con esta deficiencia son asintomáticos. No obstante, se ha descrito la asociación con enfermedades autoinmunes como el LES que aparece en más del 50% de estos enfermos; o infecciones piógenas recurrentes, particularmente debido a bacterias encapsuladas como: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo B y *Neisseria meningitidis* . La infección es el modo más común de presentación de esta enfermedad en niños. Esta deficiencia se asocia también con artritis, aterosclerosis e infecciones en el tracto respiratorio, y la meningitis es la complicación más severa de la enfermedad.

Aproximadamente el 25 % de los pacientes con deficiencia de C2 homocigóticos presentan niveles significativamente bajos de IgG2, IgG4, IgD y factor B, mientras que los niveles de IgA e IgG3 se encuentran elevados y los de IgG1 e IgM se mantienen normales, por lo que la deficiencia de C2 se asocia con trastornos en los niveles séricos de inmunoglobulinas como IgA e IgG4, todo lo cual puede contribuir a la elevada susceptibilidad a las infecciones. Otros pacientes presentan niveles disminuidos de IgA e IgG2 y el nivel de IgG3 se mantiene normal. La severidad de esta inmunodeficiencia puede estar influenciada por la deficiencia concomitante de isotipos de inmunoglobulinas.<sup>27</sup>

### 3) Deficiencia del componente C4:

El C4 es un componente no enzimático del sistema del complemento que participa en el paso inicial de activación de la vía clásica y su expresión está determinada por 2 pares de alotipos: C4A y C4B.

Las deficiencias en los alotipos de C4 han sido asociadas con varias enfermedades. Las deficiencias de C4A y C4B, aunque raras en la población humana, constituyen uno de los factores genéticos más fuertes que favorecen el desarrollo de LES. Algunos estudios

han revelado que la deficiencia homocigótica y heterocigótica del componente C4A está presente entre el 40 y 60 % de los pacientes con LES. La deficiencia de C4 ha sido asociada con LES y glomerulonefritis, además de infecciones por *Mycobacterium leprae*.<sup>28</sup>

#### **b. Deficiencias de componentes de la vía alternativa.**

##### 1) Deficiencia del factor D:

La deficiencia del factor D es de herencia autosómica recesiva. Los pacientes con esta deficiencia presentan una elevada susceptibilidad a padecer de infecciones causadas por *Neumococcus*, *Haemophilus* y *Staphilococcus*, así como infecciones severas con *Neisseria meningitidis*. Estos pacientes presentan una capacidad disminuida para opsonizar determinados microorganismos como *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis* que serán fagocitados posteriormente por los neutrófilos, que forman parte de la respuesta inmune innata.

##### 2) Deficiencia de properdina:

La properdina es una de las proteínas reguladoras de la vía alternativa del sistema del complemento liberada por los monocitos. La deficiencia de esta proteína es de herencia recesiva ligada al cromosoma X y altamente heterogénea. Se han identificado 3 fenotipos: el tipo I, caracterizado por la deficiencia completa de la proteína; el II, cuya deficiencia es incompleta, ya que la concentración de la properdina se encuentra en niveles sumamente bajos; y el tipo III, que se caracteriza por un trastorno de la función reguladora de la proteína. Estos 3 fenotipos se asocian con una susceptibilidad aumentada a las infecciones por neisserias, principalmente aquella que provoca enfermedades meningocócicas.<sup>29</sup>

**c. Deficiencia de C3.**

EL componente C3 del sistema del complemento es una glicoproteína multifuncional que actúa recíprocamente con diversas proteínas del suero, con receptores de superficies celulares y con proteínas reguladoras asociadas a membrana.

La deficiencia de este componente da lugar a manifestaciones clínicas más severas y refleja su importante papel en la activación del C5 y en la formación del MAC. En los pacientes con esta inmunodeficiencia, el tercer componente puede estar ausente o solamente disminuido. La gravedad de esta enfermedad depende del grado en que se encuentre comprometida la síntesis de C3. Los pacientes con una deficiencia congénita de C3, cuya herencia es autosómica recesiva, presentan infecciones recurrentes similares a las que tienen los niños con hipogammaglobulinemia. Son frecuentes en estos enfermos las enfermedades causadas por depósitos de inmunocomplejos, entre las que se encuentran el LES y la glomerulonefritis.<sup>30</sup>

**d. Deficiencias de los componentes del MAC.**

## 1) Deficiencia del componente C5:

La deficiencia del componente C5 es un desorden hereditario cuya herencia es autosómica recesiva. En algunos pacientes se ha descrito la deficiencia combinada de los componentes del complemento C4 y C5. Esta deficiencia se caracteriza por la presencia recurrente de meningitis meningocócica y por una elevada susceptibilidad a infecciones gonocócicas diseminadas.<sup>17</sup>

## 2) Deficiencia del componente C6:

La deficiencia del componente C6 es un desorden de patogénesis heterogénea. Está frecuentemente asociada con infecciones severas recurrentes causadas por neiserias, sobre todo *Neisseria meningitidis*<sup>31</sup>

### 3) Deficiencia del componente C7:

La deficiencia de C7 es un desorden autosómico recesivo. La patogénesis de esta deficiencia es heterogénea, la cual está frecuentemente asociada con infecciones bacterianas recurrentes, sobre todo, por *Neisseria meningitidis*.

### 4) Deficiencia del componente C8:

El componente C8 es una proteína compuesta por 3 cadenas (a, b y g), que son codificadas por 3 genes diferentes: C8A, C8B y C8G, respectivamente. La deficiencia del componente C8 es un trastorno heredable de forma autosómica dominante. Constituye el segundo defecto primario del sistema complemento que se presenta con mayor frecuencia. Los pacientes con deficiencia de este componente son generalmente susceptibles a padecer infecciones por neiserias. Algunos de estos pacientes se han complicado con LES.

### 5) Deficiencia del componente C9:

La deficiencia aislada de este componente cursa en muchos casos asintomática, lo que indica que la lisis mediada por el MAC no requiere de este último componente o este no es indispensable para que se lleve a cabo la lisis bacteriana. Esta inmunodeficiencia constituye uno de los desórdenes genéticos más comunes en Japón con una incidencia de 1:1000 individuos<sup>8</sup>. La incapacidad para sintetizar C9 casi no representa un riesgo y solamente se ha descrito una susceptibilidad discreta a los meningococos. En cambio, otros investigadores plantean que el defecto puede representar, más bien, una ventaja, porque reduce el riesgo de padecer esclerosis múltiple, ya que el MAC está involucrado en la patogenia de las lesiones presentes en los pacientes con esta enfermedad.<sup>32</sup>

## **I. DETERMINACIÓN DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL COMPLEMENTO**

La evaluación del Complemento en el laboratorio clínico tiene importancia en diversas situaciones. En el estudio por inmunodeficiencias, se buscan posibles defectos en este sistema, los cuales por lo general consisten en la ausencia o la funcionalidad de alguno de los factores de la cascada, por causas genéticas. En las enfermedades autoinmunes, el Complemento juega un papel importante en la lesión a los tejidos y su determinación puede orientar el diagnóstico, así como ayudar a evaluar el curso y la actividad de la enfermedad. Un ejemplo de lo anterior es el lupus eritematoso sistémico, que tiende a cursar con consumo de los factores del SiC. Finalmente, en diversas formas de vasculitis mediadas por complejos inmunes (o hipersensibilidad tipo III), glomerulonefritis, hepatopatías crónicas y en el rechazo de trasplantes, también puede ser de utilidad evaluar el SiC.

### **a) Alternativas metodológicas**

La evaluación del Sistema de Complemento plantea algunas dificultades, que se originan en la complejidad propia del sistema. La labilidad de sus componentes, su degradación e inhibición por factores reguladores, y la amplificación enzimática que ocurre en varios pasos de la cascada, son algunos ejemplos de los factores que limitan la posibilidad de evaluar el C en una forma simple, cuantitativa y reproducible.

Se han desarrollado métodos para la cuantificación funcional de prácticamente cada componente individual del C. Sin embargo, estos métodos son complejos, por lo que se restringen usualmente a los laboratorios especializados en este campo. La única prueba de carácter funcional sencilla, que se adapta bien a las condiciones de trabajo rutinario, es la cuantificación de la actividad hemolítica del complemento sérico, denominada CH50. Esta técnica proporciona una visión global de la funcionalidad del sistema.

Sin embargo, también posee limitaciones, tales como su baja sensibilidad para detectar disminuciones en el C sérico. Se ha descrito que disminuciones hasta de un 50% en algunos componentes, no se detectan en el resultado final de esta prueba. Por otro lado, la prueba de CH50 evalúa todo el sistema y no provee información acerca de cuál o cuáles factores pueden estar disminuidos.

## **b) Pruebas para la valoración del complemento**

### **1. Fundamento del método de CH50**

La actividad del complemento por lo general se mide determinando la dilución límite del suero, que lisa los eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos de conejo anticarnero (hemosilina). Las titulaciones de complemento de este tipo dan una medida global de la integridad de la vía clásica del complemento y del mecanismo de ataque a la membrana. Los valores se expresan como unidades 50% hemolíticas de complemento por ml (CH50).<sup>33</sup>

Se mide por espectrofotometría la cantidad de hemoglobina liberada que puede relacionarse de manera directa con el número de eritrocitos lisados. La cantidad de lisis en un sistema estandarizado empleando eritrocitos de carnero, anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero y suero humano como fuente de complemento, define una curva sigmoidea, cuando estos valores se grafican contra las cantidades de complemento añadidos. Esta curva presenta una relación lineal en la región intermedia entre el grado de hemólisis y la cantidad de complemento presente. Por tanto, los valores se expresan como unidades 50% hemolíticas de complemento por mL. Una unidad de CH 50% se define como la cantidad o dilución de suero para lisar el 50% de los eritrocitos en la prueba.<sup>34</sup>

## 2. Inmunodifusión radial

La Inmunodifusión se usa para el análisis cualitativo y cuantitativo de antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac) en el suero y otros líquidos corporales. La interpretación del resultado del análisis es el desarrollo de una reacción de precipitación (la formación de un complejo antígeno-anticuerpo insoluble a partir de un complejo antígeno-anticuerpo soluble). Aunque la formación de complejos antígeno-anticuerpo en un medio semisólido como agar depende de los electrolitos del amortiguador, el pH y la temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo.<sup>14</sup>

Las reacciones de Inmunodifusión se pueden clasificar como simples o dobles, en la primera el Ag o el Ac permanecen fijos y el otro reactante se desplaza y se une con él, en la doble Inmunodifusión ambos reactantes se pueden mover uno hacia el otro y precipitar. El movimiento, en cada tipo de Inmunodifusión, puede ser lineal o radial.

En 1965, Mancini introdujo una nueva técnica que empleaba la Inmunodifusión sencilla para la determinación cuantitativa precisa de los antígenos, en el método descrito por Mancini, el área delimitada por el anillo de precipitación era proporcional a la concentración de antígeno, este método de punto final requiere que los anillos de precipitación alcancen el máximo tamaño posible, lo que a menudo requiere de 48 a 72 horas de difusión mientras que, la técnica de J. Fahey permite la medición de los anillos antes de su desarrollo total, en esta modificación el logaritmo de la concentración del antígeno es proporcional al diámetro del anillo.<sup>14</sup>

La técnica de Inmunodifusión radial es una técnica cuantitativa que utiliza un anticuerpo monoespecífico embebido en el gel, soluciones estándar de diferente concentración del Ag y la/s muestra/s a valorar en los pocillos respectivos. Luego de difundir se formará un halo de precipitación cuyo diámetro será proporcional a la concentración antigénica. Se realiza una curva patrón utilizando los estándares y en ella

se interpola el valor de la muestra a valorar, obteniendo así la concentración del Ag en la muestra.<sup>35</sup>

### **3. Método de ELISA**

El método de ELISA es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de la actividad hemolítica total de la vía clásica de activación del complemento en el suero humano.

El procedimiento del ensayo se basa en la activación del complemento en muestras séricas que son aplicadas a una placa de microtitración recubierta de una sustancia activadora del complemento. Tras la complementación de la cascada completa del complemento (del C1 al C9), el C9 finalmente activado se marca usando un anticuerpo monoclonal contra el neoepítotope de C9.

Este anticuerpo C9 se determina por medio de un anticuerpo anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa. Tras la adición de la solución de sustrato, aparece un color. Después de la adición de la solución de parada, el color se transforma de azul a amarillo cuya intensidad es proporcional a la concentración del neoepítotope de C9 que refleja el estado de la activación del sistema de complemento. Por eso, el ensayo corresponde a la determinación de la actividad hemolítica del sistema del complemento (prueba CH50).<sup>36</sup>



### **III. ANTECEDENTES**

La determinación de la actividad hemolítica del complemento mediante Inmunodifusión radial CH50% nos permite obtener resultados más rápidos con respecto a la técnica mediante diluciones en tubos, ya que esta tiene una baja sensibilidad con respecto a la placa de IDR que es del 96.7% y una especificidad del 87.6 %.<sup>37</sup>

Además, los costos para elaborar la prueba de IDR son más bajos ya que no se utiliza tanto reactivo porque en una placa se puede utilizar para varios pacientes mientras que en la técnica de dilución en tubos se realiza una batería de diluciones, se hace por duplicado y es para un solo paciente.

Al realizar la búsqueda de artículos referidos a la estandarización o realización de la prueba de Inmunodifusión radial para determinar la actividad hemolítica total del Complemento CH50%, no fue posible encontrar bibliografía referida al tema, por lo tanto solo se encontró la bibliografía de la casa comercial.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La evaluación del sistema del complemento en el laboratorio, plantea una serie de dificultades que se originan en la misma complejidad del sistema. La alta labilidad de sus componentes, la degradación de los mismos por factores reguladores, la amplificación enzimática que ocurre en algunos pasos de la cascada, son ejemplos de los factores que restringen las posibilidades de evaluar el complemento en una forma simple, cuantitativa y confiable.

En la actualidad, en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS la técnica para la determinación de la actividad hemolítica del complemento por la vía clásica se basa en la prueba de dilución en tubos, la cual ha sufrido transformaciones para mejorar su sensibilidad y especificidad. Aún con las modificaciones realizadas, la prueba es tediosa, complicada y consume una gran cantidad de tiempo, el tiempo promedio necesario para realizar la prueba es de 4 horas, tiempo de trabajo que se duplica en los casos que se debe realizar la confirmación de resultados. Por estas razones, es necesario estandarizar el método de Inmunodifusión radial para mejorar los parámetros de sensibilidad y especificidad analítica.

## V. JUSTIFICACIÓN

La determinación de la actividad hemolítica del complemento (CH50%) se efectuó mediante un macro método que tiene como principio el método de Mayer (1961) donde una unidad de CH50 se define como la cantidad de suero necesario para realizar el 50 % de hemólisis de una suspensión de eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos anti carnero de conejo (hemolisina).

En nuestro país es de mucha utilidad e importancia esta prueba, ya que nos permite evaluar las deficiencias del complemento, procesos infecciosos y enfermedades autoinmunes lo cual conlleva, que estos resultados nos brinden un buen diagnóstico y pronóstico de la enfermedad que se presume, pero esta técnica no es muy utilizada en la actualidad por los laboratorios, debido al empleo de muchos reactivos y materiales, el consumo elevado de tiempo y lo limitado que resulta el número de muestras que se procesan.

Con el fin de realizar un mejor diagnóstico de la actividad hemolítica del complemento, el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS propone estandarizar la prueba de Inmunodifusión radial para determinar la actividad hemolítica total del complemento CH50%, ya que esta técnica acorta el tiempo de ejecución y puede ser utilizada para varios pacientes además que se pueden obtener mejores resultados, esta técnica de IDR permite que la placa se la pueda conservar a 4°C cuando no haya sido utilizada para el sembrado de las muestras mientras que la prueba de dilución en tubos se tiene que realizar en el momento en que llega la muestra, se tiene que realizar las diluciones por duplicado, por lo tanto se gasta más reactivos y se utiliza más tiempo.

Es por esta razón que en el laboratorio debido a la demanda en la rapidez (48 horas) del procesamiento de las muestras y la emisión de los resultados se vio la necesidad de buscar esta técnica para poder evaluar la funcionalidad del total de los componentes de la vía clásica del complemento.

## **VI. OBJETIVOS**

### **A) Objetivo Principal**

- Estandarizar el método de Inmunodifusión Radial para la determinación de la Actividad hemolítica total del Complemento.

### **B) Objetivos Específicos**

1. Determinar, el ajuste de concentración de glóbulos rojos y el título óptimo de hemolisina para la determinación de la actividad hemolítica total del complemento por Inmunodifusión radial (IRD).
2. Optimizar el método de dilución en tubos que se realiza para cuantificar la actividad hemolítica del complemento
3. Determinar el grado de correlación de los resultados obtenidos por IRD y la técnica de dilución en tubo frente a los resultados obtenidos por el método de ELISA (gold estándar).

## **VII. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **A) Tipo de estudio**

El tipo de estudio es transversal - descriptivo.

### **B) Población en estudio**

La población en estudio estaba comprendida por pacientes que asistieron al Instituto SELADIS durante el segundo semestre del año 2010, con algún diagnóstico de enfermedad autoinmune, y que contaban además con una solicitud de determinación de C3 y C4.

Para tal efecto se tomó la muestra de sangre de los pacientes que acudieron al área de toma de muestra durante todas las mañanas del periodo en el que se realizó el estudio.

## **VIII. DESCRIPCION DE LA MUESTRA**

### **A) Tamaño de la muestra**

El tamaño de la muestra estaba comprendido por un total de 45 pacientes de diferentes edades y sexo, con algún diagnóstico de enfermedad autoinmune y además que contaban con una solicitud de la determinación de C3 y C4 en la orden médica que nos permitieron compararlos con la prueba que se ha estandarizado.

### **B) Criterios de Inclusión**

- Pacientes que se realizaron pruebas de C3, C4 y CH50 % en el Instituto SELADIS.
- Pacientes de todas las edades.
- Pacientes que den su consentimiento informado para que con su muestra se realice la determinación de CH50% con el método estandarizado. En el caso de menores de edad dieron el consentimiento informado los padres o apoderados.

### **C) Criterios de exclusión**

- Serán excluidas aquellas muestras que no se encuentren en las condiciones óptimas de toma de muestra (hielo).
- Aquellas muestras hemolizadas.

## **IX. CONTEXTO Y LUGAR**

El presente trabajo fue desarrollado en los ambientes del Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

## **X. MATERIALES Y METODOS**

### **A) MATERIALES**

#### **1) Materiales**

- Vaso de precipitado.
- Probetas de vidrio.
- Tubos de hemólisis.
- Tubos colectores.
- Tips amarillos de 20 – 200uL.
- Tips azules 100 – 1000uL.
- Micropipetas.
- Bandeja de plástico.

#### **2) Equipos**

- Hornilla eléctrica.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (JAPON).
- Baño María SHEL LAB W6M-2 (USA)
- Centrífuga Hettich Zentrifugen (Germany)
- Refrigerador (4 y -20 °C) White Weatinghouse, (USA).
- Estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 99% HR, NUAIRE NU-8500E (USA).
- Lector de ELISA Bio-teck Instruments Inc, ELX800 (USA).
- Refrigerador (4 y -20 °C) White Weatinghouse, (USA).
- Campana de flujo laminar Gelaire BSB-4A, Flow Laboratories, (USA).

### 3) Reactivos

- Barbital.
- Barbital sódico.
- Cloruro de sodio.
- Cloruro de Magnesio 7 H<sub>2</sub>O.
- Cloruro de Calcio.
- Agua destilada.
- Glóbulos rojos de Carnero.
- Hemolisina.
- Alsever.
- Azida de sodio.
- Agarosa.

## B) MÉTODOS

### 1) Producción de hemolisina

La Inmunización es el proceso, natural o artificial, mediante el cual un individuo competente desarrolla una respuesta inmune al entrar en contacto con un inmunógeno. El tipo y magnitud de la respuesta producida se debe a múltiples variables entre ellas se encuentra: la inmunogenicidad de un antígeno, que depende de su complejidad estructural, peso molecular, conformación y naturaleza química, dosis, vía de administración etc.

La aplicación práctica de los antisueros es muy diversa, pues se puede utilizar con fines terapéuticos (inmunización pasiva), en diversos estados infecciosos o tóxicos (neumonía lobar, tétanos, etc.). Además, son útiles en la identificación de microorganismos aislados de procesos infecciosos y en la clasificación taxonómica de diversas especies. También,



han servido como herramienta de trabajo para dilucidar mecanismos inmunológicos básicos (especificidad inmunológica, activación del complemento, fagocitosis, citotoxicidad, etc.) y en la determinación rápida y específica de la naturaleza de diversas sustancias químicas (proteínas, carbohidratos, haptenos, etc).<sup>38</sup>

Para la inmunización del conejo con eritrocitos de carnero se utilizó exclusivamente la vía endovenosa como ser la vena marginal externa de las orejas por ser la más adecuada para realizar la inyecciones. Se administró una serie de 10 inyecciones. Se empezó a inyectar desde la punta de la oreja y cada nueva inyección que se administró se fue avanzando hacia la base de la oreja.

La dosis del antígeno que se aplicó fue de 1 mL por Kg de peso del conejo y la secuencia de los días que se administró el antígeno fue el siguiente:

1º día - 2º - 3º - 4º - 6º - 8º - 10º - 13º - 15º y 17º

Al término de la secuencia de las inyecciones se dejó descansar al animal durante una semana y se procedió a realizar la sangría del conejo mediante la punción cardiaca donde se le extrajeron de 15 a 20 mL de sangre. Se colocó la muestra en tubos colectores y se esperó la formación del coagulo. Seguidamente se centrifugó a 3000rpm durante 20 minutos. Se midió el volumen del suero (hemolisina) obtenido para luego mezclarlo con la misma cantidad de glicerina p.a. (relación v/v), Para los experimentos posteriores se tomo en cuenta esta dilución “1:2 en glicerina”, por lo tanto hay que multiplicar por la dilución.

Posteriormente se realizó 6 diferentes protocolos para la titulación óptima de la hemolisina utilizando un suero normal, es decir que tenga valores de C3 y C4 normales (C3 de 70-176 mg/dL y C4 de 20-40 mg/dL), para esto se realizó el protocolo de la prueba de CH50% que se explicará posteriormente. Para este proceso se evaluaron diferentes diluciones de la hemolisina (1/1000, 1/500; 1/250, 1/200: 1/150 y 1/100) y se evaluó diferentes diluciones (1/20, 1/30 y 1/40) del suero control utilizado (Ver Tabla N°1).

**Tabla N°1. Protocolos evaluados para determinar los títulos óptimos de la hemolisina y del suero control de la prueba de CH50% por el método en tubo.**

| PROTOCOLO | DILUCIÓN DE HEMOLISINA | DILUCIÓN DEL SUERO CONTROL |
|-----------|------------------------|----------------------------|
| 1         | 1/1000                 | 1/20<br>1/30<br>1/40       |
| 2         | 1/500                  | 1/20<br>1/30<br>1/40       |
| 3         | 1/250                  | 1/20<br>1/30<br>1/40       |
| 4         | 1/200                  | 1/20<br>1/30<br>1/40       |
| 5         | 1/150                  | 1/20<br>1/30<br>1/40       |
| 6         | 1/100                  | 1/20<br>1/30<br>1/40       |

**2) Protocolo de realización de la prueba de CH 50% mediante diluciones en tubo.**

**a) Preparación de la suspensión de glóbulos rojos de carnero**

Se tomó la muestra de 20 mL de sangre de carnero (*Ovis Aries*) mediante punción en la región de la yugular interna del carnero, luego la muestra obtenida fue colocada en un envase que contenía el mismo volumen de anticoagulante Alsever (Ver Anexos) o ACD y se mezcló bien para evitar la formación de coágulos, luego se colocó perlas de vidrio para la desfibrinización posteriormente se colocó 0.5 mL de gentamicina y 0.5 mL de eritromicina

Se alicuotó la muestra en tubos colectores en una campana de flujo laminar para evitar contaminación y se guardó a 4°C hasta su utilización. Cada vez que se requirió el uso de una alícuota se filtró en gasa estéril y se lavó los eritrocitos de 3 a 4 veces con solución salina (NaCl 0.9%), una vez que en el sobrenadante se evidenció la ausencia de hemólisis se realizó una dilución de los glóbulos rojos de carnero (GRc) lavados al 3% utilizando como diluyente tampón barbital (ver Anexos) para luego realizar el ajuste de concentración celular.

#### **b) Ajuste de concentración celular de los GRc por espectrofotometría**

Para realizar el ajuste de la concentración celular de los GRc por espectrofotometría, se colocó en una cubeta de espectrofotómetro de 2 mL, 1,8 mL de agua destilada con 0.2 mL de la suspensión preparada anteriormente, se mezcló por inversión para que los glóbulos rojos se hemolicen y se realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. El rango de densidad óptica deseado estaba entre 0,498 a 0,502. Si la DO era mayor a 0.502 se añadió buffer barbital para diluir la muestra y si la DO obtenida era menor se añadió glóbulos rojos lavados.

#### **c) Sensibilización de glóbulos rojos de carnero**

Se preparó una solución V/V de la suspensión de glóbulos rojos de cordero ajustada con la dilución de la hemolisina a titular. Por ejemplo se preparó 5 mL de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con 2.5 mL de la solución de eritrocitos ajustados y 2.5 mL de la hemolisina con el título a evaluar, el diluyente utilizado para todos los casos fue el tampón barbital. Luego, se incubó la mezcla durante 30 minutos a 37°C.

**d) Preparación de la batería de diluciones en tubo para realizar la prueba de CH50%**

Se realizó diluciones seriadas según se muestra en la Tabla N°2, todo este procedimiento se realizó por duplicado y para evitar que los componentes termolábiles del Complemento pierdan actividad se trabajó a 4°C, para lo cual se colocó la gradilla de tubos sobre una bandeja que contenía hielo picado. Esta fase se evaluó con todas las diluciones de la hemolisina y el suero control con la finalidad de encontrar los títulos óptimos de uso de estos reactivos biológicos.

En la tabla N°2 se muestran las cinco diluciones de las muestras donde los tubos 6 y 7 corresponden a los controles negativo (0%) y positivo (100%) de hemólisis respectivamente.

**Tabla N°2 Protocolo de las diluciones seriadas de las muestras, controles positivo y negativo para la determinación de CH50% por el método de dilución en tubo**

| TUBO                       | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6   | 7    |
|----------------------------|-----|------|------|------|------|-----|------|
| Tampón barbital            | 1.1 | 1.05 | 1.0  | 0.9  | 0.8  | 1.2 | ---- |
| H <sub>2</sub> O destilada | --- | ---  | ---  | ---  | ---  | --- | 1.2  |
| Suero 1/30*                | 0.1 | 0.15 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | --- | ---  |

\*Representa la dilución 1/30 del suero que estaba en evaluación.

Luego de realizar las diluciones seriadas, se incubó los tubos 60 minutos a 37°C, mezclando cada 15 minutos para garantizar una correcta sensibilización. Para detener la reacción se colocó los tubos a 4°C (se colocó la gradilla sobre una bandeja en agua con

hielo) inmediatamente después de realizar la incubación de 1 hora, a cada tubo se adicionó 3 ml de amortiguador barbital frío (4°C). Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 2500 rpm y se leyeron las absorbancias a 540 nm usando como blanco buffer barbital.

#### **e) Cálculo de resultados de la prueba de CH50%**

Se realizó los cálculos tomando en cuenta los siguientes parámetros: se utilizó el tubo 6 (Control negativo) para hacer auto cero ya que representaba el 0% de hemólisis y la absorbancia del tubo 7 (Control positivo) que representa el 100% de hemólisis. Luego, se calculó mediante regla de tres simple el porcentaje de hemólisis de cada tubo con respecto al control positivo. Para obtener las unidades hemolíticas del SiC, se graficó en un papel semi logarítmico tomando en cuenta los dos tubos que estaban más próximos (por encima y por debajo) del 50% de lisis (ver Anexos) y se trazó una línea recta para encontrar la dilución exacta en la cual se obtendría el 50% de hemólisis.

Los valores de referencia son de 150 a 250 UH/mL (referencia del Lab. de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS)

### **3) Método de ELISA para la determinación de CH100% (marca Human)**

#### **a) Preparación de reactivos:**

- Se colocó el diluyente (DIL) y los reactivos liofilizados sobre hielo antes de preparar los calibradores y las diluciones del control.
  
- Se sacó los otros componentes para realizar la técnica para que puedan alcanzar la temperatura ambiente antes del uso. Se almacenó el sustrato (SUB) protegido de la luz.

- No se utilizó recipientes de poliestireno en la manipulación del conjugado [CON].
- Se efectuó la reconstitución, sobre hielo antes del uso del control positivo [PC] con 2.5 mL del diluyente helado, girando cuidadosamente de vez en cuando durante 20 min., se evitó la formación de espuma. NO AGITAR MECANICAMENTE.
- Se reconstituyó el calibrador 4 (S4) de 200 U/ml con exactamente 1,5 ml de diluyente helado, girando cuidadosamente de vez en cuando durante 20 min., se evitó la formación de espuma. NO AGITAR MECANICAMENTE.

Se preparó los calibradores S1 a S3 sobre hielo diluyendo S4 (200 U/ml) con diluyente helado:

0,5 ml S4 + 0,5 ml (DIL): S3 (100 U/ml),

0,5 ml S3 + 0,5 ml (DIL): S2 (50 U/ml),

0,5 ml S2 + 0,5 ml (DIL): S1 (25 U/ml).

- No se reutilizó los Calibradores S1 a S4 y [PC] ya preparados.
- Se diluyó 1 parte de (WASH 20x) con 19 partes de agua destilada. [WASH] es estable por 6 semanas si se almacena de 2° a 8°C.

#### **b) Muestras**

- Una vez que se tomaron las muestras de los pacientes, se separó el suero y se guardó en alícuotas a -20°C, cada alícuota se descongeló una sola vez. No se

utilizó muestras séricas inactivadas por tratamiento de calor a 56°C o muestras que habían sido conservadas por más de 24 horas a 4°C.

- Se trabajó los sueros sobre hielo para evitar una activación del complemento in vitro.
- Se diluyó los sueros 1:51 sobre hielo con tampón de dilución [DIL] helado inmediatamente antes de comenzar la prueba (mezclar 10 µl de suero con 0,5 ml de [DIL]).

**c) Procedimiento**

- Se pipeteó 100 µl de suero diluido, calibradores y control positivo en los pozos correspondientes, para el blanco se utilizó [DIL] en lugar de la dilución del suero, se cubrió con tira adhesiva todos los pozos.
- Se incubó 1 hora a 37°C.
- Se desechó la solución de los pozos y se lavó por 3 veces utilizando 300 µl de [WASH] por pocillo.
- Se desechó la solución de lavado y se secó en un papel absorbente
- Se pipeteó 100 µl de [Anti-C9] y se cubrió con la tira adhesiva.
- Se incubó 1 hora a 37°C.
- Se desechó la solución de los pozos y se lavó por 3 veces utilizando 300 µl de [WASH] por pocillo.
- Se desechó la solución de lavado y se secó en un papel absorbente
- Se pipeteó 100 µl de conjugado [CON] y se cubrió con tira adhesiva.
- Se incubó 1 hora a T°A.
- Se desechó la solución de los pozos y se lavó por 3 veces utilizando 300 µl de [WASH] por pocillo.
- Se desechó la solución de lavado y se secó en un papel absorbente
- Se pipeteó 100 µl de sustrato [SUB] y se incubó por 10 min a temperatura ambiente superior a 25°C

- Se agregó 100 µl de [STOP] por pocillo.  
Leer la absorbancia a 450 nm dentro de los 10 min. siguientes a la adición de la solución de parada.
- Para obtener los resultados se realizó una gráfica de los calibradores y sus densidades ópticas en un papel milimetrado, para poder así interpolar las lecturas de las muestras y los valores se obtienen en unidades por mililitro U/mL
- El rango de referencia es de 40 a 200 U/mL

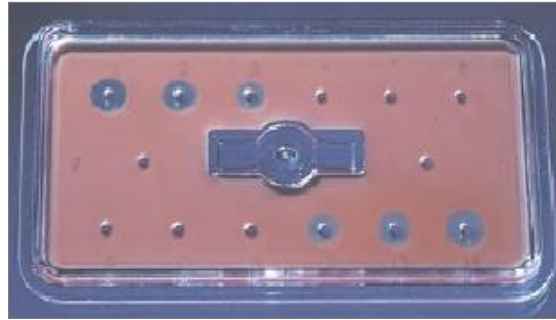
#### **4) Preparación de placas de Inmunodifusión radial para la determinación de la actividad hemolítica total del Complemento**

- Se preparó 4.8 mL de agarosa al 2% usando como diluyente buffer barbital y se llevó a una hornilla para disolverla completamente, luego se agregó 6 mL de buffer atemperado a 45°C, para evitar que se gelifique, el agar se mantuvo en incubación en baño María hasta el momento del plaqueado. Se agregó 800 uL de glóbulos rojos de carnero sensibilizados (con el título de la hemolisina a evaluar) precalentados a 45°C, se mezcló suavemente por agitación y se agregó como conservante 50 uL de azida de sodio 0.01%.
- Se vació 11.5 mL de la mezcla anterior en las placas de Inmunodifusión, tratando de que se forme una superficie lisa y uniforme y se esperó que gelifique a T°A.
- Una vez gelificada la agarosa se realizó horadaciones con saca bocados de 3 mm de diámetro con una capacidad de 5 uL.
- Se preparó tres placas con cada una de las diluciones de la hemolisina que se estaban evaluando (1/1000; 1/500; 1/250; 1/200; 1/150 y 1/100) y con diferentes concentraciones de glóbulos rojos (3%, 5% y ajuste de la densidad óptica 0.500).



- Se colocó en la parte central un pequeño algodón húmedo que servirá como cámara húmeda.
- Una vez preparadas las placas de IDR se procedió a realizar la curva de calibración mediante la utilización de un control con actividad hemolítica total proveniente del Kit comercial de IDR que determina la actividad del Complemento hemolítico total (Binding site-UK)
- Para utilizar los calibradores se reconstituyó los viales con 1.5 mL de agua tri-distilada fría con el volumen indicado en la etiqueta del vial. Se preparó una dilución  $\frac{1}{2}$  mezclando 100 uL de calibrador con 100 uL de solución fisiológica fría y una dilución  $\frac{1}{4}$  mezclando 100 uL de calibrador con 300uL de suero salino frío.
- El reactivo liofilizado de control de la actividad hemolítica total del Complemento provisto por el Kit, se reconstituyó con 1.2 mL de agua tri-distilada fría, se mezcló suavemente por inversión hasta su disolución. Todos los controles y calibradores fueron alicuotados y guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.
- Los controles, calibradores y muestras antes de ser sembrados en el gel de agarosa preparado para IDR se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Se sembró 5 uL de las muestras en evaluación (con concentración de C3 y C4 conocidas y niveles de CH100% conocidos por el método de ELISA), de los controles y de los calibradores en los pozos destinados para ese fin (ver figura N°9) y se incubaron las placas de cada uno de los protocolos en evaluación que se muestran en la tabla N°3. Terminado el periodo de incubación de cada sistema experimental se procedió a leer el diámetro del halo de difusión de las muestras y controles mediante el uso de una regla específica para este fin.

**Figura N°9 Placa de Inmunodifusión radial con pozos para el sembrado de las muestras, controles y calibradores**



- Una vez obtenidos los diámetros de los halos se interpolaron sobre papel semi logarítmico proporcionado por el Kit comercial Binding Site, colocando en el eje “Y” el diámetro de los halos formados de los 3 calibradores y en el eje “X” el porcentaje de actividad del complemento que son 100, 50 y 25 %, los tres puntos deben unirse para formar una línea recta, donde se pueden interpolar las muestras y los controles y después estos se los puede convertir a CH100 unidades/mL
- Los valores de referencia son de 5.58 a 8.34 mm de diámetro del halo.

**5) Estandarización de la prueba de Inmunodifusión radial que mide la actividad hemolítica total del complemento CH100%**

Para poder estandarizar la técnica de IDR se tomaron en cuenta varios parámetros como ser: el ajuste de concentración celular de los glóbulos rojos, ya que en algunos protocolos toman en cuenta diferentes porcentajes de glóbulos rojos de carnero <sup>44</sup>. También, en el presente trabajo se analizó si la dilución de hemolisina utilizada en la prueba de dilución en tubos podía ser utilizada en la prueba de IDR

En el proceso de estandarización de la prueba se tomó en cuenta diferentes parámetros, como ser el tiempo y la temperatura de pre- incubación de la muestra sembrada en el gel de agarosa a 37°C<sup>37</sup> por 30 minutos y una incubación final a temperatura ambiente por 48 horas y por otro lado la pre-incubación de las muestras sembradas a temperatura ambiente y una incubación final de 48 horas a temperatura ambiente<sup>40</sup>. Dentro de todo este proceso de la estandarización se trabajó con un suero normal que fue alicuotado en tubos Eppendorff y guardado a -20°C hasta el momento de su utilización.

**Tabla N°3. Protocolos de trabajo para estandarizar la técnica de Inmunodifusión radial que mide la actividad hemolítica total del Complemento tomando en cuenta varios parámetros.**

| PROTOCOLO | AJUSTE DE GLÓBULOS ROJOS DE CARNERO | DILUCIÓN DE LA HEMOLISINA | TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL SUERO | TIEMPO Y TEMPERATURA DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON EL SUERO |
|-----------|-------------------------------------|---------------------------|---|--|
| 1         | 3%<br>5%<br>*Ajustados a 0.500      | 1/100<br>1/150<br>1/200   | 30 minutos a 37°C                               | 48 horas a T°A   |
| 2         | 3%<br>5%<br>*Ajustados a 0.500      | 1/100<br>1/150<br>1/200   | T°A   | 48 horas a T°A   |
| 3         | 3%<br>5%<br>*Ajustados a 0.500      | 1/100<br>1/150<br>1/200   | 30 minutos a 37°C                               | 18 horas a T°A   |
| 4         | 3%<br>5%<br>*Ajustados a 0.500      | 1/100<br>1/150<br>1/200   | T°A   | 18 horas a T°A   |
| 5         | 3%<br>5%<br>*Ajustados a 0.500      | 1/100<br>1/150<br>1/200   | 30 minutos a 37°C                               | 48 horas a 4°C   |
| 6         | 3%<br>5%<br>*Ajustados a 0.500      | 1/100<br>1/150<br>1/200   | T°A   | 48 horas a 4°C   |

\*Se utiliza glóbulos rojos de carnero ajustados a la densidad óptica de 0.500 en espectrofotómetro.

### **6) Determinación de la reproducibilidad del estudio**

Para determinar el grado de reproducibilidad del presente estudio se evaluaron tres muestras diferentes con concentraciones de C3 y C4 conocidas las cuales fueron alicuotadas en tubos Eppendorf en un volumen de 10 uL y guardadas a -20°C hasta el momento de su uso. Para la determinación de la reproducibilidad de las muestras, se descongelaron y procesaron las tres muestras bajo las mismas condiciones de trabajo pero en diferentes tiempos con un intervalo de 48 horas cada experimento. Este procedimiento se realizó para determinar la desviación estándar y el coeficiente de variación del ensayo.

### **7) Determinación de la repetitividad del estudio**

Para determinar el grado de repetitividad del estudio se evaluaron tres muestras diferentes con valores de C3 y C4 con valores normales que fueron alicuotadas en tubos Eppendorf en un volumen de 10uL y fueron guardadas a -20°C hasta el momento de su uso. Para la determinación de la repetitividad de las muestras se descongelaron y procesaron bajo las mismas condiciones las cuales fueron sembradas por triplicado en el mismo día, en el gel ya preparado para la técnica de Inmunodifusión radial. Este procedimiento se realizó para determinar la desviación estándar, el promedio y el coeficiente de varianza.

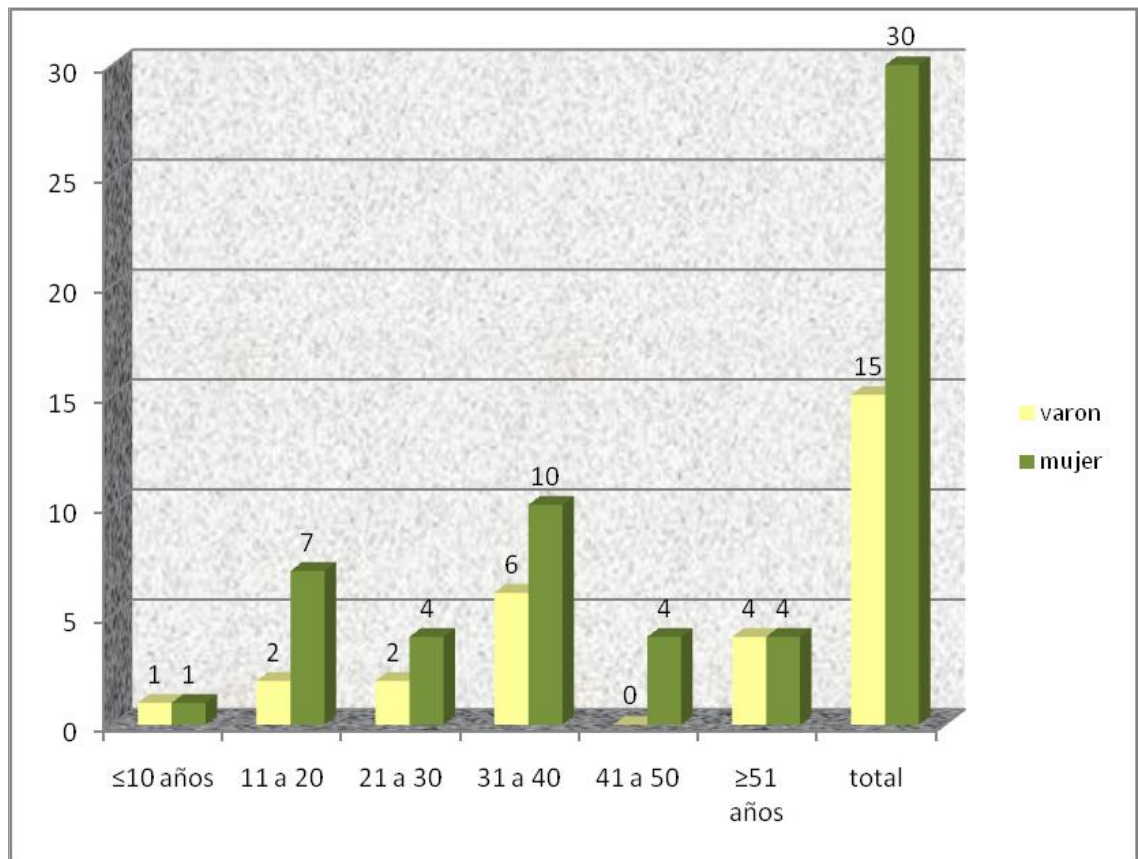
### **8) Realización del Control de Calidad de la prueba de IDR**

Se utilizó un pool de sueros constituidos por 10 muestras que tenían valores de C3, C4 por IDR y CH100% por ELISA normales. Cada día y durante el tiempo en el que se procesa las muestras, se sembró el pool de sueros en las placas preparadas de IDR, de esta manera los controles, muestras y pool fueron evaluados bajo las mismas condiciones.

## XI. RESULTADOS

Para la estandarización y determinación del grado de correlación de la prueba de Inmunodifusión radial que mide la actividad hemolítica total del complemento se estudiaron 45 muestras de suero de pacientes tanto del sexo femenino como masculino. Para su mejor comprensión, las edades de los pacientes fueron agrupadas en rangos. En el gráfico N°1, se observa que la mayoría de los sueros utilizados en el presente estudio provenían de pacientes comprendidos en el rango del 31 a 40 años y que el 66,7% de todos los pacientes eran mujeres.

**Gráfico N°1. Distribución según sexo y edad de los pacientes cuyos sueros fueron utilizados para la estandarización de la prueba de IDR que mide la actividad hemolítica total del Complemento.**



**A) Estandarización de la prueba de Inmunodifusión radial que mide la actividad hemolítica total del complemento CH100%**

En la Tabla N°4 A se observa que cuando se utiliza la hemolisina diluida a título 1/150 y los glóbulos rojos de carnero ajustados a 0.500 de densidad óptica con un periodo de pre incubación previo de 30 minutos a 37°C antes de realizar la incubación definitiva por 48 horas a T°A, son las que permiten obtener halos de difusión bien definidos y resultados que correlacionan mejor con los valores conocidos de C3, C4 y CH100%.

**Tabla N°4 A. Protocolo N°1 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero pre- incubadas a 37°C por 30 minutos e incubados luego a T° A por 48 horas.**

| PROTOCOLO N° 1            |                          |     |       |   |  |
|---------------------------|--------------------------|-----|-------|---|--|
| DILUCIÓN DE LA HEMOLISINA | AJUSTE DE GLÓBULOS ROJOS |     |       | TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL SUERO | TIEMPO Y TEMPERATURA DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON EL SUERO |
|                           | 3%                       | 5%  | 0.500 |   |  |
|                           | Diámetro del halo        |     |       |   |  |
| 1/200                     | 4.85                     | 4.4 | 5.3   | 30 minutos a 37°C                               | 48 horas a T°A   |
| 1/150                     | 5.75                     | 5.3 | 7.3   | 30 minutos a 37°C                               | 48 horas a T°A   |
| 1/100                     | 5.3                      | 5.3 | 5.75  | 30 minutos a 37°C                               | 48 horas a T°A   |

En la Tabla N°4 B. Se observa que cuando las muestras de suero después de sembradas en la placa de IDR son directamente incubadas por 48 horas a T°A, si bien se obtiene los halos de difusión, pero éstos no tenían bordes bien definidos lo cual dificultaba su visualización. También, se evidenció que si se comparan los resultados obtenidos en la tabla N° 4A estos son sistemáticamente más bajos.

**Tabla N°4 B. Protocolo N°2 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero incubadas a temperatura ambiente por 48 horas.**

| PROTOCOLO N° 2            |                          |      |       |  |
|---------------------------|--------------------------|------|-------|--|
| DILUCIÓN DE LA HEMOLISINA | AJUSTE DE GLÓBULOS ROJOS |      |       | TIEMPO Y TEMPERATURA DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON EL SUERO |
|                           | 3%                       | 5%   | 0.500 |  |
|                           | Diámetro del halo        |      |       |  |
| 1/200                     | 4                        | 4.4  | 4.85  | 48 horas a T°A   |
| 1/150                     | 4.4                      | 4.85 | 6.25  | 48 horas a T°A   |
| 1/100                     | 4.85                     | 5.3  | 5.3   | 48 horas a T°A   |

En la Tabla N°4 C. Se observa que cuando las muestras de suero una vez sembradas en la placa de IDR son pre-incubadas por 30 minutos a 37 °C antes de realizar la incubación definitiva por 18 horas a T°A, el halo obtenido no tenía bordes bien definidos debido al tiempo de incubación que no era suficiente lo cual dificultaba su visualización y determinación del diámetro correspondiente. También, se evidenció al igual que el caso anterior que los resultados obtenidos eran sistemáticamente más bajos que los obtenidos en el protocolo 1.

**Tabla N°4 C. Protocolo N°3 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero pre- incubadas a 37°C por 30 minutos e incubados luego a Temperatura ambiente por 18 horas.**

| PROTOCOLO N° 3            |                          |      |       |   |  |
|---------------------------|--------------------------|------|-------|---|--|
| DILUCIÓN DE LA HEMOLISINA | AJUSTE DE GLÓBULOS ROJOS |      |       | TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL SUERO | TIEMPO Y TEMPERATURA DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON EL SUERO |
|                           | 3%                       | 5%   | 0.500 |   |  |
|                           | Diámetro del halo        |      |       |   |  |
| 1/200                     | 4                        | 4.4  | 4.4   | 30 minutos a 37°C                               | 18 horas a T°A   |
| 1/150                     | 4.4                      | 4.85 | 5.3   | 30 minutos a 37°C                               | 18 horas a T°A   |
| 1/100                     | 4.85                     | 4.85 | 4.85  | 30 minutos a 37°C                               | 18 horas a T°A   |



En la Tabla N°4 D. Se observa que cuando las muestras de suero después de sembradas en la placa de IDR son directamente incubadas por 18 horas a T°A, el halo obtenido no tenía bordes bien definidos lo cual dificultaba su visualización y determinación del diámetro correspondiente. También, se evidenció al igual que en los dos casos anteriores que los resultados obtenidos eran sistemáticamente más bajos que los obtenidos en el protocolo 1

**Tabla N°4 D. Protocolo N°4 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero incubadas a Temperatura ambiente por 18 horas.**

| PROTOCOLO N° 4            |                          |      |       |  |
|---------------------------|--------------------------|------|-------|--|
| DILUCIÓN DE LA HEMOLISINA | AJUSTE DE GLÓBULOS ROJOS |      |       | TIEMPO Y TEMPERATURA DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON EL SUERO |
|                           | 3%                       | 5%   | 0.500 |  |
|                           | Diámetro del halo        |      |       |  |
| 1/200                     | 4                        | 4    | 4.4   | 18 horas a T°A   |
| 1/150                     | 4.4                      | 4.85 | 5.3   | 18 horas a T°A   |
| 1/100                     | 4.4                      | 4.4  | 4.85  | 18 horas T°A   |

Se observa que cuando las muestras de suero una vez sembradas en la placa de IDR son pre-incubadas por 30 minutos a 37 °C antes realizar la incubación definitiva por 48 horas a 4°C, el halo obtenido tenía bordes bien definidos pero que los diámetros de los halos de difusión eran más bajos que los obtenidos en el protocolo 1.

**Tabla N°4 E. Protocolo N°5 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero pre- incubadas a 37°C por 30 minutos e incubados luego a 4°C por 48 horas.**

| PROTOCOLO N° 5            |                          |      |       |   |  |
|---------------------------|--------------------------|------|-------|---|--|
| DILUCIÓN DE LA HEMOLISINA | AJUSTE DE GLÓBULOS ROJOS |      |       | TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL SUERO | TIEMPO Y TEMPERATURA DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON EL SUERO |
|                           | 3%                       | 5%   | 0.500 |   |  |
|                           | Diámetro del halo        |      |       |   |  |
| 1/200                     | 4                        | 4.4  | 4.85  | 30 minutos a 37°C                               | 48 horas a 4°C   |
| 1/150                     | 4.4                      | 4.85 | 5.75  | 30 minutos a 37°C                               | 48 horas a 4°C   |
| 1/100                     | 4.4                      | 4.4  | 4.85  | 30 minutos a 37°C                               | 48 horas a 4°C   |

En la Tabla N°4 F. Se observa que cuando las muestras de suero después de sembradas en la placa de IDR son directamente incubadas por 48 horas a 4°C, el halo obtenido no tenía bordes bien definidos, era más difícil determinar los diámetros de los halos y que de los halos de difusión eran más bajos que los obtenidos en el protocolo 1.

**Tabla N°4 F. Protocolo N°6 en el cual se evaluaron diferentes diluciones de hemolisina y de concentración de glóbulos rojos de carnero incubadas por 48 horas a T°A.**

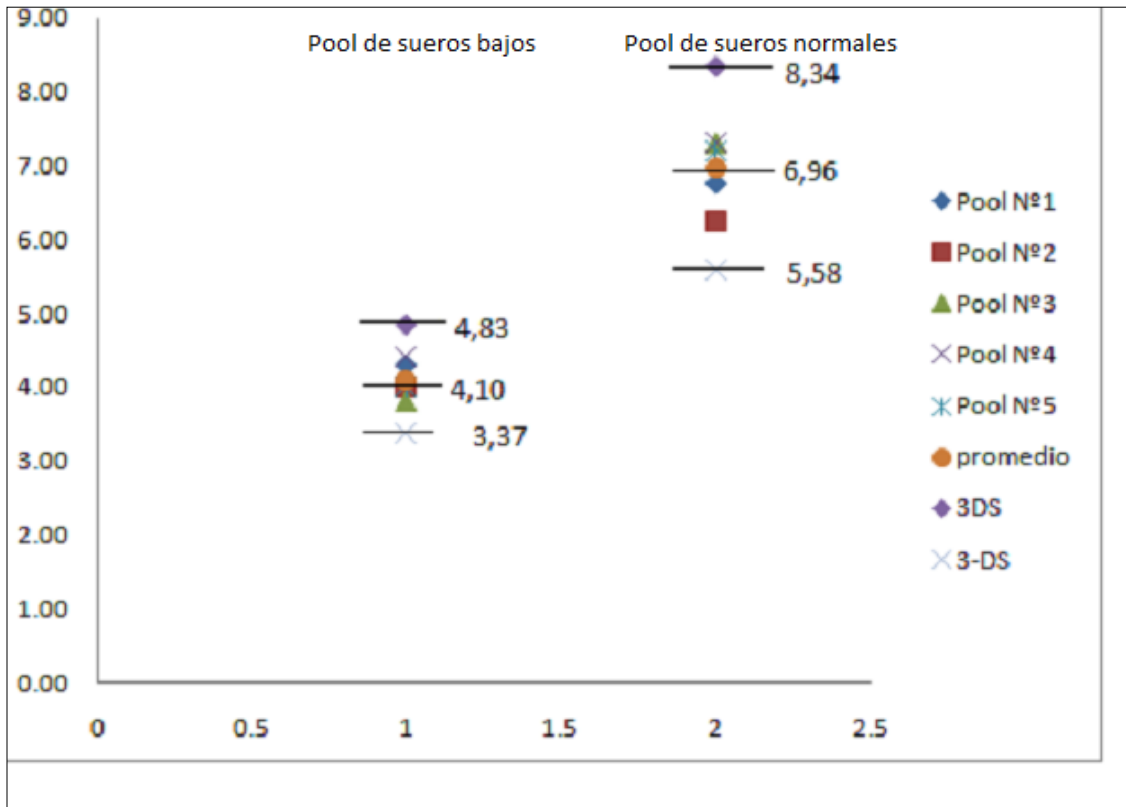
| PROTOCOLO N° 6            |                          |      |       |  |
|---------------------------|--------------------------|------|-------|--|
| DILUCIÓN DE LA HEMOLISINA | AJUSTE DE GLÓBULOS ROJOS |      |       | TIEMPO Y TEMPERATURA DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON EL SUERO |
|                           | 3%                       | 5%   | 0.500 |  |
|                           | Diámetro del halo        |      |       |  |
| 1/200                     | 4                        | 4.4  | 4.85  | 48 horas a 4°C   |
| 1/150                     | 4.4                      | 4.85 | 5.25  | 48 horas a 4°C   |
| 1/100                     | 4.4                      | 4.85 | 4.85  | 48 horas a 4°C   |

**a. Determinación del Promedio y Desviación estándar para la obtención del rango de referencia de la técnica de Inmunodifusión radial**

Una vez estandarizadas las condiciones de preparación de las placas de Inmunodifusión radial para la determinación de la actividad hemolítica total del Complemento, se utilizó 10 pool de sueros constituidos por tres sueros cada uno. Cinco de ellos tenían valores bajos para C3, C4 por IDR y CH100% por ELISA y los otros cinco tenían valores normales para las pruebas antes mencionadas.

En el Grafico N°2, se puede observar los valores del promedio de las muestras de pacientes con actividad hemolítica total del complemento bajo que es de 4,1 siendo el límite extremo de +3DS de 4,83 mm de diámetro. Los valores del promedio de las muestras de pacientes con actividad hemolítica total del complemento normal son de 6,96 siendo el límite extremo de -3DS de 5,58 mm de diámetro. Estos hallazgos nos muestran que la zona de duda “gris” estaría comprendida entre los valores de 4,84 a 5,57 milímetros de diámetro.

**Grafico N°2 Determinación de los puntos de cohorte que permiten diferenciar los niveles bajos, normales y altos de la actividad hemolítica total del complemento.**



**B) Determinación de la repetitividad y reproducibilidad de la prueba de IDR que determina la actividad hemolítica total del Complemento**

Una vez estandarizada la prueba y determinado los valores de cohorte de la misma, se procedió a evaluar los 45 sueros de pacientes en estudio. En cada ensayo realizado, además de sembrar los calibradores, el control, el pool (control de calidad), se sembró tres sueros por triplicado para determinar la reproducibilidad de la prueba y tres sueros para determinar la repetitividad de la prueba.

El análisis de los resultados de la reproducibilidad de la prueba (ver tabla N°5) nos muestra que el promedio de los coeficientes de variación de las tres muestras utilizadas en el análisis fue de 0,049 (4,9%). El análisis de los resultados de la repetitibilidad de la prueba (ver tabla N°6) nos muestra que el promedio de los coeficientes de variación de los tres pool utilizados en el análisis fue de 0,047 (4,7%)

**Tabla N°5. Determinación de la Repetitividad del estudio calculando el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación**

|                  | <b>Primera lectura</b> | <b>Segunda lectura</b> | <b>Tercera lectura</b> | <b>Promedio</b> | <b>DS</b> | <b>Coficiente de variación</b> |
|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|-----------|--------------------------------|
| <b>Muestra 1</b> | 4.4                    | 4.4                    | 4.0                    | 4.27            | 0.2309    | 0.054                          |
| <b>Muestra 2</b> | 5.75                   | 5.75                   | 6.25                   | 5.92            | 0.2886    | 0.048                          |
| <b>Muestra 3</b> | 7.85                   | 7.85                   | 7.3                    | 7.67            | 0.3175    | 0.041                          |

**Tabla N°6. Determinación de la Reproducibilidad del estudio calculando el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación**

|                  | <b>Primer día</b> | <b>Tercer Día</b> | <b>Quinto Día</b> | <b>Promedio</b> | <b>DS</b> | <b>Coeficiente de variación</b> |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------|---------------------------------|
| <b>Muestra 1</b> | 4.4               | 4.85              | 4.85              | 4.7             | 0.2598    | 0.055                           |
| <b>Muestra 2</b> | 6.25              | 6.75              | 6.25              | 6.42            | 0.2886    | 0.045                           |
| <b>Muestra 3</b> | 5.75              | 5.3               | 5.3               | 5.45            | 0.2598    | 0.048                           |

**C) Correlación de resultados de la técnica de dilución en tubos respecto al método de ELISA que evalúa la actividad hemolítica total del Complemento**

En la Tabla N°7 se observa que, en el caso del resultado de CH100% alto para la técnica de ELISA con niveles de C3 elevado, el valor hallado por el método de dilución en tubo tiende a dar más bajo, reportándose como un suero con CH50% normal.

Se observa también que de los 37 pacientes con valores normales por ELISA, solamente, 25 dieron resultados normales por la prueba de CH50%, dando 12 resultados catalogados como actividad hemolítica baja.

En el caso de los 6 resultados bajos por ELISA, 5 cinco dieron bajo por la prueba de CH50%, el sexto valor fue catalogado por esta prueba como normal.

**Tabla N°7 Correlación de la técnica de dilución en tubos respecto al método ELISA que mide la actividad hemolítica total del Complemento**

| <b>CH 100% ELISA</b> |               |              |             |              |
|----------------------|---------------|--------------|-------------|--------------|
| <b>CH50%</b>         | <b>NORMAL</b> | <b>BAJOS</b> | <b>ALTO</b> | <b>TOTAL</b> |
| <b>NORMAL</b>        | 25            | 1            | 1           | 27           |
| <b>BAJOS</b>         | 12            | 5            | 1           | 18           |
| <b>ALTO</b>          | 0             | 0            | 0           | 0            |
| <b>TOTAL</b>         | 37            | 6            | 2           | 45           |

**D) Correlación de IDR frente al ELISA CH 100% (gold estándar) tomando en cuenta los valores normales, altos y bajos de ambas técnicas**

En la Tabla N°8 se observa que, en el caso de resultados de CH100% altos por la técnica de ELISA con niveles de C3 elevados, los valores por el método de IDR también dieron altos

Se observa también que de los 37 pacientes con valores normales por ELISA, solamente, 27 dieron resultados normales por la prueba de IDR, dando 10 resultados catalogados como actividad hemolítica total CH100% baja.

En el caso de los 6 resultados bajos de CH100% por ELISA, todos los sueros dieron resultados bajos por el método de Inmunodifusión radial que mide la actividad hemolítica total del Complemento

**Tabla N°8 Correlación de IDR frente al ELISA CH 100% (gold estándar) tomando en cuenta los valores normales, altos y bajos de ambas técnicas**

| IDR    | CH 100% ELISA |       |      | TOTAL |
|--------|---------------|-------|------|-------|
|        | NORMAL        | BAJOS | ALTO |       |
| NORMAL | 27            | 0     | 1    | 28    |
| BAJOS  | 10            | 6     | 0    | 16    |
| ALTO   | 0             | 0     | 1    | 1     |
| TOTAL  | 37            | 6     | 2    | 45    |



**E) Correlación de resultados de la técnica de IDR frente a la técnica de dilución en tubos**

En la Tabla N°9 se observa que, en el caso del resultado catalogado como alto para CH100% por IDR, el valor encontrado por el método de CH50% era normal.

Se observa también que de los 30 pacientes con valores normales por CH100% por IDR, solamente, 23 dieron resultados normales por la prueba de actividad hemolítica del complemento en tubo, dando 7 resultados catalogados bajos para CH50%.

En el caso de los 14 resultados bajos por la técnica de CH100% por IDR, 11 dieron bajo por la prueba de CH50% y 3 resultados fueron normales para CH50%.

**Tabla N°9 Correlación de IDR que es la técnica estandarizada frente a la técnica de dilución en tubos**

| <b>Inmunodifusión radial para la determinación de CH100%</b> |               |              |             |              |
|--|---------------|--------------|-------------|--------------|
| <b>CH50% tubo</b>  | <b>NORMAL</b> | <b>BAJOS</b> | <b>ALTO</b> | <b>TOTAL</b> |
| <b>NORMAL</b>  | 23            | 3            | 1           | 27           |
| <b>BAJOS</b>   | 7             | 11           | 0           | 18           |
| <b>ALTO</b>  | 0             | 0            | 0           | 0            |
| <b>TOTAL</b>   | 30            | 14           | 1           | 45           |

**F) Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica ELISA CH100% frente al CH50%**

En las tablas 10 y 11, se observa la cantidad de pacientes que presentan valores normales y anormales de acuerdo a cada técnica, que nos permitieron obtener la Sensibilidad (S) de un 75%, Especificidad (E) de 50%, Valor Predictivo Positivo (VPP) 33% y Valor Predictivo Negativo (VPN) 86%. Además, se determinó que el valor del índice de kappa entre los dos métodos es de 0,29 (concordancia regular)

**Tabla N°10 Determinación de la correlación de resultados entre sueros con valores normales y sueros con valores anormales de la prueba de ELISA CH100% frente al CH50%**

|            | CH100% ELISA |         |       |
|------------|--------------|---------|-------|
| CH50% tubo | NORMAL       | ANORMAL | TOTAL |
| NORMAL     | 25           | 2       | 27    |
| ANORMAL    | 12           | 6       | 18    |
| TOTAL      | 37           | 8       | 45    |

**Tabla N°11 Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica de ELISA CH100% frente al CH50%**

|                           |      |
|---------------------------|------|
| Sensibilidad              | 75 % |
| Especificidad             | 50 % |
| Valor Predictivo Positivo | 33 % |
| Valor Predictivo Negativo | 86 % |
| Índice Kappa              | 0.29 |

**G) Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica ELISA CH100% frente a la técnica de IDR estandarizada**

En la tabla N°12 se puede observar la cantidad de pacientes que presentan valores normales y anormales de acuerdo a las técnicas de IDR y ELISA que es el gold estándar, que nos permiten obtener los valores de la Sensibilidad (S) del 88%, Especificidad (E) del 73%, Valor Predictivo Positivo (VPP) de 41%, Valor Predictivo Negativo (VPN) del 96% y el índice Kappa de 0.42 (concordancia moderada), que se observan en la tabla N°13.

**Tabla N°12 Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica ELISA CH100% frente a la técnica de IDR estandarizada para determinar la actividad hemolítica total del Complemento**

|         | CH100% ELISA |         |       |
|---------|--------------|---------|-------|
| IDR     | NORMAL       | ANORMAL | TOTAL |
| NORMAL  | 27           | 1       | 28    |
| ANORMAL | 10           | 7       | 17    |
| TOTAL   | 37           | 8       | 45    |

**Tabla N°13 Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica ELISA CH100% frente a IDR**

|               |      |
|---------------|------|
| Sensibilidad  | 88 % |
| Especificidad | 73 % |
| VPP           | 41 % |
| VPN           | 96 % |
| Kappa         | 0.42 |

## XII. DISCUSIÓN

La necesidad de contar con una técnica nueva como variante en la estimación de la actividad hemolítica total del complemento por la vía clásica actualmente representa, en algún grado, un compromiso entre la demanda de contar con técnicas validadas internacionalmente y adaptarlas para los requerimientos prácticos de un laboratorio bien orientado clínicamente.

El presente método estandarizado y validado para la cuantificación de la actividad hemolítica total del complemento, reúne una serie de características ventajosas para su utilización en la rutina de laboratorio clínico:

- a. Utiliza sólo 5 uL de muestra de suero por paciente.
- b. El tiempo de ejecución de la prueba es más rápido ya que solo se requiere sembrar y esperar la lectura del resultado después de las 48 horas.
- c. Tiene mayor sensibilidad que el método de dilución en tubo para detectar disminuciones en la actividad hemolítica del sistema del complemento y que en menor grado puede ser influenciada por variaciones de pH, fuerza iónica, concentraciones de calcio y magnesio, número y fragilidad de los eritrocitos, tipo y cantidad de anticuerpos, temperatura y tiempo<sup>38</sup>.

La estandarización de la técnica de CH100% por IDR además de ayudarnos a obtener los resultados en menor tiempo, nos ha obligado a establecer valores de referencia propios del laboratorio que permitan una adecuada interpretación de los resultados, tomando en cuenta la importancia de contar con un control de calidad de esta determinación<sup>38</sup>. Los valores de referencia para la prueba de Inmunodifusión radial obtenido en el presente estudio con ayuda de los pool de sueros fue de 5,58 a 8,34 mm de diámetro. Los pacientes con actividad hemolítica total del complemento (CH100) disminuida, mostraron un valor promedio de 4.10 mm con límites superior de 4,83 mm de diámetro debido a que en patologías como LES los niveles incluso son no

dosificables.<sup>48</sup> Estos hallazgos nos muestran que la zona de duda “área gris” para el método estandarizado está comprendida entre los valores de 4.84 a 5,57 milímetros de diámetro

La importancia que posee la cuantificación del Complemento funcional como ayuda diagnóstica y como evaluación del curso clínico, en enfermedades como el lupus eritematoso, la glomerulonefritis aguda postestreptocócica<sup>39</sup>, la artritis reumatoide, las hepatopatías, las septicemias, la endocarditis bacteriana subaguda y muchas otras, hace necesario el contar con metodologías simples que se puedan ejecutar en prácticamente todos los laboratorios del país. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran las ventajas de dicha técnica, al requerir poco material biológico, emplear menor tiempo en el procesamiento de la muestra, buena repetitividad y reproducibilidad y la capacidad de analizar gran número de muestras al mismo tiempo, dada su versatilidad, sería importante hacer conocer esta técnica como una herramienta útil para el monitoreo de pacientes con afectaciones a nivel del sistema del complemento.

La realización de los ensayos mediante la prueba de CH50% en tubo había sido estandarizada en el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética pero mostró algunos inconvenientes, ya que al hacer la corrida con una muestra control que tenía valores de C3 y C4 normales los resultados nos dieron más bajos que el valor de referencia “según el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS (150-250 Unidades Hemolíticas /mL)” Este hecho nos motivó a evaluar el tampón barbital como tampón de trabajo, evaluar el título de la hemolisina a utilizar, y la dilución del suero problema a ser utilizada. Estos parámetros a su vez nos fueron de utilidad en la posterior estandarización de la prueba de Inmunodifusión radial.

Para determinar el título óptimo para la sensibilización de los glóbulos rojos, se evaluaron diferentes diluciones de la hemolisina (1/1000, 1/500; 1/250, 1/200: 1/150 y 1/100). También, se evaluó diferentes diluciones del suero control (1/20, 1/30 y 1/40) a

utilizar en la prueba de CH50% donde se obtuvo mejores resultados con la dilución 1/150 de hemolisina y una dilución de 1/30 para el suero del control. También, se evaluó las concentraciones de los glóbulos rojos a utilizar, para ello se tomó en cuenta diferentes concentraciones de 3%, 5% y el ajuste de concentración de glóbulos rojos a la densidad de 0.500 a una longitud de onda de 540 nm por espectrofotometría. Con este análisis determinamos que el ajuste de concentración de los glóbulos rojos mediante espectrofotometría es el que produce resultados con mejor reproducibilidad.

Para realizar la estandarización de la técnica de IDR, se tomó en cuenta varios parámetros. Primeramente, se realizó la titulación de la hemolisina utilizando un suero normal, es decir con valores de C3 y C4 dentro del rango de referencia, para esto se utilizó el mismo protocolo de la prueba de CH50% que se mencionó anteriormente. También se evaluaron los tiempos y las temperaturas a las cuales debían ser incubadas las muestras (ver tablas 4A - 4F). En las placas que fueron incubadas durante 48 horas a temperatura ambiente se utilizó el método de difusión completa de Mancini<sup>42</sup>, este método requiere que los halos de precipitación alcancen el máximo tamaño posible en ese tiempo, mientras que las placas que fueron incubadas por 18 horas se utilizó el método de difusión radial simple de J. Fahey que permite la medición de los halos antes de su desarrollo total<sup>33</sup> y la temperatura de 2 a 4°C se tomó en cuenta según el prospecto al kit comercial The Binding Site<sup>37</sup> que determina la actividad hemolítica total del Complemento para evitar la degradación de los componentes del complemento más frágiles.

De los 6 protocolos utilizados para la estandarización de esta técnica el mejor fue el protocolo N°1 donde la dilución de la hemolisina óptima fue de 1/150 con un ajuste de la concentración de los glóbulos rojos de carnero a 0.500 de densidad óptica, cuando se preparó las placas con las condiciones mencionadas se sembró la muestra del pool con valores de C3 y C4 normales, se dejó en pre-incubación a 37°C por 30 minutos para que se pueda activar la cascada del Complemento y después se dejó a temperatura ambiente

por 48 horas, esto permitió obtener halos bien definidos que se pudieron medir con la regla de precisión de 0.1 mm.

En el trabajo sobre alteraciones en el Sistema del Complemento en pacientes con nefropatía diabética se observó una disminución significativa de la actividad de la vía clásica y de los niveles séricos de los componentes Clq, C3 y C4 del complemento en un grupo de pacientes con nefropatía diabética en fase terminal, que pudiera estar causada por procesos infecciosos crónicos, por procesos inflamatorios localizados en diversos órganos o que, por el contrario, pudiera estar relacionada con la participación del sistema complemento en la regulación de la respuesta inmune y el mantenimiento de la tolerancia.<sup>45</sup>

Finalmente la comparación entre la técnica de CH50% en tubo respecto a la de Inmunodifusión radial CH100% mediante el método de test diagnóstico nos proporciona buenos resultados para IDR en placa ya que comparando los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de ambas técnicas observamos mejores resultados que concuerdan mas con los resultados obtenidos por la técnica de ELISA.



### **XIII. CONCLUSIONES**

En el proceso de estandarización de la prueba para determinar la actividad hemolítica total del complemento por Inmunodifusión radial (IRD), se determinó que las condiciones óptimas para realizar esta prueba son: utilizar glóbulos rojos ajustados a la densidad óptica de 0.500 medidos a 540 nm de longitud de onda, el título óptimo de la hemolisina a utilizar es de 1/150 y que una vez sembrada la muestra se debe pre-incubar la placa por 30 minutos a 37°C y luego pasar a una incubación final a temperatura ambiente por 48 horas.

El proceso de optimización de la prueba para determinar la actividad hemolítica del complemento por dilución en tubo, determinó que las condiciones óptimas para realizar esta prueba son las siguientes: se debe utilizar tampón barbital como tampón de trabajo, se debe utilizar glóbulos rojos ajustados a 0.500 de densidad óptica medidos a 540 nm de longitud de onda, el título óptimo de la hemolisina a utilizar es de 1/150 y que el suero problema a sembrar debe estar diluido 30 veces.

Se determinó que la prueba de IDR estandarizada tiene una Sensibilidad del 88%, Especificidad (E) del 73%, Valor Predictivo Positivo (VPP) de 41%, Valor Predictivo Negativo (VPN) del 96% y que el grado de correlación de resultados con la prueba de ELISA según índice Kappa es de 0.42 (concordancia moderada)

#### **XIV. RECOMENDACIONES**

Con los resultados obtenidos de la estandarización y validación del presente estudio, se determinó que al evaluar la actividad hemolítica total del complemento por la técnica de Inmunodifusión radial, es más probable emitir resultados con mayor sensibilidad y especificidad que el método tradicional basado en diluciones seriadas en tubo que mide la actividad hemolítica del complemento CH 50%. También el método basado en IDR mostró tener mejor correlación con los resultados obtenidos con el método de ELISA que el método de uso tradicional. Por lo tanto se recomienda que los laboratorios que realizan este tipo de determinaciones utilicen la prueba de IDR para determinar la actividad hemolítica total del sistema del complemento en pacientes que cursan patologías en las cuales esta actividad se ve involucrada.

## XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 4 ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
2. Rezaei N, et al. An introduction to primary immunodeficiency diseases. Primary immunodeficiency diseases 2008; 5:1-38
3. Botto M, et al. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. Mol Immunol 2009; 46:2774-2783
4. Bonilla FA, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94:S1-63
5. Carroll, M. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004, 5: 981-6.
6. Rojas , W.. Inmunología.
7. Cunnion, K; Wagner, E. & Frank Michael. Complement & kinin. En Parslow, T., Stites, D.; Terr, A., imboden, J. *Medical Immunology.* 10th Ed. Lange Medical Book. Chicago, USA. 2001: 175-188
8. Mathews, C. K.; Van Holde, K.E et Ahern, K.G (2003). *Bioquímica* (3 edición)
9. Carroll, M.C. and Fischer, M.B. (1997). *Complement and immune response.* Current Opinion in Immunology, 9:64-69.
10. Epstein, J., Eichbaum, Q., Sheriff, S., and Ezekowitz, R.A.B.:*The collectins in innate immunity.* Current Opinion in Immunology,1997. 8:29-35
11. Poner, R.R (2004) Complement polymorphism, **dic major histocompaibility complex and** associated diseases.- A speculadon. *Mal. Rbi. Mcd.* 1 161168.
12. Gagnon, J. <1994) Structure and activation of complement components £22 and factor B. *Phd.7>aas. R. Soc. Lond. B.* 3~, 301-309.
13. Waport, M. NEJM. Vías de activación del Complemento; 2001. 344(14): 1058-1066
14. Stites DP. Inmunología Básica y Clínica. 10º Edición. Editorial El Manual Moderno.2003.

15. Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Blouin J, Mouthon L, Fridman WH. Investigation of the complement system in clinical practice, *Ann Med Interne (Paris)*. 2003, 154: 529-40
16. Schumaker VN, Zavodszky P, Poon PH. Activation of the first component of complement. *Annu Rev Immunol* 1987;5:21-42.
17. Nonaka M, Yoshizaki F. Evolution of the complement system. *Mol Immunol*. 2004, 40: 897-902
18. Goldsby RA, Thomas JK, Osborne BA. *Kuby immunology*. 4th ed. Freeman: New York; 2000. p. 329-350.
19. Croix DA, Ahearn JM, Rosengard AM, Han S, Kelsoe G, Ma M, Carroll MC. Antibody response to a T-dependent antigen requires B-cell expression of complement receptors. *J Exp Med* 1996;183:1857-1864.
20. Janeway, A. *Inmunobiología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Masson S.A. Barcelona. 2000
21. Fujita T, Endo Y, Nonaka M. Primitive complement system recognition and activation. *Mol Immunol*. 2004,4 1: 103-11.
22. Margni RA. *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos*. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 1996.
23. Mayer, M.M. Complement and complement fixation. *Experimental Immunochimistry*. kabat, E.A. y Mayer, M.M., Eds. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, 1961; 133-240.
24. Barilla-La Barca ML, Atkinson JP. Rheumatic syndromes associated with complement deficiency. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:55-60.
25. Nussbaum, Robert L., Roderick R. McInnes, and Huntington F. Willard. *Genetics in Medicine*. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2007.
26. Jonsson G, Truedsson L, Sturfelt G, Oxelius VA, Braconier JH, Sjöholm AG. Hereditary C2 deficiency in Sweden : frequent occurrence of invasive infection, atherosclerosis, and rheumatic disease. *Medicine* 2005;84:23-34.

27. Wang X, Circolo A, Lokki ML, Shackelford PG, Wetsel RA, Colten HR. Molecular heterogeneity in deficiency of complement protein C2 type I. *Immunology* 1998;93:184-91
28. Yang Y, Chung EK, Zhou B, Lhotta K, Hebert LA, Birmingham DJ, et al. The intricate role of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus. *Curr Dir Autoimmun* 2004;7: 98-132.
29. Fredrikson GN, Gullstrand B, Westberg J, Sjöholm AG, Uhlen M. Expression of properdin in complete and incomplete deficiency: normal in vitro synthesis by monocytes in two cases with properdin deficiency type II due to distinct mutations. *J Clin Immunol* 1998;9:2318-26.
30. Sassi F, Bejaoui M, Ayed K. A congenital deficiency of the C3 fraction of complement. A familial study. *Tunis Med* 2003;81:354-8.
31. Zhu Z, Atkinson TP, Hovav KT, Boppana SB, Dai YL, Densen P, et al. High prevalence of complement component C6 deficiency among African-Americans in the south-eastern USA. *Clin Exp Immunol* 2000;119:305-10.
32. Horiuchi T, Nishizaka H, Kojima T, Sawabe T, Niho Y, Schneider PM, et al. A non-sense mutation at Arg95 is predominant in complement 9 deficiency in Japanese. *J Immunol* 1998;160:1509-13.
33. Stites, D. ; Stobo, J. ; Wells, J. (1988). *Inmunología básica y clínica* ( 6ta Ed). México, D.F. Editorial El Manual Moderno.
34. Sanchez. L. Determinación de los valores de la actividad hemolítica del complemento en individuos normales de la ciudad de La Paz. Cuadernos Vol.35 N° 1. Año 1989
35. Rose, Conway de Macario, Fahey, Friedman and Penn. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Fourth Edition. 1992. American Society for Microbiology.
36. Instrucciones del Kit: ELISA para la determinación cuantitativa de la actividad del complemento
37. The Binding site Group. *Complement hemolytic total*. Barcelona

38. Gewurz, H. Y Suyehira, L.A. Complement. *Manual of Clinical Immunology*. Rose, N.R. y Friedman H., Eds. American Society for Microbiology, Washington, 1976; 36-47.
39. Kohler, P. Serial complement component alterations in acute glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. exp. Immunol.* 1969; 4:191-202.
40. Current Protocols in Immunology 1992. Editado por Coligan J. , Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E y Strober W. Publicado por Greene Publishing Associates and Wiley Interscience. Volumen 1. Capitulo 1.6.
41. Hudson, L. y Hay, F.C. (1989) *Practical Immunology*, p.188. Oxford: Blackwell Scientific Publications. Colcoar en la primera parte de membranas
42. Mancini, G., Carbonara, A.O. y Heremans, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion *Immunochemistry* 1965; 2:235-254.
43. Pickering, M., Botto, M., Taylor, P. Lachmann, P. & Walport M.. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol* 2000. 76:227-324.
44. Chen Z, Koralov SB, Kelsoe G. Complement C4 inhibits systemic autoimmunity through a mechanism independent of complement receptors CR1 and CR2. *J Exp Med* 2000; 192(9): 1339-52.
45. Merlín J. Alteraciones del sistema complemento en pacientes con nefropatía diabética. Instituto de Hematología e Inmunología. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2003;19(1)
46. Almará. A, Valverde J. Morisoli. Th50:un parámetro indicador de la actividad global del complemento. Departamento de Patología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Rosario Argentina.2001
47. Ouchterlony, O. y Nilsson, L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. IN: Weir, D.M. (Edit.) *Handbook of immunological methods*, Vol. 1: *Immunochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978; 1 9:1.

48. Kohler, P.F. y ten Bensele, A. Serial complement component alterations in acute glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. exp. Immunol.* 2009; 4:191-202.

## ANEXOS

### ANEXO N° 1. Preparación de reactivos

#### 1. ALSEVER

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Glucosa                  | 2.05 g  |
| Citrato de sodio anhidro | 0.8 g   |
| Ácido cítrico anhidro    | 0.051 g |
| Cloruro de sodio         | 0.42 g  |
| Agua destilada           | 100 mL  |

pH 6.1

#### 2. BUFFER BARBITAL

|  |         |
|--|---------|
| Ácido dietilbarbitúrico                | 0,575 g |
| Dietilbarbiturato sódico               | 0,376 g |
| Cloruro de sodio                       | 8,5 g   |
| Cloruro de magnesio- 6H <sub>2</sub> O | 0,102 g |
| Cloruro de calcio                      | 0,017 g |
| Agua destilada                         | 1000 mL |

pH 7,6 ± 0,05.



### 3. TAMPÓN PARA COMPLEMENTO HEMOLÍTICO (TBS)

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Cloruro de sodio                  | 7.5 g   |
| Cloruro de Magnesio hexahidratado | 0.1 g   |
| Cloruro de Calcio dihidratado     | 0.022 g |
| Trietanol Amina                   | 2.8 mL  |
| Ácido clorhídrico 1N              | 17.1 mL |
| Agua destilada                    | 100 mL  |

pH 7.2+/- 7.4

**ANEXO N°2. Interpretación de los valores del Índice Kappa según el rango de valor obtenido.**

| Coeficiente | Interpretación    |
|-------------|-------------------|
| 0           | Relación nula     |
| 0 – 0,2     | Relación muy baja |
| 0,2 – 0,4   | Relación baja     |
| 0,4 – 0,6   | Relación moderada |
| 0,6 – 0,8   | Relación alta     |
| 0,8 - 1     | Relación muy alta |
| 1           | Relación perfecta |

ANEXO N°3 Preparación de la batería de diluciones en tubo para realizar la prueba de CH50%



ANEXO N°4 Reactivos para la determinación de CH 100 % por ELISA



ANEXO N°5 Lectura de una placa de Inmunodifusión Radial midiendo los halos correspondientes

