

5
2ej
302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**EL RECEPTOR CR - 1 EN ERITROCITOS
HUMANOS Y SU RELACION CON
DISTINTAS ENFERMEDADES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA EUGENIA GONZALEZ - ORTEGA FLORES

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

CAPITULO I	Pag.
INTRODUCCION	1
CAPITULO II	
ANTECEDENTES	
2.1. SISTEMAS DEL COMPLEMENTO (C)	4
2.1.1. Definición	4
2.1.2. Descripción y Naturaleza de sus componentes (Nomenclatura)	4
2.1.3. Inhibidores e Inactivadores	4
2.1.4. Funciones del Complemento	5
2.1.5. Mecanismos de Activación y Regulación	5
2.2. RECEPTORES CELULARES	10
2.2.1. CR-1	10
2.2.2. Funciones de los Receptores Celulares.	13
2.3. COMPLEJOS INMUNES	13
2.3.1. Definición	13
2.3.2. Formación y Eliminación de Complejos Inmunes	13
2.3.3. Consecuencias Adversas de la Formación de Complejos Inmunes (CI)	17

2.3.3.1. Hipersensibilidad	17
2.3.3.2. Hipersensibilidad Tipo III o mediada por Complejos Inmunes	17

CAPITULO III

3.1. DIAGRAMA EXPERIMENTAL	19
3.1.1. Diagrama de establecimiento de método	19
3.1.2. Diagrama de establecimiento de valores de referencia	20
3.1.3. Cuantificación del CR-1 en Pacientes	21
3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO	22
3.2.1. Material Biológico	22
3.2.2. Material de Laboratorio	23
3.2.3. Reactivos	24
3.2.4. Preparación de reactivos	24
3.3. METODOLOGÍA	
3.3.1. Fundamento de la Determinación de CR-1	26
3.3.2. Técnica	26

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
4.1. Resultados	29
4.2. Discusión	41

CAPITULO V	45
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	46

CAPITULO I

INTRODUCCION

El término "inmunidad" se refiere, en principio, a la resistencia que presentan los individuos frente a las infecciones bacterianas.(15)

Actualmente, ésta engloba al conjunto de respuestas dirigidas a la eliminación de sustancias extrañas. Por consiguiente se puede definir al sistema inmune (SI) como: "el conjunto de factores humorales y celulares, específicos o no, que protegen al organismo contra las agresiones infecciosas y parasitarias; y contra la proliferación maligna". Se puede decir también, que la respuesta inmune tiene como propósito fundamental el preservar la individualidad biológica, para lo cual los mecanismos de reconocimiento, de lo propio y de lo extraño, juegan un papel primordial. Al hablar de la respuesta específica, se puede decir que, para cumplir su cometido, el sistema inmune dispone de dos tipos de células que responden a la presencia de antígenos (Ag) (sustancias reconocidas como elementos extraños) de naturaleza química diversa(15).

La respuesta inmune celular está representada por los linfocitos "T", los cuales maduran en el timo, dan células efectoras productoras de linfocinas. Por su parte, la respuesta inmune de tipo humoral es aquella en la que existe la síntesis de moléculas proteicas llamadas anticuerpos (Ac), y que se unen específicamente al Ag para eliminarlo del organismo. Estos Ac son sintetizados por los linfocitos "B", células provenientes de la diferenciación de las células progenitoras del tejido hematopoyético. Los Ac unidos a su Ag correspondiente forman agregados moleculares, los complejos inmunes (CI), que pueden tener expresión biológica a

través de la interacción con proteínas del plasma.(16)

Entre los sistemas plasmáticos de respuesta se cuenta al sistema de complemento (C), que incluye al menos 20 proteínas diferentes en circulación, y algunos receptores específicos presentes en diversos tipos de células (eritrocitos, macrófagos, etc.).(17)

De las proteínas circulantes, el componente C3 y su receptor específico CR-1, se han implicado en la distribución y manejo de los complejos inmunes (16), tal como se deduce de estudios anteriores (16-17) donde se hicieron mediciones del receptor CR-1 eritrocitario.

Estos estudios fueron hechos en pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas, en particular Lupus Eritematoso (LE) y Artritis Reumatoide (AR); enfermedades infecciosas, en particular la Endocarditis Infecciosa (EI); y en algunas formas de anemia hemolítica, teniendo todos ellos en común mecanismos patogénicos donde intervienen C1 y activación del sistema de C. Por otro lado, se sabe que muchos de los efectos secundarios de estos padecimientos (auto-isoimunes) son causados por el depósito de estos complejos inmunes sobre diferentes tejidos, con el daño subsecuente a éstos. Estos efectos pueden deberse, tanto a un aumento en su concentración, como a una probable disminución en el número de receptores-CR-1 eritrocitarios.(17)

Para probar esta última hipótesis, el presente trabajo pretende demostrar que los eritrocitos de enfermos con padecimientos de etiología Inmune tienen un menor número de receptores, comparados a aquellos en donde no existe participación inmunológica.

En la consecución de este objetivo, es necesario primero:

a) establecer una metodología adecuada que permita la cuantificación de los receptores CR-1, y b) establecer los valores de referencia, obtenidos en una población aparentemente sana, que permita la comparación con los valores obtenidos en la población enferma en general; así como, en cada población en particular.

CAPITULO II

ANTECEDENTES.

2.1. SISTEMA DEL COMPLEMENTO (C').

2.1.1. DEFINICION. El término en el momento actual, designa a un sistema biológico complejo, compuesto por un conjunto de 20 proteínas plasmáticas y por proteínas de membrana con función de receptores para los componentes de complemento o sus fragmentos de proteólisis limitada. La naturaleza química de estos componentes corresponde a las glicoproteínas (19).

2.1.2. DESCRIPCION Y NATURALEZA DE SUS COMPONENTES (NOMENCLATURA). El sistema del complemento es un sistema de proteínas del plasma que se ha dividido en dos vías, una clásica y otra alterna.

VIA CLASICA.- Las nueve proteínas de la vía clásica del Complemento se designan por una letra C seguida de un número C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, los números finalmente siguen el orden de acción de los componentes con excepción del C4 que actúa antes de C2 y C3.

VIA ALTERNA.- Los componentes que actúan solamente en la vía alterna se designan por letras: Factor B, Factor D, Properdina, Factor H, Factor I y aquellas proteínas asociadas con la vía alterna como el C3, conservan su nomenclatura (1).

2.1.3. INHIBIDORES E INACTIVADORES.

Las proteínas reguladoras se designan por un título descriptivo (proteínas de unión de C4), C1 Inhibidor (C1INH). Los componentes únicos complejos multicomponentes que están activados enzimáticamente se designan con una barra sobre el

componente en cuestión ej. $\overline{C}3r$ (2). Las moléculas que han perdido la actividad a través de la desnaturalización química o por sección de la proteína se designan usualmente con el prefijo formado por la letra i (ej. iC3).

Los fragmentos y subunidades de los varios componentes se designan por un sufijo en letra minúscula (ej. C3b) (2).

2.1.4. FUNCIONES DEL COMPLEMENTO.

Un buen número de los componentes plasmáticos funcionan como enzimas "en cascada" con amplificación progresiva de la reacción; mientras que otras, al unirse entre sí, pasan de la fase fluida del plasma al seno de la membrana celular, modificando su fisiología y favoreciendo la lisis celular por un mecanismo osmótico (1). En el proceso de la activación, la acción enzimática sobre una proteína produce fragmentos de tamaño variable que, al unirse a receptores celulares específicos, modulan la actividad celular induciendo: degranulación y liberación de sustancias formadas; movilización celular; y cambios en el metabolismo oxidativo. Todas estas acciones se traducen en opsonización, quimiotaxis, cambios en la permeabilidad vascular y, citotoxicidad; de manera que el C se integra como uno más de los mecanismos de inflamación y defensa (1).

2.1.5. MECANISMOS DE ACTIVACION Y REGULACION.

En su fase plasmática el C reacciona a través de dos vías de activación: la clásica y la alterna, que comparten un mecanismo efector: el complejo de ataque a la membrana (C56789).(1)

Aunque la activación del C puede ocurrir en fase fluida, es mucho más eficiente y

significativa en biología, si ocurre en una superficie celular o en un agregado molecular, y es resultado tanto de la vía clásica como de la alterna, de la interacción de proteínas de C con activadores inmunes como fragmento Fc de la IgG3, IgG2, o IgM, (clásica) o fragmentos F(ab)2 de IgG ó IgA (alterna); no inmunes: lípido A, polianiones, proteína C reactiva y cristales (clásica), o polisacáridos de polixina, pared bacteriana, células tumorales o eritrocitos (alterna) (4-5). Ambas vías conducen a la integración de complejos enzimáticos que producen proteólisis limitada de C3 y C5 nativo, activándose así estos componentes centrales del sistema.(4)

La activación de la vía clásica se inicia con el reconocimiento de los activadores IgG o IgM.

La unión de C1, el primer componente de la cascada a un complejo Ag-Ac inicia la vía; C1 existe en el suero como una macromolécula de 3 subunidades (C1q,C1r,C1s) juntas en presencia de calcio (6).

C1q se halla en el suero en asociación con dos unidades adicionales: C1r y C1s, que son formas proenzimáticas de cadena única de proteasas de serina. El C1 se somete a activación enzimática para volverse una proteasa de serina activa. Esta activación se asocia con la ruptura de una de las cadenas de C1r y C1s, a cadenas pesadas y cadenas ligeras.

El C1s tiene mayor especificidad, y es la enzima responsable para la ruptura de C4 y C2.

La unión y activación de C1, lleva a la generación de una enzima capaz de coordinarse y romper una segunda proteína para la cascada: C4.

Este componente se sintetiza a partir de un precursor de cadena única (pro 4), y la estructura de tres cadenas se forma como un evento post-translacional (7). En la interacción con C1s, la cadena alfa de C4 se rompe con la liberación de un pequeño fragmento, C4a; y el fragmento mayor C4b contiene la cadena alfa prima y continúa la cascada de C.

En presencia de Mg^{++} el C2 se une a C4b, siendo partido por el $\overline{C1s}$ adyacente y formando dos fragmentos: C2a y C2b. El C2a permanece asociado a C4b para continuar la cascada. A este nivel, el mecanismo de regulación implica C1INH que forma un complejo covalente con C1s, bloqueando así la activación de C4 y C2. También retarda la activación de C1r. El complejo $\overline{C2a4b}$ tiene nueva actividad enzimática, capaz de romper C3. El sitio de actividad enzimática reside en la porción C2a de la molécula. El C2b permanece como parte del complejo actuando como el sitio de unión de C4b. C4b puede ser degradado a C4c y C4g por acción del factor I cuando se asocian cofactores apropiados. La actividad de esta enzima está controlada por requerimientos conformacionales de sustrato (C3b y C4b) mediadas por cofactores esenciales (Factor H) antes de la exposición del sitio para la actividad enzimática o ruptura enzimática.

El C4b, en el complejo, une la molécula de C3 y la hace accesible a la ruptura por $\overline{C2a}$.

El complejo C4b2a, llamado clásicamente convertasa de la vía clásica, es lábil y rápidamente tiene una caída con la liberación física de C2a como un fragmento inactivo enzimáticamente.

El C4b que queda en la superficie antigénica puede unir otra molécula de C2, el cual con la ruptura por C1 nuevamente formará la convertasa de C3. La acción de C2a4b, sobre C3, implica su ruptura en dos fragmentos C3a y C3b. Los fragmentos C3b se fijan en sitios específicos de la membrana celular, y algunos cercanos al complejo C4b2a lo cambian a C4b2aC3b modificando la acción enzimática de C2a, que ahora, actúa sobre C5, por lo que recibe el nombre de C5 convertasa. C3b une C5 al complejo, y lo presenta a la acción proteolítica de C4b2a con generación de C5a y C5b. C5b tiene la capacidad de interacción no enzimática con otras proteínas para generar el complejo multimolecular de ataque a la membrana.(6)

La regulación de los productos de C3 se lleva a cabo por medio de la C3bi que degrada la cadena alfa de C3b inhibiendo su participación en la formación de la convertasa, y en la adherencia inmune. El factor H es un cofactor necesario para la inactivación de C3b por el factor I (3).

El factor H lleva a cabo su función de regulación, al disminuir la actividad de la convertasa de C3. Esto se logra por competición con B y Bb por la unión de C3b, inhibiendo por tanto la formación de la convertasa y acelerando la caída de los complejos de convertasa existentes.(7)

Hay proteínas importantes para el inicio, y control, de la vía alterna. Estos son: factor B, factor D, properdina y C3 por sí mismo (18).

El factor D es una glicoproteína de cadena única y, su baja concentración lo hace que tenga limitado el ensamblaje de la convertasa C3 de la vía alterna: C3bBb. El factor B, no tiene actividad en sustrato natural, hasta que se une a C3b. Así, es capaz de

expresar su actividad proteolítica sólo después de la exposición en un sitio sobre el factor B y su interacción con C3b.(18)

La properdina tiene dos formas: properdina nativa (nP) y activa (P); la properdina nativa puede unirse a convertasa de C3 de la vía alterna ($\overline{C3bBb}$), pero no puede unirse a C3b solo. Su función en estas circunstancias es reducir el índice de caída de convertasa, y así promover la activación de la vía alterna.

La properdina activa puede además unirse a C3b en partículas en la fase fluida, en ausencia de factor B, y promover después el ensamblaje de $\overline{C3bBb}$ (20).

La vía alterna se inicia por la acción de anticuerpos IgG o IgA en su fragmento $F(ab)_2$. El paso inicial involucra a la molécula C3 nativa que al romperse expone un enlace tioéster en C3b, esencial para la inactivación de ésta vía, y sitio de unión con la vía clásica a través de un sistema de retroalimentación positiva al generarse C3b por acción de proteasas, ya que es una molécula lábil y la hidrólisis del enlace produce una molécula de $C3(H_2O)$, conformacionalmente similar a C3b.

Sea C3b o su molécula similar, se permite la unión con una enzima, el factor B, y sobre éste actúa el factor D, (enzima proteolítica que rompe al B en dos fragmentos Ba y Bb). El fragmento Bb es una enzima que permanece unida a C3b, formando la primera convertasa de C3 de la vía alterna: $\overline{C3bBb}$. Esta convertasa rompe a C3, generando C3a y C3b, con retroalimentación positiva. Los mecanismos de regulación son los que implican a el factor H y el factor I.(20)

Llegadas a este punto, las dos vías, clásica y alterna convergen y hay una vía común que se inicia, sin acciones enzimáticas a nivel de C5b que se une a C6 y forma un

complejo estable C5bC6. Al unirse C7 se inicia un cambio anfifílico y hay una afinidad transitoria de C5bC6C7 por la capa bilipídica de la membrana, unida por C7.(6)

Al unirse una molécula más, C8, se logra una acción catalítica sobre múltiples moléculas de C9 y la formación de una estructura tubular formada por 12 o 18 moléculas de C9 (poli 9). Esta estructura de unos 10nm de diámetro interno y 20nm de diámetro externo produce cambios muy importantes en las propiedades de la membrana semipermeable, con canales funcionales en la bicapa de lípidos, con lisis osmótica final (12). (Diagrama No. 1)

2.2. RECEPTORES CELULARES:

El descubrimiento de los receptores celulares se acredita a Nelson en 1950, quién, demostró que la fagocitosis neutrofílica de Treponema pallidum y Streptococcus pneumoniae sensibilizados con anticuerpo y complemento, eran más eficientes en la presencia de eritrocitos humanos (8). Este aumento fagocitario supuso, que ocurría debido a que las bacterias recubiertas con complemento, se inmovilizaban en la superficie de las células rojas y que por lo tanto se engullían más fácilmente. De manera final, esta unión de bacterias a eritrocitos se veía, que ocurría debido a la interacción del organismo que llevaba C3b con un receptor específico para C3b en los eritrocitos, un fenómeno llamado adherencia inmune (8).

2.2.1. CR-1

Receptor para C3b, mediador de adherencia inmune y opsonización. Presente en eritrocitos humanos, polimorfonucleares, monocitos, linfocitos T, células asesinas,

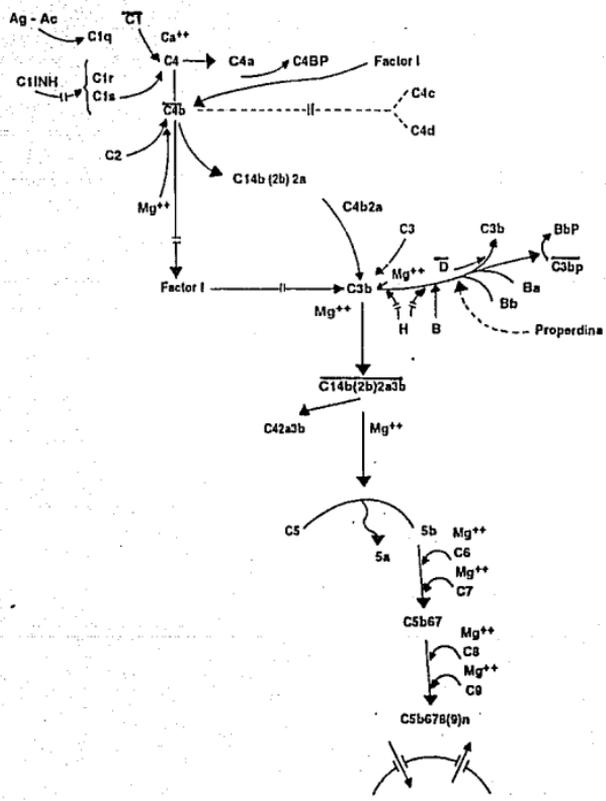


DIAGRAMA 1. ACTIVACION DEL COMPLEMENTO.

mastocitos, podocitos del epitelio glomerular y células dendríticas de centros germinales (9).

La glicoproteína receptora para C3b aislada se halla en una serie de formas polimórficas determinadas genéticamente, que varían de tamaño, de 190 a 280 kd. Su configuración en la membrana celular desconoce, aunque se sugiere existe en la forma de un hexámero o pentámero. El receptor de C3b a fin de distinguirlo de sus receptores de membrana para fragmentos de C3, se llama CR-1. Hay de 300 a 1000 CR-1 en cada eritrocito; de 3000 a 5000 CR-1 por cada célula linfocitaria y, se determina por la unión de anticuerpos específicos anti -receptores. Este une C3b con mayor afinidad que a C3 nativo; Así que, la interacción de una partícula recubierta con C3b no se bloquea por C3 libre en el suero, permitiendo que el C3b juegue un papel importante en el proceso fagocítico y el catabolismo de los complejos inmunes (10). La unión de un blanco recubierto con C3b, al CR-1, no induce por sí mismo, a un fagocito en receso a la fagocitosis. Una segunda señal que generalmente se requiere para iniciar el proceso fagocítico, puede estar dada por algunas moléculas de IgG unidas al blanco, que interactúan con los receptores Fc de la IgG en la membrana celular.

Además de su papel en la fagocitosis, el CR-1 juega un papel crítico en la vía de degradación de C3 al unirse C3b a CR-1, ya que se vuelve accesible a la acción del factor I; sin embargo, ésta interacción no es con el fragmento iC3d sino con C3dg. El CR-1 facilita la degradación de C4 por el factor I, llevando a la formación de un fragmento de ruptura C4d a la superficie blanco (9).

El C3b interactúa con células adyacentes con receptores de C3b y, el grupo de receptores de CR-1 en circulación esta en los eritrocitos. La interacción lleva a una remoción efectiva del complejo inmune, a partir del plasma por absorción a la superficie eritrocitaria y los complejos no pueden difundir más. (Fig. 2).

2.2.2. FUNCIONES DE LOS RECEPTORES CELULARES.

Los componentes del complemento al unirse a sus receptores, disparan una serie de respuestas bioquímicas complejas dentro de la célula. Algunos fragmentos como: C3b, iC3b y C3dg al unirse a su receptor celular, disparan un número de respuestas específicas, como fagocitosis por neutrófilos y macrófagos; o activación de linfocitos B (10).

2.3 COMPLEJOS INMUNES

2.3.1. DEFINICION. Son antígenos circulantes libres que forman complejos con los anticuerpos circulantes específicos; y que son capaces de fijar complemento.

Hay factores que determinan el tamaño del CI, incluidas las características del antígeno y del anticuerpo, el radio de los mismos; y las características del medio de reacción (11).

2.3.2. FORMACION Y ELIMINACION DE COMPLEJOS INMUNES

Los antígenos presentan múltiples sitios antigénicos, mientras que los anticuerpos tienen al menos dos sitios de recepción para el antígeno; con esto es posible construir un número infinito de uniones Ag-Ac. La precipitación inmediata es debido a la interacción con la porción Fc. Las interacciones Fc-Fc explican la agregación inmediata de los complejos en estado de: exceso de anticuerpos, equivalencia o

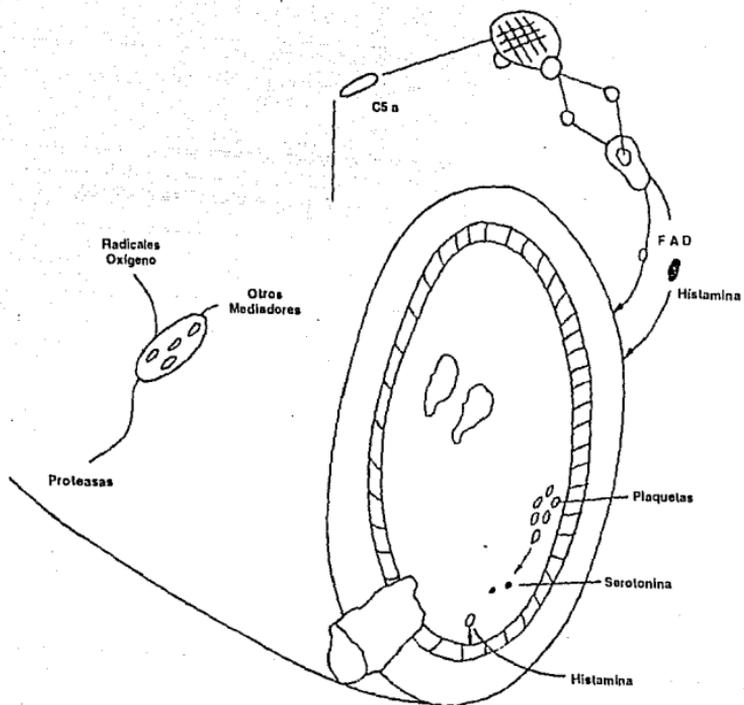


Fig. 2 Depósito de Complejos Inmunes en tejido y paredes de los vasos iniciando la patogénesis de la enfermedad por complejos inmunes.

exceso de antígenos, enfatizando esta interacción, las modificaciones que el complemento puede ejercer sobre los CI.

La eliminación de los CI involucra a receptores CR-1 para complemento, siendo su mayor adhesión con el fragmento C3b.

Los CI-C3b unidos a los eritrocitos son llevados por la circulación hasta el hígado, donde son despegados de los eritrocitos por los macrófagos del sinusoides hepático (12). Los eritrocitos ahora libres de complejos inmunes, regresan a la circulación donde continúan circulando con una vida media normal, aunque de manera interesante parecen perder ciertos receptores CR-1 durante este proceso. Este mismo fenómeno se ha visto en aquellos estados patológicos asociados con la presencia de altos niveles de complejos inmunes circulantes (CIC), y que se caracterizan por presentar eritrocitos circulantes con bajo número de CR-1 (13).

Bajo condiciones normales, éste es el mecanismo de remoción de CI; sin embargo, esta eliminación de CI puede fallar por varias razones:

- 1.- Disminución del complemento.
- 2.- Alternación en las inmunoglobulinas que fijan complemento, ó
- 3.- Depresión, deficiencia u ocupación de CR-1 (13).

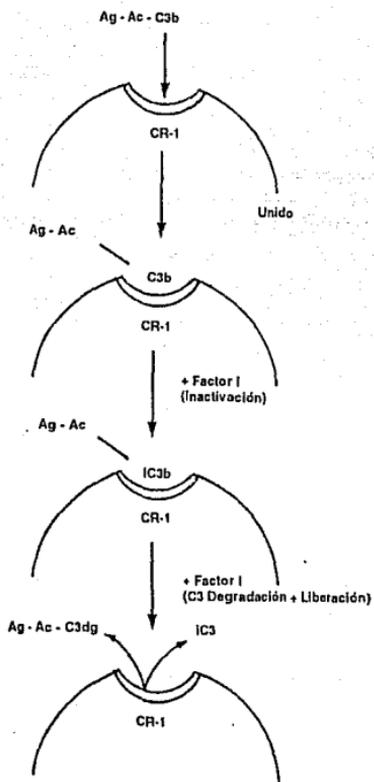


Fig. 3 FUNCION DE CR-1

2.3.3. CONSECUENCIAS ADVERSAS DE LA FORMACION DE COMPLEJOS INMUNES

(CI).

2.3.3.1. HIPERSENSIBILIDAD.

DEFINICION. Sensibilidad exagerada; estado anafiláctico o alérgico en el que el organismo reacciona a los agentes extraños más enérgicamente que de ordinario (5).

2.3.3.2. HIPERSENSIBILIDAD TIPO III O MEDIADA POR COMPLEJOS INMUNES.

En la enfermedad local por CI, la lesión ocurre como resultado de la localización de los inmunocomplejos sobre las superficies celulares o tejidos. El complemento se fija a la pared de los vasos sanguíneos; seguido por un influxo de polimorfonucleares, neutrófilos y más tarde células mononucleares; la interacción de las células fagocitarias con los complejos inmunitarios libera enzimas lisosómicas que lesionan el tejido adyacente (5).

La estructura de los complejos depende de varios factores; la proporción entre el Ag y el Ac; las valencias del antígeno y anticuerpo; la avidéz de los Ac y la participación de otros componentes del suero como el complemento. Los cambios en cualesquiera de estos factores pueden alterar la composición de un complejo y afectar su capacidad para inducir lesión inmunitaria (13).

La secuencia de acontecimientos en las lesiones sistémicas por inmunocomplejos, es similar a la que se observa en la enfermedad localizada por CI. El depósito de los complejos circulantes en las paredes de los vasos sanguíneos al parecer requieren

de un aumento de la permeabilidad vascular.

En parte esto puede llevarse a cabo por la liberación de aminas vasoactivas, por las plaquetas o por los basófilos activados por IgE.

Una vez alojados los complejos inmunes en los vasos sanguíneos: se activa el C', se liberan factores quimiotácticos, y los polimorfonucleares liberan enzimas lisosómicas. Estas, lesionan las paredes de los vasos, y se producen hemorragias, oclusión y cambios isquémicos en el tejido (14).

El depósito de los complejos en las paredes de los vasos se aumenta por el incremento de la presión hidrostática y por la turbulencia del flujo circulatorio.

En el LES los complejos DNA-antiDNA se correlacionan bien con la enfermedad. En esta enfermedad también se encuentran diversos complejos incluyendo aquellos que involucran a otros Ag nucleares o citoplasmáticos. Los complejos Ag-Ac de la hepatitis B se han implicado en la patogenia de algunos de los casos de poliarteritis nodosa y crioglobulinemia mixta; mientras que los antígenos de microorganismos infectantes se han encontrado en los inmunocomplejos de pacientes con vasculitis y paludismo (15).

CAPITULO III

3.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL.

3.1.1. DIAGRAMA DE ESTABLECIMIENTO DEL METODO (MODIFICACION DEL METODO DE NELSON)

DETERMINACION DE CR-1

CONTROL DE CALIDAD

Medir el CH50%
Estudio de Ac irregulares antieritrocito.

Verificar la
generación de C3b
por Contrainmuno-
electroforesis.

Pureza por inmuno-
electroforesis y títu-
lación. Ajuste del tí-
tulo entre 1:64 y 1:28,
utilizando glóbulos ro-
jos opsonizados con
Complemento.



Suero AB fresco, congelado
(fuente de Complemento)

Zimosan (activador de C')

Incubar 30 min; 37°C

Adicionar glóbulos rojos problema

Incubar 30 min; 37°C

Anti C3

Incubar 10 min; 37°C

Centrifugar y leer aglutinación



3.1.2. DIAGRAMA DE ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE REFERENCIA.

Población que puede
entrar al estudio con
los criterios de inclusión



Obtención de glóbulos
rojos en donadores al-
truistas del banco de
sangre del Instituto Na-
cional de Cardiología.



Conservación en solución
de Alsevers, y refrigera-
ción (4-8 C), hasta por
72 horas.

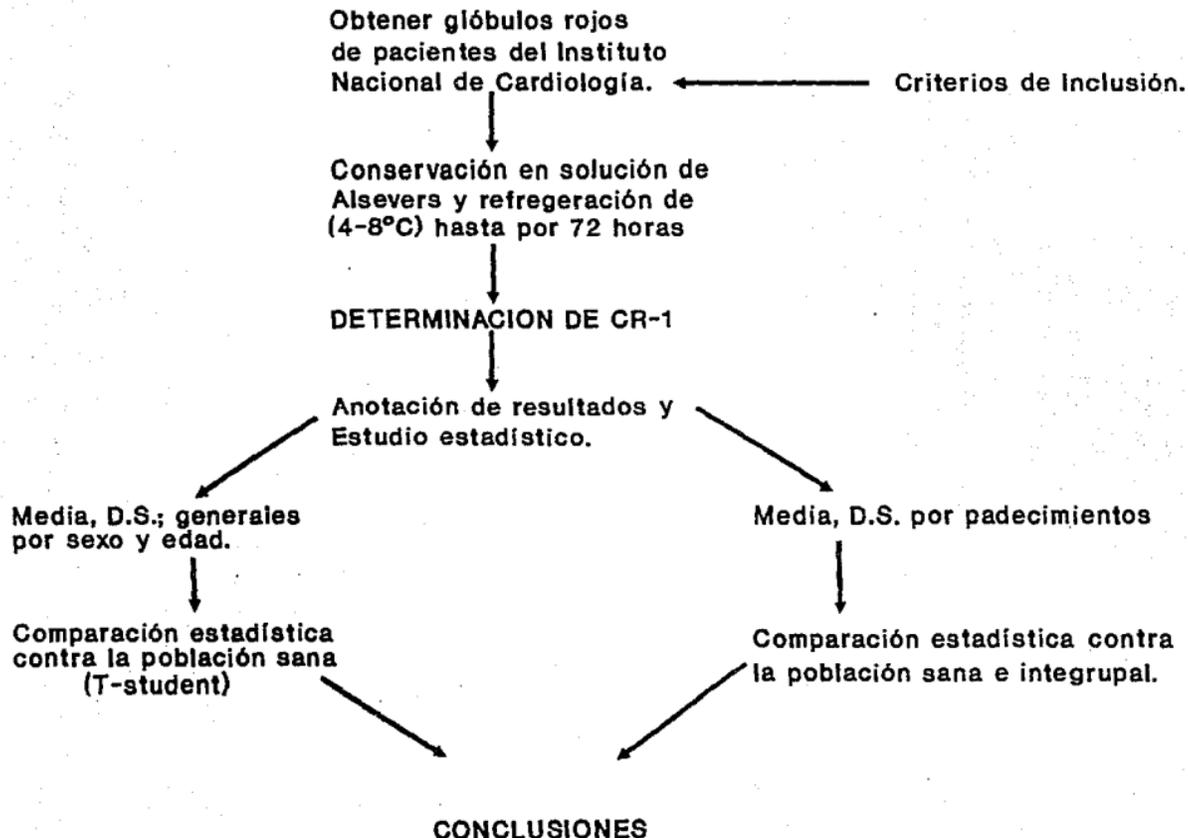


DETERMINACION DE CR-1



Anotación de resultados
y estudio estadístico:
(Media, D.S., general; y
por sexo y edad)

3.1.3. CUANTIFICACION DE CR-1 EN PACIENTES.



3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

DONADORES.- Se les tomó una muestra de sangre, por venopunción en condiciones estériles, y se le mantuvo en solución de Asevers por 72 hrs.

La selección de donadores se hizo de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión:

Tensión arterial: 80-120 mmHg \pm 10

Peso: más de 50 kg. Convulsiones: No

Diabetes: No Drogadicción: No

Sífilis: No Alergia: No

Hepatitis: No Vacunación reciente: No

Ictericia: No Productos con E.H.R.N.: No

Medicación reciente: No.

Brucelosis: No activa y los títulos menos a 1:80

Número de embarazos: No embarazo, no lactando. FUP más de 1 año.

Transfusión reciente: No en los últimos 6 meses.

Hemoglobina: Mujer más de 14 g/dl; Hombres 14.5 g/dl.

Sin datos evidentes de homosexualidad, bisexualidad, ni de otra condición de alto riesgo para SIDA.

Señas particulares tatuajes: No, en hombres no perforación de orejas.

PACIENTES: Se les tomó una muestra de sangre por venopunción en condiciones estériles, y se le mantuvo en solución de Asevers por 72 hrs. En éstos no se consideraron criterios de inclusión; fué un grupo de pacientes con diversas

enfermedades autoinmunes y cardiovasculares que incluyeron Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoide, Cardiopatía Congénita Acianógena, Hipertensión Arterial Sistémica, Cardiopatía Reumática Inactiva, Endocarditis Infecciosa y un grupo de misceláneos previamente diagnosticadas, sin tomar en cuenta si estaba la enfermedad activa o no, o si estaban bajo tratamiento.

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

Filtros y membranas Milipore 45um

Matraces Erlenmeyer 125, 250 ml

Pipeta automática y puntas (Gibson)

Pipetas serológicas 1, 5, 10 ml

Tubos de ensayo 12 X 75, 13 X 150 mm

Vasos de precipitados 50, 100, 250 ml

Agitador automático oscilatorio

Balanza analítica (Sartorius)

Balanza granataria (Sartorius)

Baño de agua termostable (Precision Scientific CO.)

Autoclave (AMSCO Cyclomatic Control)

Liofilizadora (Uni-Trap Virtis)

Cámara para electroforesis horizontal (Semi-Microelectrophoresis Chamber Gelman)

Fuente de poder (GELMAN)

Centrífuga refrigerada (Solvat)

Congeladora -70°C (REVCO)

Dilutor automático (Cooke Laboratory Dynatech)

Estufa termostática (Precision Scientific CO.)

3.2.3. REACTIVOS.

- Suero humano normal AB.- tomar una muestra de sangre, AB separar y obtener el suero, al cual congelar a -70°C, A una alícuota determinar CH50, y practicar la prueba de anticuerpos irregulares antieritrocito.

- Suero Anti C3 humano en chivo.- Obtener suero por purificación después de inmunizar con C3 humano a un chivo. Para comprobar que es monoespecífico, practicarle una inmunoelectroforesis, y titular. Guardar en alícuotas en refrigeración.

- Zymosan.- Preparar con Yeast, y hacer una suspensión en amortiguador barbital-veronal-gelatina, a pH 7.3, a una concentración final de 1mg/ml.

- Solución de Alsevers

- Amortiguador barbital-veronal-gelatina pH 7.3 (GVB)

- Amortiguador barbital-veronal-gelatina-EDTA pH 7.3 (GVB-EDTA)

- Amortiguador barbital-veronal-gelatina-albúmina 0.2% pH 7.3 (SAVB).

- Amortiguador barbital pH 8.6 para contrainmunolectroforesis, con una fuerza iónica de 0.05

- Amortiguador de barbituratos pH 8.2 para inmunoelectroforesis, con una fuerza iónica de 0.05.

- Solución salina fisiológica 0.9%

3.2.4. PREPARACION DE REACTIVOS.

Amortiguador de barbituratos pH 8.2 para inmunoelectroforesis.

Barbital sódico 47.6g.

Agua destilada 3lt.

Acido clorhídrico 1.15 N. 55ml.

Ajustar pH a 8.2 con HCl y llevar a 4265 ml con agua destilada.

Amortiguador de barbituratos pH 8.6 para contraimmunoelectroforesis.

Barbitural sódico 21.66g.

Hidróxido de sodio 10N. 10.16ml.

Agua destilada 2lt.

Ajustar pH a 8.6

Amortiguador barbital-veronal-gelatina pH 7.3 (GVB).

Cloruro de sodio 85g.

Diétil barbiturato de sodio 3.25g.

Acido diétil barbitúrico 5.72g.

Agua destilada 1800ml.

Gelatina 2g.

Cloruro de calcio 0.3M 5ml.

Cloruro de magnesio 1.0M 5ml.

Ajustar pH a 7.3, aforar a 3lt.

Para uso diluir 1:5 con agua destilada.

Solución Alsevers.

Acido cítrico 1.10g.

Citrato de sodio 1.60g.

Dextrosa 4.10g.

Cloruro de sodio 0.84g.

Ajustar pH a 6.1 y aforar a 200 ml.

GVB-EDTA

Stock GVB 20 ml.

EDTA 0.2M 20 ml.

Agua destilada 60ml.

SAVB

Stock GVB 20 ml.

Agua destilada 80ml.

Albúmina sérica bovina 0.1g.

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. FUNDAMENTO DE LA DETERMINACION DE CR-1: La fracción C3 de complemento, y en particular C3b, es la principal proteína opsonizante de la cascada del complemento. Su interacción con las células se efectúa a través de receptores, entre ellos CR-1. Esta interacción se cuantifica al promover la aglutinación de los glóbulos rojos opsonizados en presencia de anti - C3b. La cantidad de aglutinado será proporcional a la cantidad de C3b pegado.

3.3.2. TECNICA:

Preparar y rotular una serie de 8 tubos de ensayo de 10 X 75 mm

Agregar, a partir del 2do tubo, 50 ul de SAVB.

Al 1o. y 2do tubo añadir 50 ul de suero humano AB

Tomar 50 ul del 2do tubo y pasar al 3o , y así sucesivamente.

Agregar a todos los tubos 50 ul de zymosan. Mezclar e incubar a 37°C por 30min.

Añadir a cada tubo 50 ul de glóbulos rojos problema o control al 2%.

Mezclar e incubar a 37°C por 30min.

Centrifugar y lavar con SAVB.

Añadir 50 ul de anti C3 humano. Mezclar e incubar a 37°C por 10min.

Centrifugar a 3000 rpm por 10 min. Leer aglutinación.

CONTROL POSITIVO:

Preparar y rotular una serie de 8 tubos de ensayo de 10 X 75 min.

Agregar, a partir del 2do tubo, 50 ul de SAVB

Al 1o y 2do tubo añadir 50 ul de suero AB.

Tomar 50 ul del 2do y pasar al 3o, y así sucesivamente.

Agregar a todos los tubos 50 ul de zymosan. Mezclar e incubar a 37°C por 30min.

Añadir a cada tubo 50 ul de glóbulos rojos al 2% opsonizados

con complemento. Mezclar e incubar a 37°C por 10min.

Centrifugar a 3000 rpm por 10 min. Leer aglutinación.

CONTROL NEGATIVO:

Preparar y rotular una serie de 8 tubos de ensayo de 10 X 75 min.

Agregar, a partir del 2do tubo, 50 ul de SAVB

Agregar a cada tubo 50 ul de glóbulos rojos normales al 2%.

Mezclar e incubar a 37°C por 30min

Añadir 50 ul de anti C3 humano. Mezclar e incubar a 37°C por 10min.

Centrifugar a 3000 rpm por 10 min. Leer aglutinación.

CONTROL DE ANTI C3 HUMANO:

Control positivo:

Suero anti C3 humano diluido 1:64 más eritrocitos sensibilizados con complemento.

AGLUTINACION

Control negativo:

Suero anti C3 humano diluido 1:64 más eritrocitos no sensibilizados con complemento. NO AGLUTINACION

INTERPRETACION:

Reportar el último tubo que de aglutinación de ++.

Expesar el título por puntos.

Título	Puntaje
1	10
2	20
4	30
8	40
16	50
32	60
64	70
128	80

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. RESULTADOS:

Se formaron dos grupos de estudio uno de donadores normales y otro de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

El primero se estudió para el establecimiento de los valores de referencia, dado que no existen en la literatura.

El segundo es un grupo heterogéneo que comprende pacientes con diversas enfermedades autoinmunes o relacionadas, y que sólo tienen en común la base inmunológica (gráfica I).

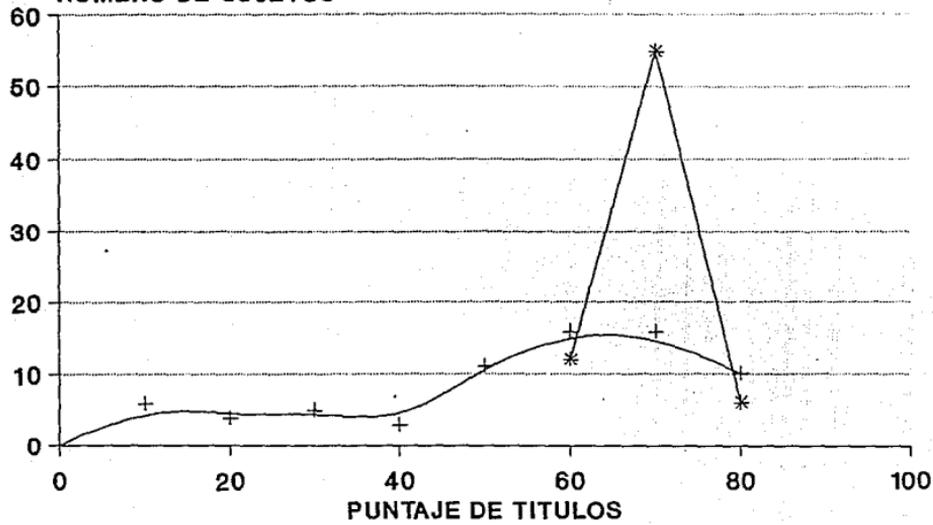
A cada uno de estos grupos se les cuantificó CR-1. Para esta técnica se empleó un método indirecto.

El grupo normal constó de 73 donadores altruistas (65.75% hombres y 34.25% mujeres) cuyas edades fluctuaron entre 18 y 45 años (Gráficas II, III y IV). Esta población se estudió globalmente y además por sexo y edad obteniéndose los siguientes resultados: (Cuadro No. I).

El grupo problema fué manejado de forma similar, pero se incluyó un análisis extra donde se toma como variable el padecimiento de base.

Los resultados se detallan en cuadro II. Gráficas V, VI y VII

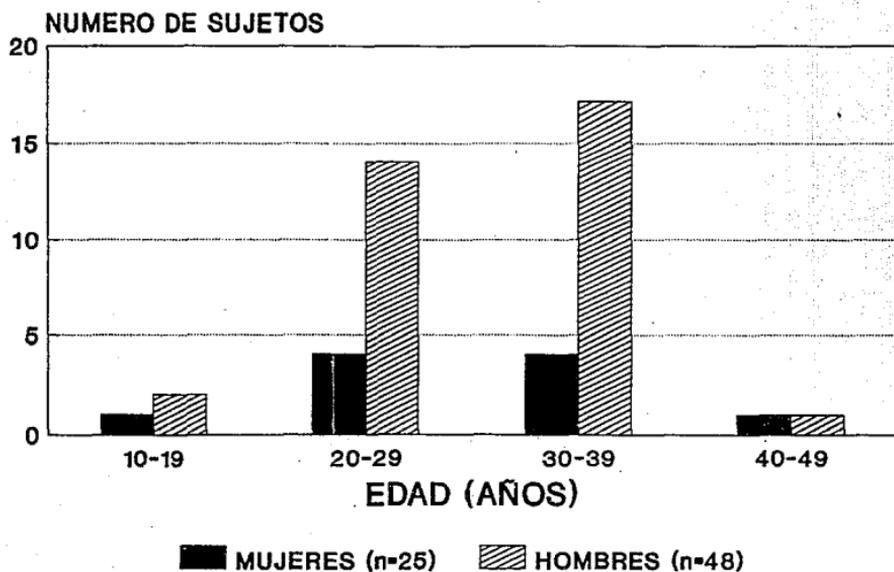
VALORES DE CR-1 DISTRIBUCION EN SUJETOS NORMALES Y ENFERMOS



*- SANOS (n=73) +- ENFERMOS (n=71)

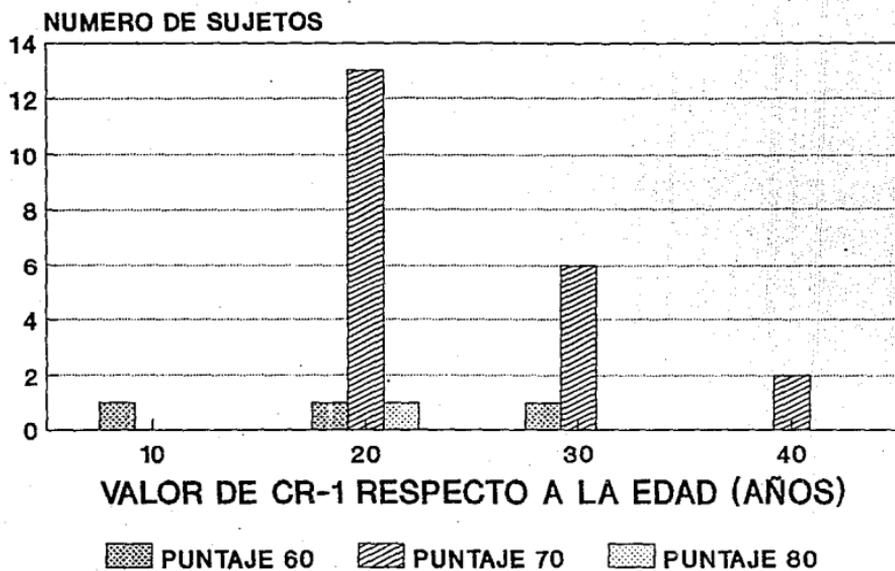
GRAFICA I.

FRECUENCIA DE EDADES EN 73 SUJETOS SANOS



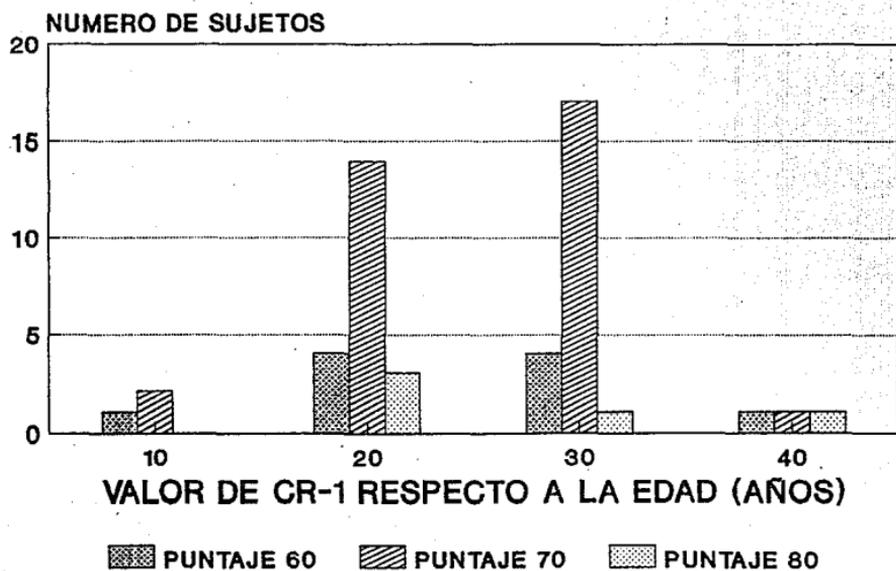
GRAFICA II.

VALORES DE CR-1 EN 25 MUJERES SANAS



GRAFICA III.

VALORES DE CR-1 EN 48 HOMBRES SANOS



GRAFICA IV.

CUADRO No. I**POBLACION NORMAL****Puntaje / Edad**

SEXO	n	X	DS	Sesgo	Kurtosis	r
Masc.	48(65%)	69.2/28.9	5.4/6.6	-0.1/0.4	3.4/2.6	0.064
Fem.	25(35%)	69.2/28.6	4/7.1	-0.7/0.6	5.9/2.4	0.02
TOTAL	73(100%)	69.2/28.8	4.9/6.7	-0.2/0.4	3.9/2.5	0.0

n= número

x= media

DS= desviación standar

r= correlación

CUADRO No. II
POBLACION ENFERMA

Puntaje / Edad.

Sexo	n	X	DS	Sesgo	Kurtosis	r
Fem.	43	50.2/35.8	22.8/16.2	-0.6/0.8	2.1/2.9	-0.297
Masc.	28	59.3/35.7	16.5/14.4	-0.8/0.6	2.9/2.9	0.141
TOTAL	71(100%)	53.8/35.8	20.9/15	-0.8/0.7	2.6/2.9	0.004

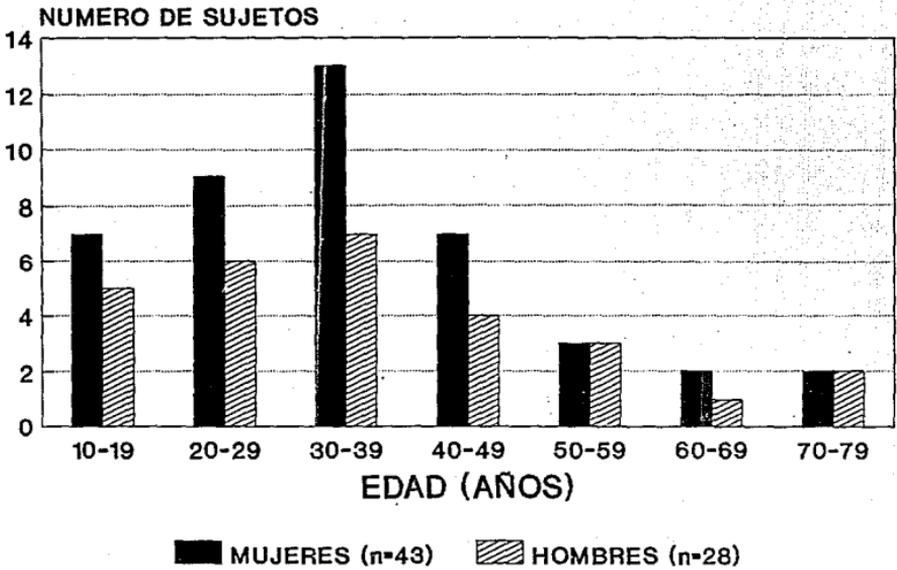
n= número

x= media

DS= desviación standar

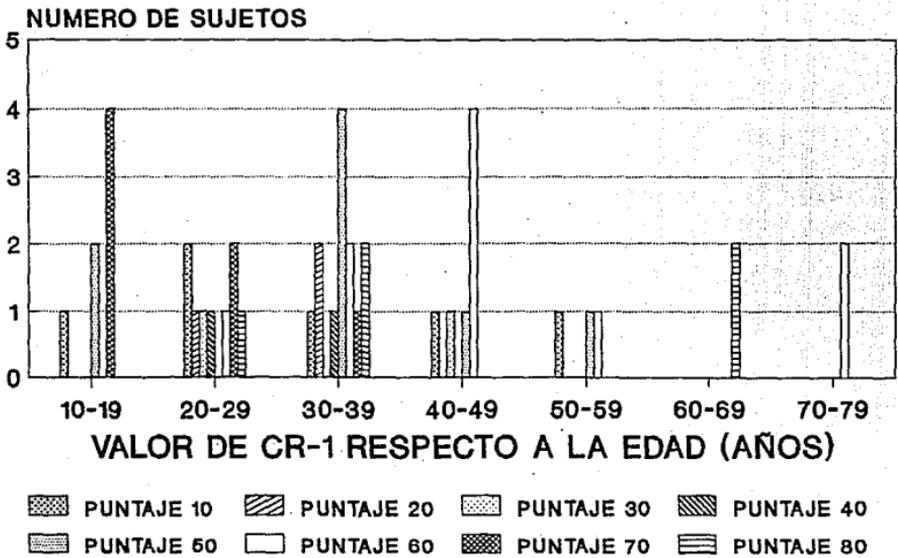
r= correlación

FRECUENCIA DE EDADES EN 71 ENFERMOS



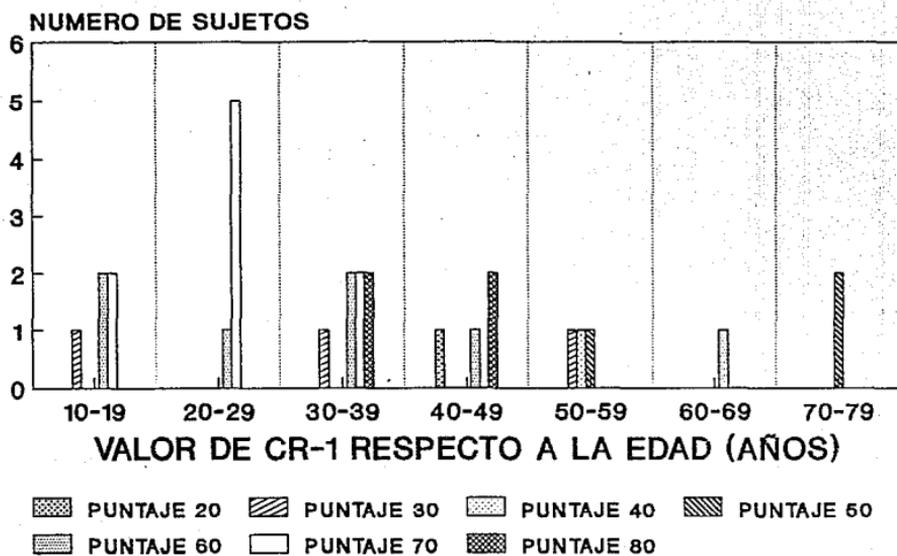
GRAFICA V.

VALORES DE CR-1 EN 43 MUJERES ENFERMAS



GRAFICA VI.

VALORES DE CR-1 EN 28 HOMBRES ENFERMOS



GRAFICA VII.

CUADRO No. III

Comparación de los puntajes medios de cada subpoblación entre sí.

DM vs. DF	t=0,027	$p(t > 2.64/71g) = 0.01$	NS
PM vs. PF	t=1.66	$p(t > 2.64/69g) = 0.01$	NS
DF vs. PM	t=2.9	$p(t > 2.67/51g) = 0.01$	Signif.
DM vs. PM	t=3.8	$p(t > 2.64/76g) = 0.01$	Signif.
DF vs. PF	t=4.7	$p(t > 2.65/66g) = 0.01$	Signif.
DS vs. P	t=6.02	$p(t > 2.61/142g) = 0.01$	Signif.
DM vs. PF	t=6.3	$p(t > 2.63/89g) = 0.01$	Signif.

DS= donadores sanos

DM= donadores masculinos

DF= donadores femeninos

P= total de pacientes

PM= pacientes masculinos

PF= pacientes femeninos

NS= no significativo

CUADRO No. IV

Comparación de los puntajes medios de cada patología vs. donadores.

CRI	t=0.63	$p(t > 2.63/85g) = 0.01$	NS
CCA	t=3.44	$p(t > 2.64/77g) = 0.01$	Signif.
HAS	t=3.44	$p(t > 2.64/77g) = 0.01$	Signif.
MISC	t=2.21	$p(t > 2.63/82g) = 0.01$	NS
LES	t= 12.79	$p(t > 2.62/87g) = 0.01$	Signif.
AR	t=7.36	$p(t > 2.63/84g) = 0.01$	Signif.
EI	t=5.0	$p(t > 2.64/74g) = 0.01$	Signif.

CRI= Cardiopatía Reumática Inactiva.

CCA= Cardiopatía Congénita Acianógena.

HAS= Hipertensión Arterial Sistémica.

MISC= Miscelaneos.

LES= Lupus Eritematoso Sistémico.

AR= Artritis Reumatoide.

EI= Endocarditis Infecciosa.

NS= No Significativo.

4.2. DISCUSION

En el presente trabajo de tesis se persiguieron primordialmente dos objetivos: 1) el desarrollo y evaluación de una técnica capaz de cuantificar la densidad eritrocitaria de receptores CR-1, y; 2) la aplicación de dicha técnica como medio de diagnóstico diferencial para aquellas enfermedades autoinmunes, donde muchas de las secuelas se deben al manejo defectuoso de los complejos inmunes.

Para la consecución del primer objetivo, se implementó una técnica Inmunológica basada en las pruebas de la antiglobulina humana indirecta y de fijación de complemento.

Los reactivos empleados fueron preparados y normalizados tal como se indica en el apartado correspondiente, y probada su reactividad y especificidad para asegurar la reproducibilidad de la técnica.

1.- El suero humano normal AB, usado como fuente de complemento tuvo un CH50% de 160 Us, lo cual aseguró una concentración óptima de complemento, para la generación de C3b, durante la reacción. Así mismo, la búsqueda de anticuerpos irregulares antieritrocito (que pudieran intervenir en la formación de aglutinados con las células problema) fué negativa.

2.- El suero de chivo anti C3 humano fué titulado, obteniéndose un título de 1:64/1:128. Su especificidad se probó por contrainmunolectroforesis contra suero humano normal con y sin activación con zymosan. Los corrimientos electroforéticos sólo mostraron la banda C3-anti C3.

3.- Todos los demás reactivos fueron obtenidos comercialmente habiéndoseles

sometido exclusivamente al control de calidad respectivo.

La evaluación de la técnica se hizo empleando para ello una población de donadores de sangre, tomados al azar y que cubrían los requisitos solicitados por la Secretaría de Salud en el reglamento correspondiente al manejo de Banco de Sangre.

La muestra constó de 73 donadores altruistas: 48 hombres (65%) y 25 mujeres (35%). Con una edad que fluctuó entre 18 y 45 años, con una media de 28.9 ± 6.6 y 28.7 ± 7.2 años, respectivamente.

A cada sujeto se le cuantificó la densidad eritrocitaria de CR-1 con la técnica descrita, tomando como punto final de la titulación la última dilución que presentara una aglutinación de ++. Se registró este valor y se le asignó el puntaje correspondiente.

De acuerdo a los resultados de la población normal, se observa que los valores encontrados para CR-1 se encuentran entre 65 y 75, siendo la dispersión muy baja, tal como se demuestra por el sesgo encontrado; sin embargo cuando se analiza de acuerdo al sexo, se nota que las mujeres tienden a tener valores menores aunque estos no bajan mucho, concentrándose alrededor de la media tal como lo demuestra la kurtosis encontrada. En esta misma población se buscó si la densidad eritrocitaria de CR-1 estaba influida por la edad, lo cual se niega apoyándonos en los valores del coeficiente de correlación que son cercanos a cero.

Con los datos encontrados para esta población, se puede entonces proponer que éstos pueden servir como valores de referencia; cumpliéndose así uno de los objetivos de esta tesis.

Estos valores a los que se hace referencia quedan entonces de la siguiente manera:

$$VN = x + 2 DS = 70 \pm 10$$

Se considera este valor como válido para toda la población normal dado que no existe diferencia entre hombres y mujeres.

(ver cuadro No.III: DM Vs DF)

De acuerdo al cuadro No. II se observa que los valores encontrados para la población enferma, en general, son más bajos que en la población normal; sin embargo, a diferencia de esta última la dispersión de los valores es más alta, pero tienden hacia los valores bajos. Por otro lado esta dispersión no se concentra en algún valor en particular (dispersión plana) tal como lo demuestran las kurtosis.

Cuando esta población se analiza por sexo se nota que las mujeres tienden a tener valores más bajos que los hombres; sin embargo, estadísticamente no existe diferencia alguna (una probable explicación a esto puede deberse a la cantidad de mujeres estudiadas comparativamente al número de hombres). Por otro lado llama la atención que la correlación existente entre densidad CR-1 y edad sea más alta (o más baja) que la población normal, así se tiene que para la población masculina la correlación es positiva y para la población femenina es negativa, indicando esto que la mujer es más susceptible a presentar valores menores conforme aumenta su edad. No sabemos si este hallazgo sea o no una consecuencia directa de la mayor susceptibilidad de la mujer a los padecimientos autoinmunes, o si sea consecuencia de la fisiología de la mujer (estímulo hormonal), aunque esto último sea menos

factible ya que no se observa en la población femenina normal.

Como se dijo en un principio, el grupo de pacientes es un grupo muy heterogéneo, dado que comprende a pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes o enfermedades relacionadas a éstas. Esta característica nos hizo entonces subagrupar por enfermedad y comparar cada subgrupo, contra el grupo normal. Los resultados se encuentran en el cuadro No. IV donde resalta que aquellos padecimientos sin base inmunológica, o que teniendo una base inmunológica, pero que se encuentran inactivos, no presentan una disminución de sus receptores CR-1, a diferencia de los demás subgrupos.

Llama también la atención que uno de los subgrupos, específicamente HAS, presenta valores bajos aun cuando no sea una enfermedad Inmunológica sino más bien un Síndrome que pudiera estar asociado a otra patología Inmunológica.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que la técnica es reproducible y confiable.

Se logra demostrar la disminución en el número de receptores CR-1 en pacientes con enfermedades inmunológicas (LES, AR), así como en el grupo de hipertensos, la disminución sugiere asociación con fenómenos inmunológicos en la etiología de la hipertensión de estos casos; existiendo así una relación entre la presencia de enfermedad inmunológica y el descenso en el número de receptor CR-1.

La relación es inversa en cuanto al número de receptores CR-1 y el grado de actividad de la enfermedad inmunológica.

Siendo el sexo femenino parte del perfil clínico de algunas de las enfermedades estudiadas, la disminución de receptores CR-1 plantea la posibilidad de su participación como factor predisponente del desorden inmunológico.

La edad no parece ser factor importante en la disminución de receptor CR-1, ya que sólo se encuentra en la población enferma.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Berger M, Galther T.A., And Frank M.M.: Complement receptors. Clin. Immunol, 1: 475-545. (1983).
- 2) Borsos T. Immunoglobulin classes and complement fixation. In progress In Immunology, Edited by. B. Amos. Academic, New York. (1971).
- 3) Borsos T., Chapuis R.M., and Longone J.J.: Distinction between fixation of C1 and activation of complement by natural IgM anti body: Immunol 18: 863-868 (1981).
- 4) Borsos T. And Rapp H.J.: The molecular basis of complement action Appleton Century-Crofts. New York, (1970).
- 5) Brostoff J. Atropic allergy and other hypensensitivities. Current opinion in Immunol. 1: 679-683, (1989).
- 6) Cochran C., G. Kofler D.: Immune complex disease in experimental and man. Adv. Immunol. 16: 185-254, (1973).
- 7) Cooper N.R. The lassical complement component. Adv in Immunology. 151-216. Academic, New York. (1985).
- 8) Char. A.R., Karp D.R., Sherefflen D.C., and Atkinson J. The 20 faces of the four component of complement. Immunology Today, 5: 200 (1984).
- 9) Fauci A.S., Haynes B.F., Kats P. Spectrum of vasculitis clinical pathologic, Immunologic and therapeutic concideration. Ann Intern

Med. 89: 660-676, (1978).

- 10) Gaither T.A., Hammer, C.H., and Frark M.M. Studies of the molecular mechanisms of C3b inactivation and a simplified assay of BIH and the C3b inactivation. J. Immunopathol. 6: 259. (1978).
- 11) González-Ortega M.E., Cortés J.J., Reyes P.A. Receptor CR-1 en enfermedades "inmunes" observaciones preliminares y potencial patogénico. Memorias del congreso de reumatología. México D.F. (1985).
- 12) Humphrey J.A., and White R.G. Complement and other auxiliary factors. In Immunology for student of medicine, 2:188-203 (1970).
- 13) Ishizaka K. Isizada T.: Allergy fundamental Immunology. Raven prees 867-888. (1989).
- 14) Keer M.A.; The second component of human complement. Methods Enzymol. 80: 54 (1981).
- 15) Librado Ortíz O., Inmunología. Ed Panamericana México (1986).
- 16) Lobato Mendizabal E., Cordoba M.E., González-Ortega M.E., Reyes P.A.: Anemia hemolítica asociada a infección por Micoplasma y el Receptor C3b en eritrocitos autólogos. Memorias del congreso de Reumatología. Zacatecas (1986)..
- 17) Medicus R.G., Essen A.F., Fernández H.N., and Muller Eberhard H.J. Native and activated properdin. Interconvertibility and identify of aminoacid carboxy terminal sequences. J. Immunol. 124: 602-606. (1980).

- 18) Medof M.E., Iida K., Meld C. and Nussenzweig V. Unique role of the complement receptor CR-1 in the degradation of C3b Associated whit Immune complexes. J. Clin Invest. 71: 236-247. (1982).
- 19) Metzger H. Alcaraz, Hohman R. The receptor with affinity for Immuglobulin E. Ann Rev Immunol 4: 419-430. (1986).
- 20) Muller Eberhard H.J. Complement. Ann Rev Biochem. 14: 697.(1988).
- 21) Nelson R.A. The immune adherence Phenomenon and immunologically especific reaction between microorganisms and erithrocytes leading to enhanced phagocytis. Adv. Immunol 8: 733-737. (1953).
- 22) Ogleby T.I., Accaritti M.A. and Volarahis J.E. Evidence for a C4b binding site on the C2b domain of C2. J. Immunol 141: 926-931. (1988).
- 23) Panglurr M.K. Activation of complement via the alternative pathway. Fed. Proc. 42: 139 (1983).
- 24) Peter F., Kohler M.D. Disease manifestation in systemic lupus erythematosus and hepatitis b virus infection. Clinical Immune Complex disease. 52: 419-423. (1973).
- 25) Ross G.D., and Medoff M.E. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. Ad Immunol. 37: 217. (1985).
- 26) Walport M.J. and Lachman P.J. Erythrocyte complement receptor type 1, Immune complex and the rheumatic diseases. Arthritis Rheum. 31: 153. (1988).