

Tesis de Posgrado

Complejos inmunes circulantes

Riera Cervantes de Tomasello, Norma Edith

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Riera Cervantes de Tomasello, Norma Edith. (1987). Complejos inmunes circulantes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2036_RieraCervantesdeTomasello.pdf

Cita tipo Chicago:

Riera Cervantes de Tomasello, Norma Edith. "Complejos inmunes circulantes". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2036_RieraCervantesdeTomasello.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES"

AUTORA: NORMA EDITH RIERA CERVANTES DE TOMASELLO

DIRECTORA: MARIA MARTA DE ELIZALDE DE BRACCO



LUGAR DE TRABAJO: SECCION INMUNOLOGIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS

(IIHEMA). ACADEMIA NACIONAL DE BUENOS AIRES

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE: DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

BUENOS AIRES, 1986

2036

ej. 2

A la memoria de mis padres
y de mi hermano Horacio

A mis hermanos

A mi marido

.....
"Cuántas cosas
debe callar el corazón
y cuánto tiene que negar
la Mente!

Qué precio elevado
es el precio de la vida,
de la vida diaria,
con nosotros y en medio
de todos.

A cambio de un lenguaje
convencional,
para que todos entiendan
aunque ninguno comprenda"

.....

La Plata- Poesía-1970
Carlos A.Riera Cervantes.-

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr Enrique P.Cottini la lectura y crítica de este trabajo, pero fundamentalmente el padrinazgo ejercido desde mi iniciación técnica-científica, en el Instituto de Investigaciones Médicas (actual Instituto Lanari). Su indeclinable estímulo y confianza me facilitaron la introducción en el campo científico.

Agradezco a la Dra María Marta de E. de Bracco, por la total dedicación y confianza brindada. Muy especialmente por haber hecho posible este trabajo como integrante de la Carrera de Apoyo, del CONICET. Como Directora de Tesis, la Dra Bracco, me permitió un mayor acercamiento al planteo y discusión científica despertando así la necesidad de una más comprometida participación en los proyectos de investigación.

Expreso un sincero reconocimiento a la Dra M. Fejes por su participación en los estudios de neutropenia y por el estímulo brindado; a la Dra M. del C. Sasiain y al Bioquímico J. Geffner por la colaboración en los trabajos de supresión y solubilización respectivamente; a los Dres N. Mondini, J. Fernandez, del IIHEMA y J. Manni, del Instituto Lanari, por la selección de los pacientes neutropénicos, hemofílicos y lúpicos respectivamente; a la Srta M. Felippo y a la Sra G. de Rojas por la eficiente colaboración técnica, a todos los integrantes de la Sección Inmunología por consolidar la realización de este trabajo y a la Sección Dadores, del IIHEMA por la cordial recepción a los pedidos de muestras de sangre.

Agradezco a los Dres S. Olabuenaga y M. Isturiz por la dedicación brindada a la lectura y corrección de este trabajo.

Finalmente agradezco al CONICET por el apoyo económico brindado.-

INDICE

| | <u>página</u> |
|--|---------------|
| INTRODUCCION | 1 |
| a) Respuesta Inmune..... | 4 |
| b) Clases de anticuerpos..... | 8 |
| c) El Sistema Complemento (C)..... | 15 |
| d) Generalidades de los complejos inmunes (CI)..... | 25 |
| e) Receptores Fc y C..... | 27 |
| f) Posibles efectos de los CI sobre el sistema inmune..... | 31 |
| g) Métodos de detección de Complejos inmunes circulantes (CIC)..... | 33 |
| h) Importancia de los CIC en diversas patologías... | 36 |
| a) Lupus eritematoso sistémico (LES)..... | 36 |
| b) Neutropenia..... | 37 |
| c) Hemofilia..... | 38 |

MATERIALES Y METODOS

| | |
|---|----|
| a) Pacientes | |
| a-1) LES..... | 41 |
| a-2) Neutropenia..... | 43 |
| a-3) Hemofilia..... | 45 |
| b) Sueros..... | 48 |
| c) Gamma globulina agregada..... | 48 |
| d) Determinación de Complejos inmunes circulantes..... | 49 |
| d-1) Precipitación de CIC:I-Principios II-Procedimiento..... | 49 |
| d-2) C1q en fase sólida : I-Principios..... | 49 |
| II-Procedimiento para la pu- rificación del C1q..... | 50 |
| III-Procedimiento del ELISA. | 51 |

| | página |
|--|--------|
| e) Niveles séricos de inmunoglobulinas..... | 53 |
| f) Valoración del Sistema Complemento | |
| f-1) Niveles séricos de C3 y C4..... | 54 |
| f-2) Nivel hemolítico total (CH50)..... | 54 |
| f-3) Actividad de la Vía Alternativa del complemento (VAC)..... | 54 |
| f-4) Solubilización de CI marcados con ¹²⁵ I..... | 54 |
| g) Células..... | 55 |
| g-1) Viabilidad celular..... | 56 |
| h) Inmunofluorescencia..... | 56 |
| i) Leucoaglutinación..... | 57 |
| j) Función Supresora inducida por Concanavalina A (Con A) | |
| j-1) Primer cultivo (fase de Inducción)..... | 57 |
| j-2) Segundo cultivo (fase de proliferación)..... | 58 |
| k) Estadística..... | 59 |
| l) Colaboración..... | 59 |
| <u>RESULTADOS</u> | 60 |
| a) Pacientes con LES..... | 60 |
| b) Pacientes con Neutropenia | 66 |
| c) Pacientes hemofílicos..... | 71 |
| <u>DISCUSION</u> | 80 |
| A) LES..... | 83 |
| Conclusiones..... | 86 |
| B) Neutropenia..... | 87 |
| Conclusiones..... | 91 |
| C) Hemofilia..... | 92 |
| Conclusiones..... | 97 |
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 98 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 100 |

INTRODUCCION

La introducción de una sustancia extraña (antígeno) en un organismo vivo, provoca una respuesta específica, defensiva y fisiológica que se manifiesta por la producción "de novo" de proteínas (anticuerpos), capaces de unirse al antígeno (Ag) para eliminarlo del organismo, valiéndose, en algunos casos de la coparticipación de sistemas efectores solubles tales como el sistema complemento (C) y/o celulares como monocitos, histiocitos, células del sistema reticuloendotelial (SRE), granulocitos polimorfonucleares (PMN) (1). La capacidad de respuesta humoral ha sido descrita en los Ciclóstomos (2) que son vertebrados menos evolucionados y en los vertebrados más evolucionados de la escala filogenética.

La unión resultante del Ag y el anticuerpo (Ac) constituye la pareja: complejo inmune (CI). El número de antígenos (Ags) a los que el individuo está expuesto durante su vida es elevadísimo y cada uno de ellos induce la producción de Ac. Esta respuesta inmune específicamente adquirida actúa aumentando la eficiencia de mecanismos no específicos y primitivos como el de la fagocitosis.

Los CI pueden circular, desplazarse en el plasma sanguíneo y redistribuirse por el organismo. Estos CI circulantes (CIC) son manejados normalmente, en gran parte por el SRE. Un desequilibrio en la respuesta inmune puede favorecer la permanencia de los CIC, permitiendo la deposición de los mismos en diferentes órganos (glomérulo renal, plexo coroideo, células de las paredes endoteliales de los vasos sanguíneos, pulmones).

El efecto perjudicial de los CIC fue señalado por Von Pirquet en 1911 (3) quien propuso que el comienzo y el curso de la enfermedad del suero provenía de los efectos tóxicos de sueros heterólogos (ej: suero antidiftérico), inyectados a los pacien-

tes en grandes dosis con fines terapéuticos y eran la consecuencia de la interacción entre el Ag presente en la circulación y el Ac del huésped.

El rol patogénico de los CIC fue demostrado por los trabajos de Germuth (4,5) y Dixon y col (6,7) quienes valiéndose de un modelo experimental de la enfermedad del suero en conejos, demostraron que el comienzo de la glomerulonefritis y la vasculitis coincidía con la aparición de CIC, descenso de la actividad de C en suero y deposición de CIC en los sitios dañados.

La valoración de los niveles de CIC en suero y fluído intersticial resultó de gran interés y se desarrollaron así numerosas técnicas apoyadas en distintas propiedades físicas y biológicas de los CIC.

El objetivo de esta Tesis consiste en responder a las siguientes preguntas:

1°-¿Ofrecen un valor diagnóstico y/o pronóstico en sí mismas, las determinaciones de los niveles de CIC en sueros patológicos?

2°-¿Se requiere para tal evaluación el estudio conjunto de otros parámetros humorales (niveles séricos de inmunoglobulinas, sistema complemento)?

3°-En las patologías asociadas con niveles elevados de CIC carentes de alteraciones detectables del sistema C ¿Es posible correlacionarlos con estudios "in vitro" de inmunidad celular?

Para el desarrollo de este trabajo se seleccionaron las siguientes patologías: Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Neutropenia y Hemofilia, como sujetos de alto riesgo (SAR) de contraer el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

A continuación se desarrollan los siguientes temas:
a) Respuesta Inmune; b) Clases de anticuerpos; c) El sistema complemento; d) Generalidades de los complejos inmunes; e) Receptores Fc y de C; f) Posibles efectos de los CIC sobre el sistema inmune; g) Métodos de evaluación de CIC; h) Importancia de los CIC en diversas patologías.

a) Respuesta Inmune

Los individuos reaccionan frente a una invasión microbiana con mecanismos de defensa que son ejercidos por fagocitos y por la actividad bactericida de los sueros, caracterizadas como respuestas inespecíficas y de rápida expresión.

La respuesta específica humoral (inmunidad humoral) está representada por los Ac, que son moléculas de inmunoglobulinas (Igs).

En los vertebrados, las células B, que poseen Igs sobre la membrana plasmática (8,9,10) al ser estimuladas en forma apropiada, proliferan y sufren cambios morfológicos transformándose en células plasmáticas. Estas últimas sintetizarán y liberarán a la sangre y a los tejidos las moléculas de Ac que actuarán combinándose con las toxinas bacterianas, neutralizándolas y se unirán a los Ags de la superficie bacteriana favoreciendo la acción fagocítica.

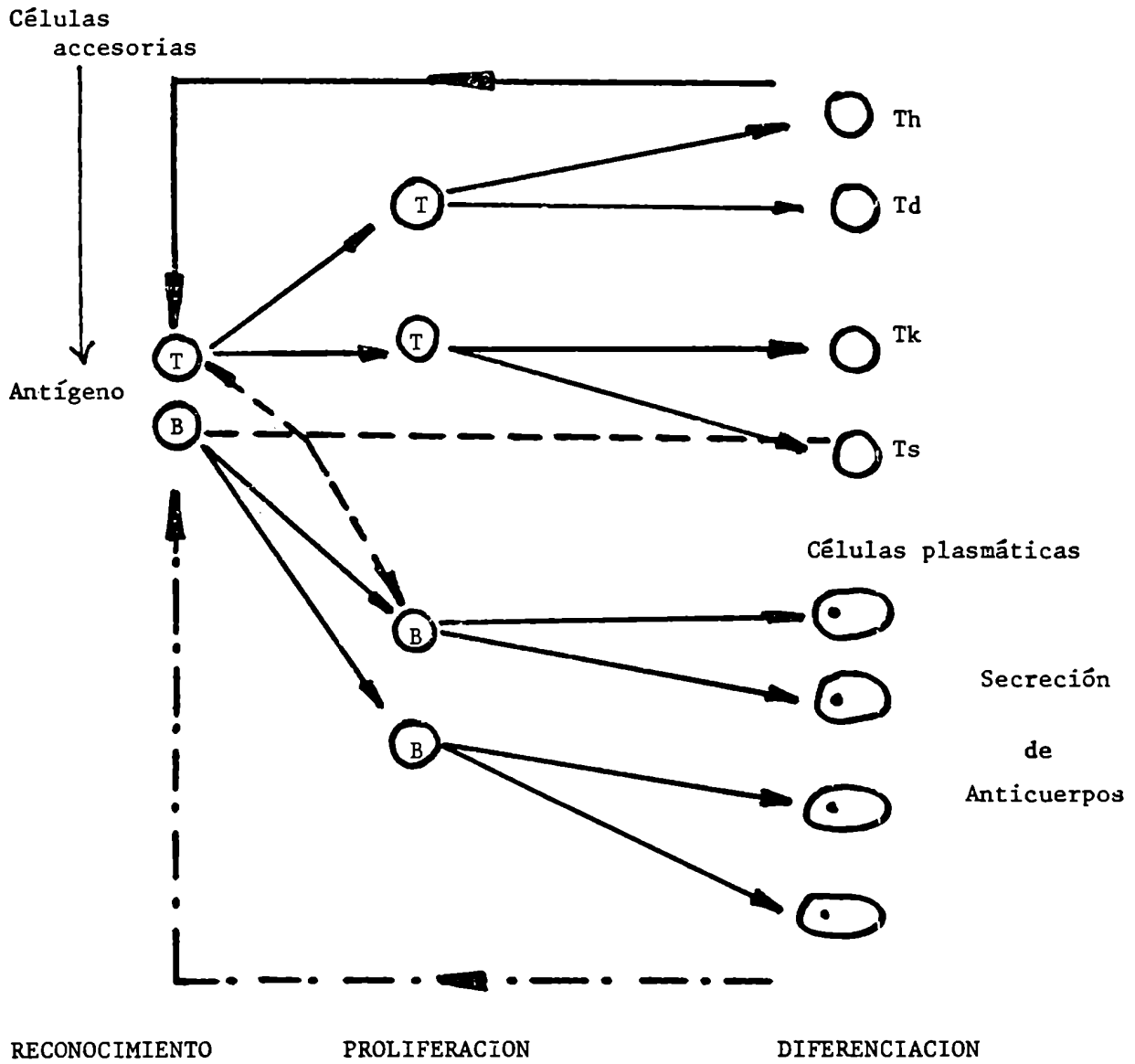
La respuesta inmune específica celular, mediada obviamente, por células, abarca a linfocitos T, que con una adecuada estimulación proliferan y se diferencian, al menos en cuatro subpoblaciones funcionales; a) células colaboradoras (Th), ; b) células que efectuarán reacciones de hipersensibilidad retardada (Td), c) células citotóxicas (Tk) y d) células supresoras (Ts).

Las Th cooperan con las células B (figura 1) en inducir la formación de Ac y las Ts ejercen un mecanismo para limitar la extensión de la respuesta inmune, mientras que Td y Tk están involucradas en mecanismos inmunes efectores.

En el montaje de la respuesta inmune intervienen también células accesorias (macrófagos, células dendríticas) que son indispensables para el procesamiento y presentación

antigénica para que los antígenos convencionales sean una señal válida capaz de disparar la respuesta de células Th. Otras células como las Ts pueden responder directamente a Ag solubles. Existen también dentro del conjunto de las células del sistema inmune células citotóxicas no estrictamente asimilables a la progenie T, conocidas como células NK, capaces de intervenir directamente en la eliminación de células tumorales o células infectadas con virus.

Figura 1



Leyenda de la figura 1

Los inmunogénos son procesados por el macrófago (célula accesoria) para luego ser presentado a células T y B específicamente reactivas. Las células B son estimuladas para proliferar y luego diferenciarse a células plasmáticas que sintetizarán y secretarán los anticuerpos específicos. Por su lado las células T proliferan y se diferencian en por lo menos cuatro subpoblaciones: 1) Th (colaboradoras), 2) Td (intervienen en las reacciones de hipersensibilidad retardada), 3) Tk (citotóxicas) y 4) Ts (supresoras).

b) Clases de Anticuerpos

En el hombre se han determinado cinco clases de Igs con función Ac: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD (11).

La unidad básica estructural está dada por cuatro cadenas: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L).

La especificidad de clase está dada por la cadena H y se designa por una letra griega (Figura 2).

La IgG y la IgA a su vez se dividen en subclases de acuerdo a los determinantes específicos que presenten en la cadena H. Las subclases se indican con números arábigos.

Las cadenas L se identifican como kappa (κ) o lambda (λ); no son específicas de clase. El número de Ig, en el suero humano con cadenas κ aproximadamente duplica el número de Ig con cadenas λ .

Las Igs difieren en longitud, ubicación, número de puentes disulfuro, número de dominios, grados de polimerización, secuencia de aminoácidos, (Tabla N°1).

Las diferentes clases, subclases y tipos de Ig son llamadas isotipos. Los isotipos están presentes en todos los individuos como producto de diferentes genes estructurales.

Cada cadena de Ig puede ser dividida en dos regiones: la región variable (V) y la región constante (C). La región C es la porción carboxi-terminal de la cadena y posee la misma estructura primaria en todas las cadenas de la misma clase, subclase y tipo. A su vez cada cadena se divide en dominios que se designan como V_L, C_L, V_H, C_H .

La Ig más abundante en suero es la IgG, consiste de dos pares de cadenas H y L unidas por puentes disulfuro. Una enzima proteolítica (papaína) parte la IgG en tres fragmentos que retienen su actividad biológica: dos fragmentos Fab, para ligar el Ag y un fragmento Fc (cristalizable) (Figura 3). Cada fragmento Fab contiene un sitio de unión al Ag. El fragmento Fc contiene los sitios que median la mayor parte de las funciones biológicas de las Igs.

La IgG está distribuída en cuatro subclases (IgG1, 2, 3, 4) (Tabla N°2), que difieren en la capacidad de fijar C. La IgG1 y la IgG3 son más efectivas en fijar complemento; la IgG4 sólo puede hacerlo después del clivaje proteolítico. Esta propiedad parece estar asociada principalmente con el dominio CH2 (Figura 3). Las distintas subclases de IgG pueden agregarse espontáneamente, tienen distinta afinidad por la proteína A del Staphilococcus aureus y pueden atravesar la placenta (Tabla N°2).

La IgA se encuentra en concentraciones relativamente bajas en suero y tejidos. Sin embargo se halla en altas concentraciones en secreciones externas seromucosas en forma de dímeros y contiene una cadena adicional que se llama componente secretorio, la molécula completa se designa como IgA secretoria (sIgA).

En el suero humano normal la IgA se encuentra como monómero y se han detectado dos subclases (IgA1 y 2)

La molécula de IgM es un pentámero compuesto de cinco subunidades y de una cadena (no inmunoglobulínica) J. La IgM no atraviesa la placenta de la madre al feto; si bien puede ser sintetizada por el feto en caso que haya sido expuesto a un Ag. Tiene un papel importante en la respuesta inmune primaria. Está localizada predominantemente en el es-

pacio intravascular, su recambio es rápido; puede aglutinar bacterias, interviene en reacciones citotóxicas y citolíticas dependientes de C.

La IgE contiene la mayoría de sus moléculas asociadas biológica e inmuquímica a los Ac reáginicos. Los Ac de tipo IgE se unen reversiblemente con alta afinidad a receptores específicos de la membrana de basófilos y mastocitos. En ciertas parasitosis se encuentran concentraciones elevadas de IgE séricas.

La IgD está presente en pequeñas cantidades en el suero humano normal. Se encuentra sobre la membrana de los linfocitos humanos en altas proporciones, normalmente en asociación con otra clase de Ig (frecuentemente con IgM). La IgD actuaría como receptor para el Ag o bien estaría involucrada en la respuesta de las células B, no obstante su función específica aún no ha sido demostrada (12)

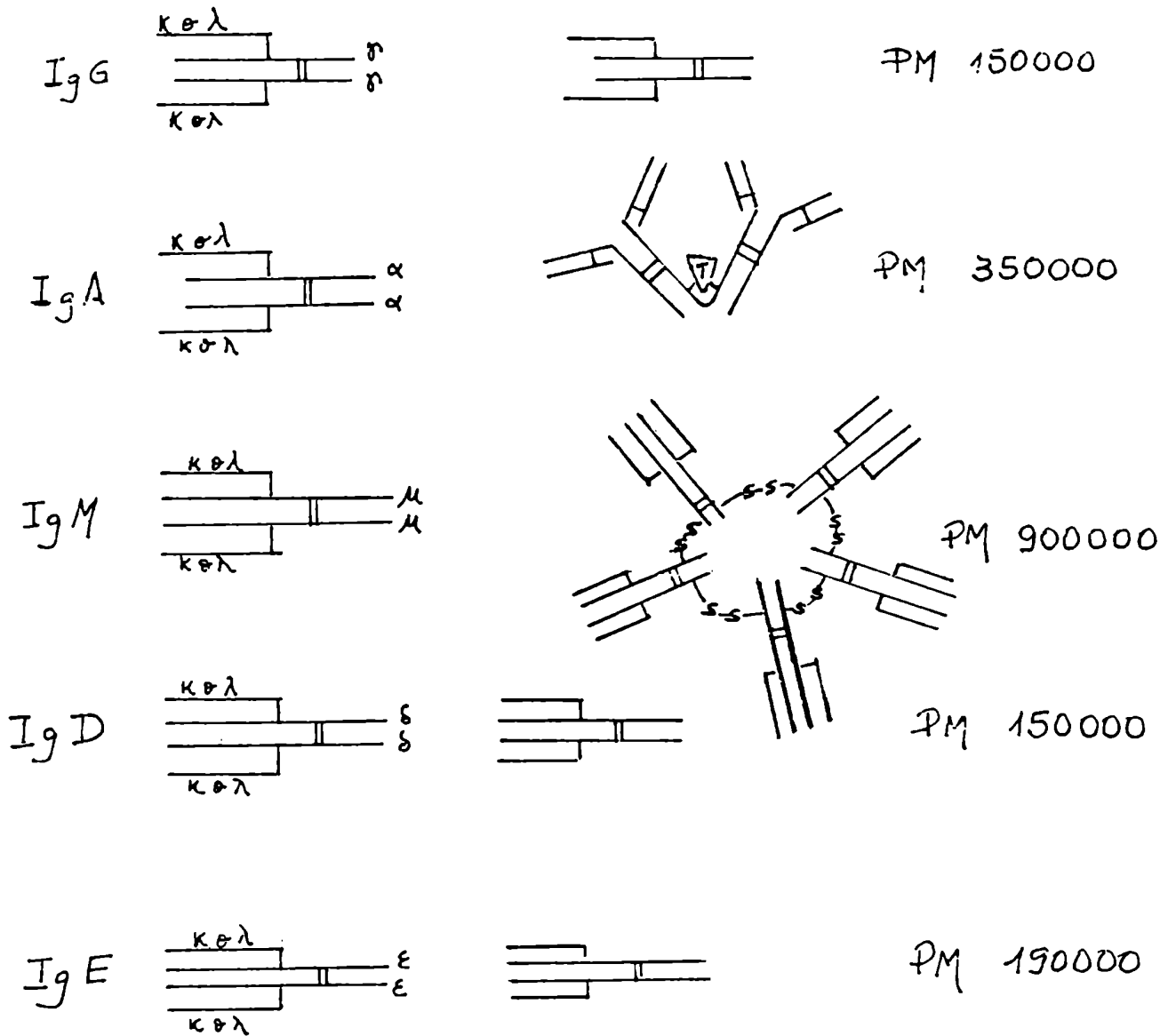
Los alotipos son variantes genéticas de las Igs, se heredan de acuerdo a las Leyes de Mendel y residen principalmente en la región constante (C) de la cadena pesada (H).

Los idiotipos son determinantes antigénicos localizados sobre la región variable (V) y corresponde al sitio de unión específico que contiene la molécula de Ac.

Las cadenas H y L pueden unir específicamente el Ag para el cual está dirigido el Ac, sin embargo la cadena H es más fuerte. Los sitios de combinación son regiones hipervariables. Modificaciones en las regiones hipervariables influirán sobre la forma del sitio de combinación y sobre la especificidad.

Figura 2

Clases de Inmunoglobulinas



Las clases de inmunoglobulinas (Ig) que se encuentran en circulación son cinco: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Todas están compuestas por dos pares de cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Todas tienen cadenas livianas (dos λ o dos κ), no se encuentran Ig en forma natural que tengan una cadena liviana λ y otra κ .

TABLA N° 1

Propiedades de las clases de Inmunoglobulinas humanas

| Propiedades | IgG | IgA | IgM | IgD | IgE |
|-----------------------------------|--|----------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| Concentración en suero (g/100 ml) | 1.2 | 0.4 | 0.12 | 0.003 | 0.0005 |
| Coefficiente de sedimentación (S) | 7 | 7# | 19## | 7 | 8 |
| Peso molecular | 140000 | 160000 | 900000 | 180000 | 200000 |
| Movilidad electroforética | γ | β | entre δ y β | entre δ y β | β |
| Cadenas pesadas | μ | α | β | δ | ϵ |
| Cadenas livianas | λ o κ | λ o κ | λ o κ | λ o κ | λ o κ |
| Fijación de Complemento | Si | No | Si | No | No |
| Atraviesan placenta | Si | No | No | No | No |
| Porcentaje intravascular | 40 | 40 | 70 | 70 | |
| Vida media (días) | 23 | 6 | 5 | 3 | 2,5 |
| Actividad Anticuerpo | Ac a infecciones Respuesta secundaria Isoaglutinina, Rh Factor LE | secreción externa | isoaglutininas ABO, FR | superficie linfocitos | reaginas |

Existen otras formas moleculares (polímeros)

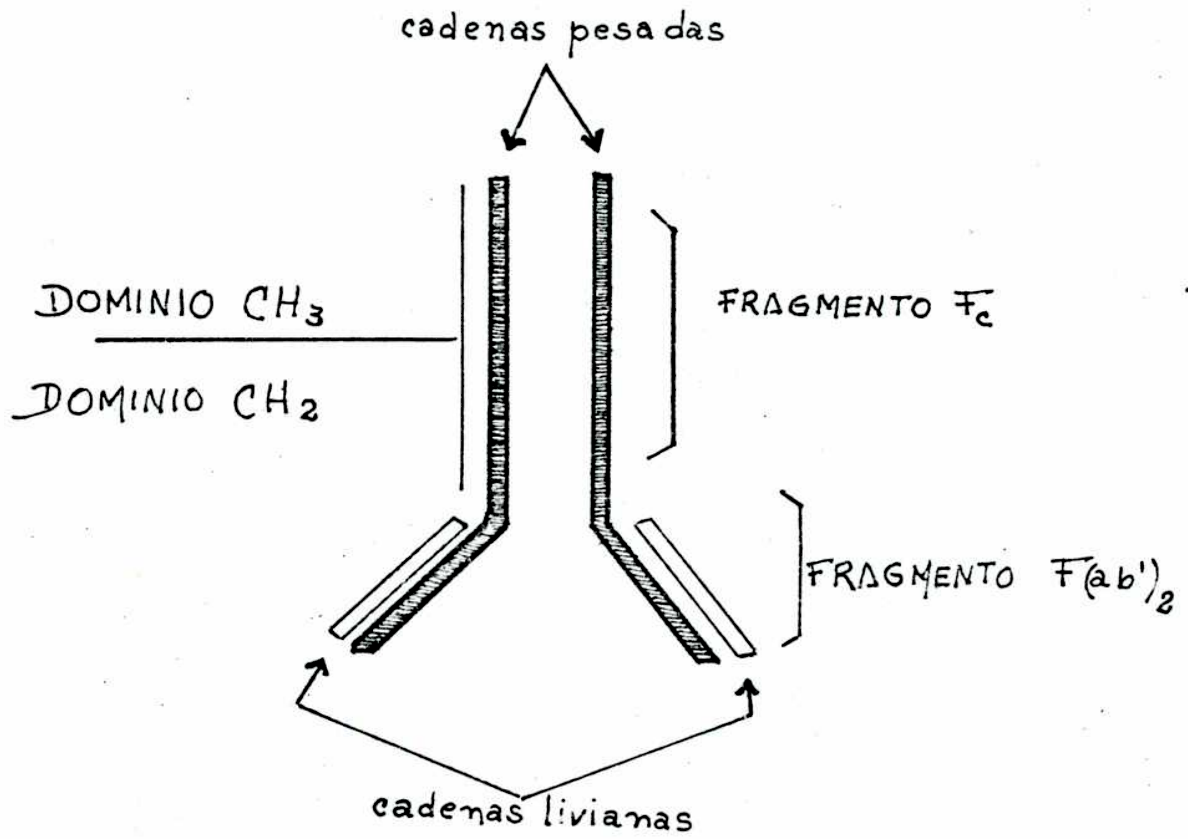
TABLA N°2

Propiedades biológicas de las subclases de la
Inmunoglobulina IgG

| <u>Propiedad</u> | <u>IgG1</u> | <u>IgG2</u> | <u>IgG3</u> | <u>IgG4</u> |
|---|-------------|-------------------------|-------------|------------------|
| Fijación de Complemento | ++ | + | +++ | |
| Atraviesan placenta | +++ | ++ | +++ | +++ |
| Anafilotoxina cutánea positiva | +++ | | +++ | +++ |
| Receptores para macrófagos | +++ | - | +++ | |
| Reacciona con proteína A del <u>Staphilococcus aureus</u> | +++ | +++ | | +++ |
| Actividad Ac prominente | anti Rh | anti Levan anti Dextran | anti Rh | anti Factor VIII |

Figura 3

Molécula de IgG



c) El Sistema Complemento (C)

El sistema C fué ampliamente estudiado a partir de la evidencia de que el suero fresco contenía factores que podrían mediar la lisis de bacterias y células previamente sensibilizadas con el Ac específico.

Al sistema C (14,15) lo integra un complejo multi-enzimático presente en el suero que interactúa secuencialmente por : I) activación de la vía clásica (VC) y II) por activación de la vía alterna (VA) o sistema de la properdina.

La secuencia de la VC (Tabla N°3) es la siguiente: C1, C4, C2, C3, C5 hasta C9.

Los mecanismos involucrados en la iniciación de la VC fueron estudiados en un modelo "in vitro", utilizando eritrocitos de oveja, los cuales poseen sobre su membrana un lipopolisacárido, conocido como Ag de Forssman. Los Ac anti-Forssman (hemolisina) se obtienen por inmunización de conejos (que son Ag de Forssman negativo). Una vez formado el CI (glóbulo rojo de oveja-Ac) en presencia de suero fresco, se inicia la activación de la VC (figura 2). El C1 reconoce los Ac unidos a los sitios antigénicos en la célula. La porción C1q tiene una composición semejante al colágeno (figura 5) y se une al dominio CH2 del fragmento Fc de la IgG (figura 3) por uniones iónicas (no covalentes). El C1s constituye la parte de la molécula de C1 responsable de continuar la secuencia del sistema C (figura 4) y mediar el clivaje proteolítico del C4 originando los fragmentos C4a y C4b, este paso puede ser regulado por una α 2 globulina del plasma (inhibidor de la C1 esterasa) que anula el sitio enzimático. Enzimas proteolíticas como la tripsina y la plasmina (16) pueden iniciar la cascada del sistema C siendo estas reacciones de interés en los sitios inflamatorios, donde proteasas de bacte-

rias y de células fagocíticas pueden activar directamente el sistema C (17). La activación de C2 involucra una digestión proteolítica. Así, la presencia de C1 esterasa en presencia de C4b media eficientemente el clivaje de C2 produciéndose el fragmento C2a (de mayor tamaño) que se une a la membrana. La combinación de C4b-C2a sobre la superficie celular origina la formación de una nueva enzima que se une y produce la ruptura del siguiente componente : C3. Esta enzima se denomina C3 convertasa de la VC (C4b-C2a) la cual es inestable y su decaimiento va acompañado de la liberación de C2a que es inactivo en la fase fluída; el C4b permanece unido a la membrana y puede aceptar otra molécula de C2a, constituyéndose así en un sitio de regulación del sistema.

El C3 circulante cuando se une al complejo (C4b-C2a) resulta clivado en un fragmento C3a y otro de mayor tamaño C3b. La C3 convertasa puede romper muchas moléculas de C3 determinando así un sitio de amplificación biológica de la secuencia del C. Cientos de moléculas de C3 pueden ser depositadas sobre la superficie celular a partir de una sola molécula de IgM o de dos moléculas de IgG. Sin embargo, la unión de C3 a la membrana, como sucede con C4, resulta poco eficiente: la unión dura un breve período y muchas moléculas de C3 clivadas no llegarán a unirse a la membrana quedando en la fase fluída, inactivas.

Cuando C3b se adhiere a la superficie celular en la cercanía de C4b-C2a da lugar a una nueva enzima que permite clivar C5 en fragmentos C5a (liberado al medio) y C5b (de mayor tamaño) el que resulta estabilizado por C6, así comienza la inserción en la membrana, el complejo C5b-C6, estable, en ausencia de inhibidores del plasma, puede disociarse de la membrana y atacar células vecinas no sensibilizadas (18). Este ataque no es eficiente y está controlado por inhibidores presentes en el suero. Sin embargo la posibilidad existe y en algunos casos se supone que puede ocasionar daño tisular. El C7 estabiliza el complejo C5b-C6 que penetra en la bicapa lipídica de la membrana.

Finalmente C8 y C9 se activan y se produce la lisis celular. Esta puede ocurrir también en ausencia de C9, pero su agregado acelera la formación de canales en la membrana por donde podrán pasar el agua y los iones llevando indefectiblemente a la lisis celular, por lo menos en el caso de células anucleadas (eritrocitos). La reparación de la membrana lesionada es un fenómeno que puede suceder cuando la célula objeto del ataque del C es una célula nucleada (célula tumoral, células linfocíticas)

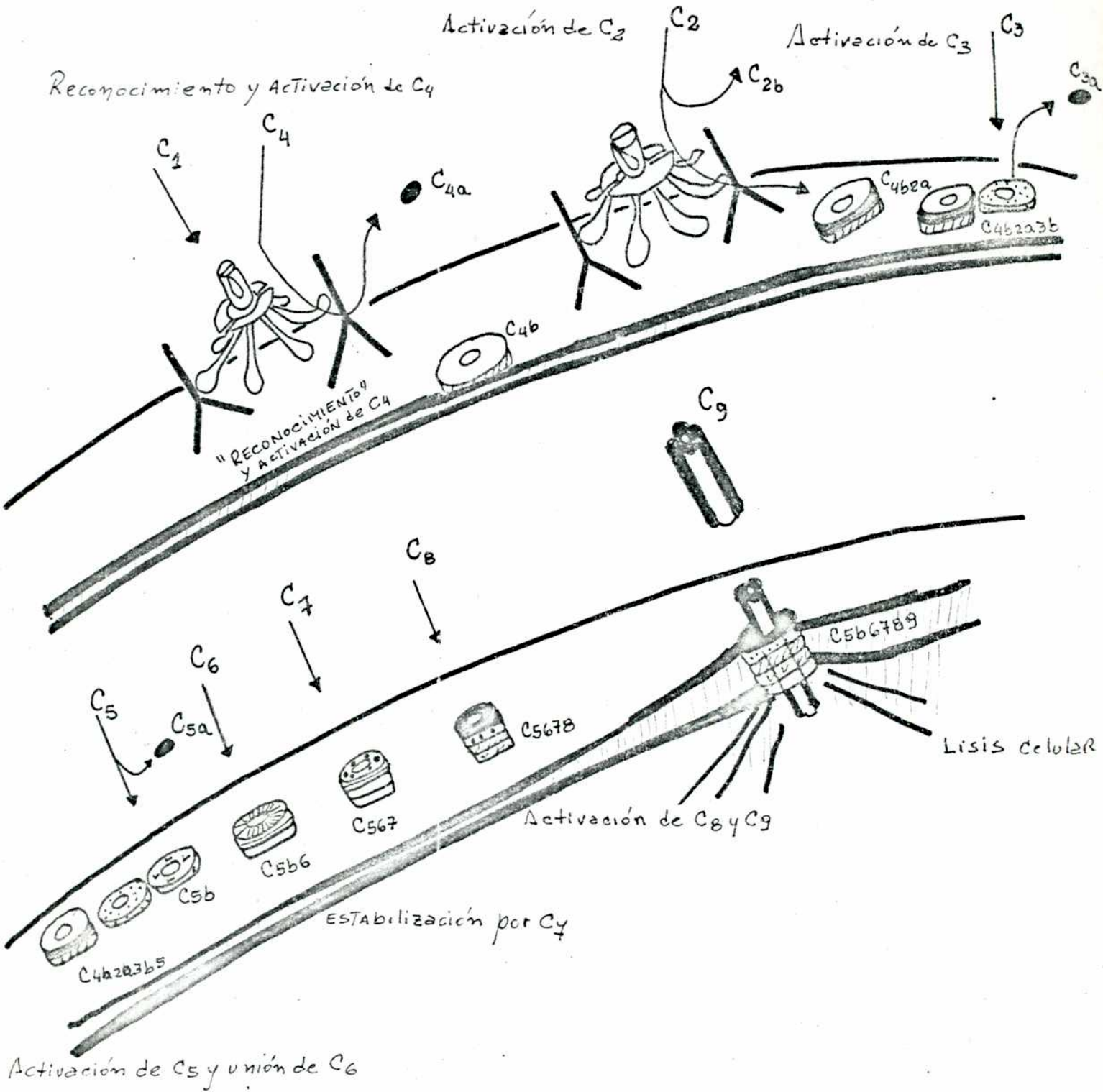
TABLA N° 3

Pesos moleculares y concentraciones en suero de los componentes
del Sistema Complemento

| Componentes de la Vía Clásica | Peso Molecular | Concentración en suero ug/ml |
|--|----------------|------------------------------------|
| Clq | 410000 | 70 |
| Clr | 90000 | 34 |
| C1s | 85000 | 31 |
| C2 | 117000 | 25 |
| C3 | 190000 | 1200 |
| C4 | 206000 | 600 |
| C5 | 180000 | 85 |
| C6 | 128000 | 60 |
| C7 | 120000 | 55 |
| C8 | 150000 | 55 |
| C9 | 79000 | 60 |
| Componentes de la Vía Alternativa | | |
| Properdina | 190000 | 25 |
| Properdina Factor B | 100000 | 225 |
| Properdina Factor D | 25000 | 1 |
| Inhibidores | | |
| Cl esterasa | 105000 | 275 |
| Inactivador de C3b (I) | 105000 | 34 |
| Proteínas reguladoras | | |
| Proteína que se une a C4 | 560000 | 8 |
| 1H (Factor H) | 150000 | 500 |

Figura 4

Vía Clásica del Complemento



Leyenda figura 4

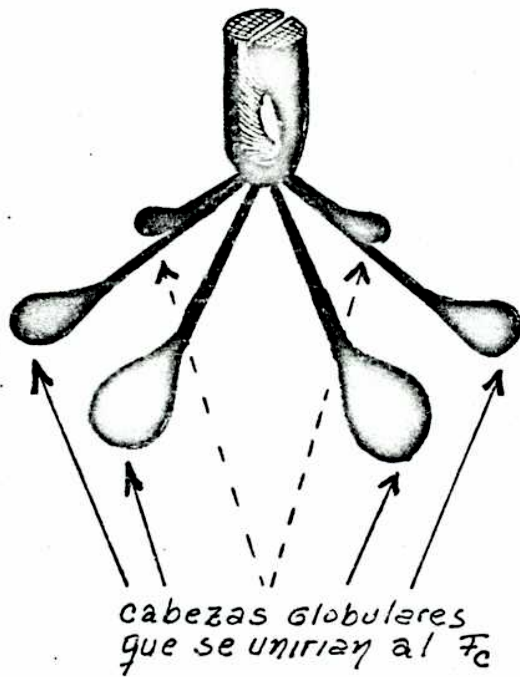
El primer paso en la cascada de la vía clásica del sistema complemento comienza cuando C1 reconoce anticuerpos unidos a los sitios antigénicos sobre la membrana celular. El C1q se une por las cabezas globulares al dominio CH2 de una IgG:consecuentemente se activa la subunidad C1r y ésta activa al C1s que continuará la secuencia.

El C4 hace contacto con C1s y resulta dividido en un fragmento C4b que se fija sobre la membrana plasmática y un fragmento menor C2b queda en fase fluida.

Otra proteína, C2, se fija cerca a C4b en forma inactiva, pero al contactarse con C1s se activa y libera a C2b, mientras que C2a queda fijo a la membrana formándose la enzima: C4b2a conocida como C3 convertasa de la vía clásica ya que por contacto con C3 se rompe éste en dos fragmentos a) C3a: que es liberado en el suero y cumple funciones en las reacciones inmunes alérgicas. Una de sus acciones es la de liberar histamina de los mastocitos o células cebadas, b) C3b es el fragmento que se une al complejo C4b2a y forma así una nueva enzima que puede unir y romper C5. Tal como ocurre con C3, el C5 se cliva en dos fragmentos: C5b y C5a. El C5b resulta estabilizado por C6 y comienza la inserción del complejo de ataque a la membrana celular. El C5a por otro lado es liberado al suero.

C5b6 puede a su vez disociarse de la membrana y atacar a otras células. El agregado de C7 estabiliza al complejo C5b6. El C5b7 puede encontrarse como dímero sobre la membrana. C8 y C9 se unen al complejo anterior. Unas seis moléculas de C9 pueden fijarse a C5b-8 logrando una máxima efectividad en la lesión.

Molécula de Clq



/ Knobel H.R., Williger W., Isliker H.
Eur J Immunol 5: 78-82, 1975

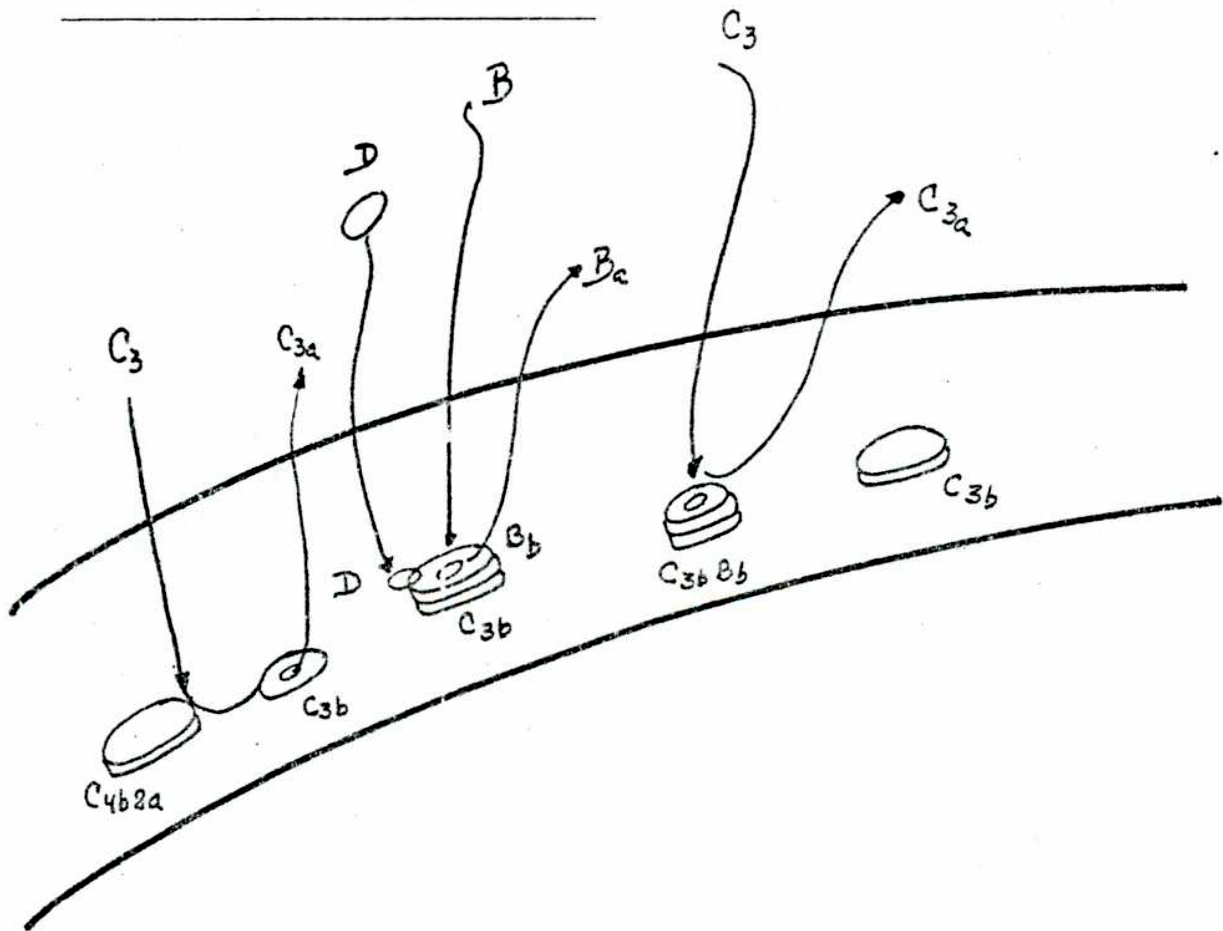
El clivaje de C3 puede realizarse a través de la VA (sistema de la properdina). En 1954 Piliemer (19) señala que hay mecanismos que podrían mediar los efectos bactericidas y opsonizantes sin requerir de los Ac específicos. Filogenéticamente, este sistema de la VA es el más antiguo; puede ser activado por IgA agregada, posiblemente por IgG, polisacáridos, hongos, virus. La VA (figura 6) consiste en un número de proteínas que interactúan para clivar C3 independientemente de los componentes iniciales de la VC (C1, C4, C2). El paso clave de la VA es la generación de C3 convertasa formada por fragmentos de B (Bb) y fragmentos de C3 (C3b), esta C3 convertasa (C3b-Bb) difiere de la C3 convertasa de la VC. La actividad de C3b sobre una superficie antigénica o en fase fluida está regulada por dos proteínas B1H (H) y C3b inactivador (I) (figura 7) que actúan juntas para escindir la cadena α de C3b dando lugar a la formación de C3bi.

El rol principal del sistema C no radica en la capacidad lítica en sí, como se puede leer en la Tabla N°4, son muchas las actividades biológicas de los componentes del C y las funciones que pueden resultar de la actividad de la VA; así por ejemplo participa en el daño renal de la glomerulonefritis hipocomplementémica; tiene actividad bactericida, lítica (hemoglobinuria paroximal nocturna), anafilotóxica y otras funciones y efectos.

Figura 6

Acción de la C3 convertasa de la Vía Alternativa

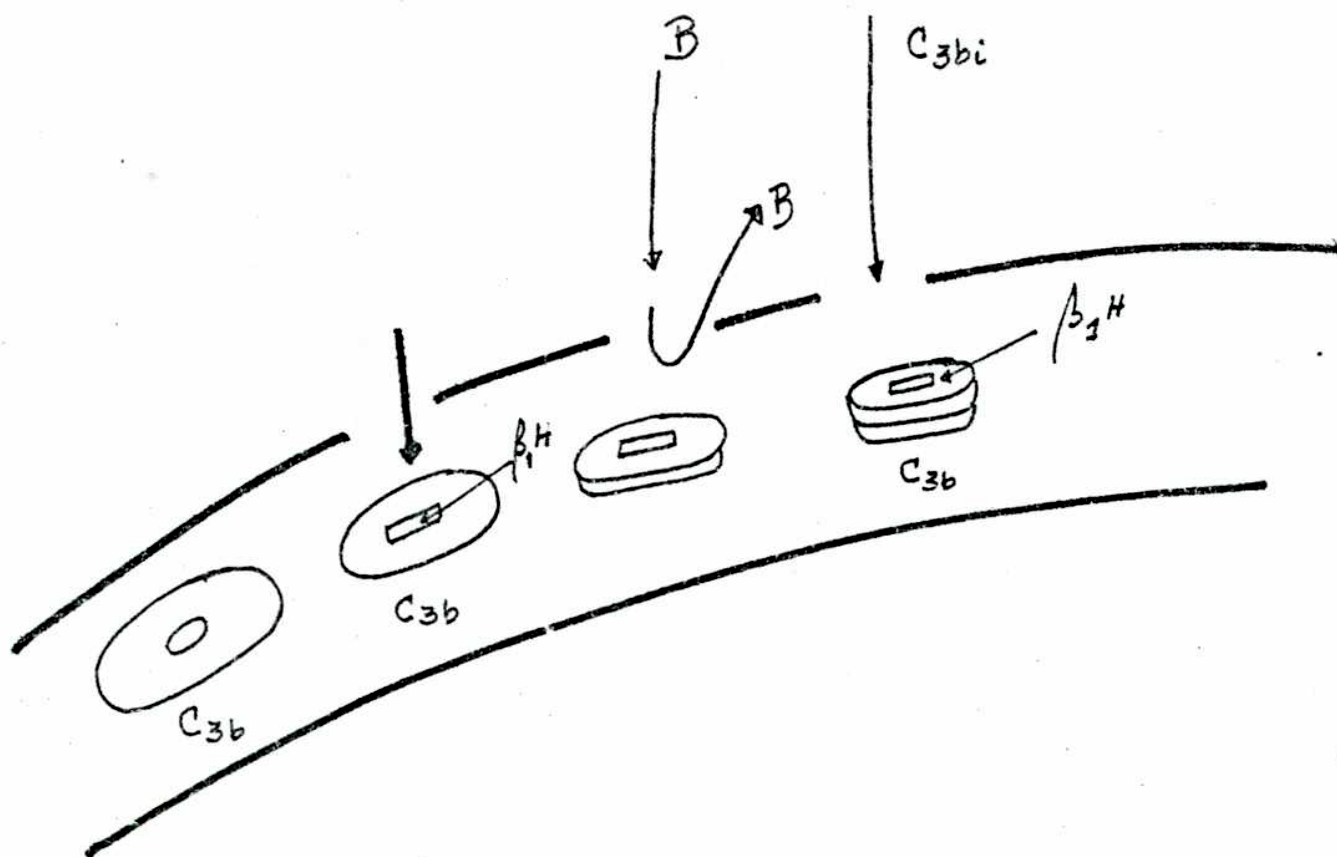
Función de la Vía Alternativa



En presencia del factor D, el factor B puede separarse en un fragmento grande (Bb) que combina con C3b, dando lugar a la C3 convertasa de la vía alternativa; C3bBb. De este modo puede a su vez romper otra molécula de C3 y continuar la cascada. La properdina estabiliza el complejo C3bBb.

Figura 7

β 1H y el C3bi (C3b inactivador)



La interacción de β 1H con C3b evita la unión y la activación del factor B. El inactivador de C3b, o C3b inactivador (C3bi) interacciona con el complejo β 1HC3b y permite la unión de C3bi. Este paso libera a β 1H siendo éste un sitio de control de la activación de la Vía alterna y es un control también para evitar la lisis celular.-

TABLA N°4

Funciones biológicas que pueden resultar de la activación de
la vía alterna del sistema complemento

- .-Lisis,mediada por veneno de cobra,de eritrocitos no sensibilizados.
- .-Lisis de eritrocitos,en hemoglobinuria paroximal nocturna.
- .-Actividad bactericida.
- .-Neutralización de virus.
- .-Adherencia inmune.
- .-Fagocitosis.

- .-Producción de anafilotoxinas.
- .-Liberación de histamina,lisis.
- .-Leucostasis.
- .-Participa en el daño renal en la glomerulonefritis hipocomplementémica.
- .-Elimina bacterias de la sangre.

d) Generalidades de los complejos inmunes

La unión Ag-Ac da origen a la formación de CI. Esta reacción puede realizarse en el fluído intersticial (reacción de Arthus) como ocurre en la tiroiditis (20) o a nivel de la membrana celular. Los CI pueden posteriormente ser liberados al medio extracelular circundante (21).

Las interacciones Ag-Ac son reversibles, no covalentes, involucran fuerzas de tipo electrostáticas, enlace hidrógeno, fuerzas de van der Waals e hidrofóbicas; estas últimas pueden contribuir con un 50% de la fuerza total de la unión Ag-Ac.

Los Ags menos solubles en agua tienden a formar CI más estables ya que la unión puede considerarse como una partición competitiva del Ag entre el agua y los sitios de unión del Ac, que son relativamente hidrófobos (22).

El comportamiento y destino de los CIC (23,24) depende directamente de variables tales como : I) características del Ac, clase o subclase de Ig que determinará a) las valencias del Ac para un dado Ag, b) la capacidad de unión a receptores celulares, c) la capacidad de activación del sistema C. II) características del Ag: el Ag puede ser monovalente o polivalente. El Ag monovalente expresa un solo determinante antigénico (epitope) tal es el caso de los haptenos y da lugar a CI con fórmula $Ag1Ac1$ o $Ag2Ac1$ que pueden circular por largos períodos en el organismo, resultando difícil su deposición a nivel de los tejidos (25). Si el Ag es polivalente (distintos epitopes) como ocurre en las proteínas, polisacáridos etc; pueden formarse agrupaciones (redes) de diversos tamaños como consecuencia de las múltiples interrelaciones entre los diferentes epitopes y los Ac no específicos. Las redes que se formen dependerán de la relación molar de cada uno de los componentes (23).

Además de las características propias del Ac y del Ag, la proporción entre estos dos componentes influirá en el destino y la actividad biológica de los CI.

En exceso de Ag (polivalentes) el tamaño de los CI variará en forma inversa a la cantidad "en exceso" de Ag (25, 26) generalmente no fijan C, tampoco pueden iniciar procesos inflamatorios y la fórmula es Ag_2Acl .

Contrariamente, los CI formados en gran exceso de Ac son insolubles, de gran tamaño ($>19S$), fácilmente fagocitados (27) y fijan C; tienen capacidad inflamatoria. Por su lado los CI de tamaño intermedio (leve exceso de Ag) no son fácilmente fagocitados, tienen posibilidades de circular, activan C y resultan por lo tanto potencialmente patogénicos.

El destino de los CI dependerá también del estado de los fagocitos del huésped, ya sean los PMN, monocitos o macrófagos del SRE. En experimentos realizados en animales se ha observado que más del 99% de los CI son eliminados por los fagocitos, predominantemente a través de las células de Kupffer, del hígado, el 1% de los CIC restantes son probables inductores de la enfermedad de complejos inmunes (27).

La deposición de los CIC se ve favorecida, en gran parte, por la anatomía particular de los sitios por donde circulan, pudiéndose señalar como vulnerables el glomérulo renal, el espacio sinovial, la piel y el tracto uveal (27), por tratarse de zonas con un mayor flujo sanguíneo por unidad de masa, determinando en estos casos el potencial patogénico de los CIC.

e) Receptores Fc y C

Los receptores (R) son entidades moleculares presentes en la membrana plasmática de células normales y malignas, capaces de combinarse con ligandos y de suscitar en la célula las reacciones biológicas propias de cada tipo celular. Dentro del concepto de receptor está implícito que pueden ser saturables, que deben ser específicos y que deben poseer alta afinidad en concordancia con las concentraciones fisiológicas de su ligando específico.

Se han descrito receptores Fc (RFc) (Tabla N°5) para las distintas subclases de IgG y para otros isotipos (28, 29, 30), por su lado los receptores para los componentes del C (31) son designados como CR, caracterizados con diferentes subíndices (Tabla N°6), así se conocen los CR1, CR2 y otros cuyas especificidades se indican en la misma.

Los CIC pueden interrelacionarse con las células a través de RFc y CR. Se explica de este modo que los CI activadores de C y que fijaron el fragmento C3b se unan a eritrocitos por CR1. Los eritrocitos de esta forma ejercen una importantísima función, ya que al transportar los CI al SRE disminuyen la carga de CIC y favorecen la fagocitosis por parte de los PMN (32, 33).

Las plaquetas interaccionan con CIC a través de los RFc para todas las subclases de Igs, no así para los otros isotipos (34); poseen receptor para Clq (35, 36) y en consecuencia pueden agregarse por estímulos externos tales como los que proporcionan los CIC y la gamma globulina agregada por calor.

Los CIC pueden unirse a linfocitos a través de los R para el Ag, R para Fc de diferentes clases de Igs y para los R de C (26, 37).

Las células B derivadas de la médula ósea, además de la Ig adherida a la superficie celular, la cual actúa como R del Ag, tienen RFc de baja afinidad para IgG, CR1, CR2 y R de alta afinidad para Clq (38, 39, 40, 41); todos ellos constituyen entidades fí-

sicas distintas. Algunas subpoblaciones de células B poseen RFc para IgE, de baja afinidad (42,43), RFc para IgM (44,45) y RFc para IgA (45).

Las células T poseen RFc para IgM, IgG (38,46,61); IgA e IgE (47). Las células T que expresan RFc para IgM (75%) son funcionalmente diferentes de las que tienen RFc para IgG (48,49).

Las células NK, por otro lado poseen R de alta afinidad para Fc de IgG en especial para IgG1 e IgG3 (41,50).

Los basófilos y los mastocitos poseen RFc para IgE (52) de alta afinidad (10^8 a 10^9 M^{-1}). Quizás representen las únicas células con R de alta afinidad para una Ig monomérica. Estas células al interactuar con C1 o con C3a y C5a liberan sustancias activas tales como heparina, histamina, SRS-A y factor activador de plaquetas.

Los leucocitos eosinófilos poseen R para IgG, CR2 (52, 53), R para C3a y C5a (54), Los RFc para IgG y R para C3 tienen menor afinidad o densidad si se los compara con los neutrófilos.

Los PMN neutrófilos tienen RFc para IgG e IgA; los agregados de IgG2 o IgG4 se unen con mayor eficiencia (53,55). Poseen también CR1 y CR3. Los CR1 sobre los neutrófilos y los monocitos/macrófagos cumplen importantes funciones en la fagocitosis y en la respuesta respiratoria a partículas opsonizadas. La función de CR1 y CR3 es similar en varios aspectos pero también presentan importantes diferencias. Los CR1 y CR3 se encuentran en pequeñas cantidades sobre los neutrófilos y macrófagos circulantes no activados y no inducen la fagocitosis de partículas cubiertas con C3b o C3bi respectivamente. La activación de las células por factores quimiotácticos (calcio dependiente) producen un rápido aumento en el número de CR1 y CR3 sobre la superficie celular. La activación de CR1 y CR3 de los

neutrófilos para la ingestión de partículas requiere una combinación de péptidos quimiotácticos (F-Met-Leu-Phe) o fragmentos C5a y fibronectina o forbol miristato acetato. Los neutrófilos también presentan R para Clq.

Los macrófagos expresan R_{Fc} para IgG₁, IgG₃. La IgG₁ se une citofílicamente en forma monomérica, del mismo modo lo hace la IgG₃; sólo agregados de IgG₂ e IgG₄ podrán unirse a los R correspondientes (57), los macrófagos también poseen R para los fragmentos de C₃ y C₄ (52,56). Tal como se observa en neutrófilos, los macrófagos pierden CR₂ cuando maduran y expresan CR₁ (57). La unión y la ingestión de complejos particulados está mediada por los R_{Fc} para IgG y R de C (58). La endocitosis de CI solubles en contraste a los particulados no necesariamente involucran a los R_{Fc}.

En la placenta se han descrito R_{Fc} para IgG, localizados en la superficie apical de trofoblastos y células endoteliales de los vasos del feto (59). Las células dendríticas de la epidermis humana y células de Langerhans poseen R_{Fc} para IgG acoplejada y para fragmentos C_{3b} (60).

En el glomérulo humano hay receptores para CI-C_{3b} pero estos no se han encontrado en otras especies estudiadas (62, 63). También se han descrito sitios de unión para Fc de IgG en el intersticio renal del hombre y en una variedad de otras especies (63).

TABLA N°5

Receptores para la porción Fc de las Inmunoglobulinas
en membranas celulares

| <u>Células</u> | <u>IgG</u> | <u>IgM</u> | <u>IgA</u> | <u>IgE</u> |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Eritrocitos | - | - | - | |
| Plaquetas | + | - | - | |
| Neutrófilos | + | - | + | |
| Macrófagos | + | - | - | |
| Eosinófilos | + | - | - | |
| Basófilos y Mastocitos | + | - | - | + |
| Linfocitos B | + | + | + | + |
| Linfocitos T | + | + | + | + |
| Células NK | + | - | - | - |

TABLA N°6

Receptores para fragmentos del sistema complemento
en membranas celulares

| <u>Tipo</u> | <u>especificidad</u> | <u>PM</u> | <u>Distribución</u> |
|-------------|--------------------------|-------------------|---|
| CR1 | C4b, C3b, C3bi, C3c, C5b | 205000 | eritrocitos, macrófagos riñón, linfocitos, PMN |
| CR2 | C3bi, C3d-g, C3d | 72000 | linfocitos B |
| CR3 | C3d-g, C3g | ? | Eritrocitos, macrófagos PMN, linfocitos, NK |
| Clq-R | Clq-colágeno | | linfocitos, neutrófilos monocitos |
| H-R | Factor H (β 1H) | 100000 y 50000 | linfocitos, neutrófilos eosinófilos, monocitos |
| C3a-R | C3a, C4a | ? | mastocitos, monocitos, PMN |
| C3e-R | C3e | | neutrófilos |
| C5a-R | C5a, C5a desarg | ? | mastocitos, monocitos |

f) Posibles efectos de los CI sobre el Sistema Inmune

Los CIC pueden modular la respuesta humoral y celular. Los complejos formados en exceso de Ag se comportan con un poder inmunogénico mayor que el del Ag libre, con un aumento en la respuesta primaria y secundaria para el Ac (tanto "in vivo" como "in vitro") (64,65) ya que se favorecería la unión de los CI a los linfocitos, con una rápida localización de los CI en los folículos linfoides y un mayor procesamiento por parte de los macrófagos (66).

Los CI, por otro lado, en exceso de Ac también ejercen un efecto regulador sobre la respuesta inmune. En un sistema humoral estos CI conteniendo Ac de clase IgG, son potentes agentes tolerogénicos (67,68); sin embargo en la inmunidad mediada por células, las respuestas producidas por esos CIC están aumentadas (68,69).

Los CI pueden alterar la función de células T supresoras y la expresión de marcadores de membrana (46). Moretta y col (48) describen subpoblaciones de células T que fijan CI formados por Ac de la clase IgM (T_{μ}) e inducen a las células B para la producción de Ac. Una segunda subpoblación T que fija CI formados por Ac de clase IgG (T_{β}) actúa suprimiendo la síntesis de Ig.

Es importante considerar las interacciones que se producen entre el Ag, el idiotipo y los respectivos Ac anti-idiotipo generadores de probables efectos que aumentan o suprimen la reactividad inmune. Estas interacciones darían lugar al establecimiento de una red dinámica que se autoregula (70). Se ha demostrado (71) una prolongada falta de respuesta cuando se administran grandes cantidades de Ac anti-idiotipo en el ratón (antes o después de una corta inmunización con el Ag).

Otros efectos de los CI ("in vitro") se han descrito. Por ejemplo la citotoxicidad anticuerpo dependiente (CAD) (72), que podría actuar en el rechazo de injertos, eliminación viral, inmunidad tumoral y en enfermedades autoinmunes. La célula efectora en la CAD es un linfocito llamado célula K que requiere la presencia de Ac del tipo IgG con especificidad para la célula "blanco" para ejercer su acción citotóxica.

g) Métodos de detección de Complejos Inmunes Circulantes (CIC)

Se han descrito numerosas técnicas para determinar la presencia de CIC, algunas evalúan los CIC en forma específica para el Ag (73) y otras permiten determinarlos en forma independiente del componente antigénico involucrado; éstas últimas se apoyan en diferentes propiedades físicas y biológicas de los complejos (Tabla N° 7).

En base a las propiedades físicas, los CIC pueden separarse por ultracentrifugación, ultrafiltración, filtración en geles, crioprecipitación, precipitación con polietilenglicol (PEG).

El PEG es un polímero neutro, lineal, soluble en agua, en concentraciones del 20% precipita la Ig nativa y otras proteínas. Se observó y demostró que en concentraciones del 3.5 al 4% se obtiene un precipitado de CI formados in vitro o in vivo (74,75). Así bajas concentraciones de PEG (3,5-4%) se utilizan para determinar la presencia de CIC en sueros de pacientes con diversas patologías (76,77).

Considerando las propiedades biológicas de los CIC éstos se pueden evaluar en forma indirecta por el consumo de C (76); por interacciones de los CIC con Clq, purificado, marcado radioactivamente (75,78) o unido en fase sólida (ELISA) (79).

La conglutinina (proteína presente en el suero de los rumiantes) (80) tiene gran afinidad por los CIC que hubieran fijado fragmentos de C3, por lo cual la conglutinina se utiliza para evaluar CIC (81).

El factor reumatoideo (FR), que es una antiglobulina (82), también permite valorar CIC, de pequeño tamaño (83,85), independientemente de que fijen o no C.

También se describieron técnicas celulares, entre ellas se pueden mencionar: agregación plaquetaria (84), inhibición de la CAD (85), inhibición de la formación de rosetas (86).

Las células Raji, derivadas del linfoma de Burkitt, que perdieron la Ig de superficie, poseen poca afinidad para los R_{Fc} y gran cantidad de R de alta afinidad para Cl_q, C3b, C3d y otros componentes del complemento. Theophilopoulos y col (87) demostraron que la mayoría de los CIC que fijan C se unen a las células Raji por el R para C3b (88). Gupta y col (89) intentaron demostrar que los CI solubilizados con C, en contraste a los CI particulados se unen a las células Raji sólo vía del R para Cl_q y no por el R de C3b-C3d.

Los eritrocitos humanos también se utilizan como sustrato (90) para la detección de CIC que han fijado C3b o C4b.

Si bien no ha sido utilizado masivamente en clínica, se ha descrito una técnica basada en la unión de CI a R_{Fc} de los glóbulos rojos de pollo (91,92).

Los CIC que involucran IgG1, 2 y 4 humanas, varias subclases de Ig de ratón y posiblemente la IgM (93) pueden unirse por su Fc a la proteína A del Staphilococcus aureus. Esta propiedad se ha utilizado para la medición de niveles de CIC (94,95).

Muchas son las técnicas descritas para la evaluación de CIC, sin embargo ninguna por sí misma abarca o detecta la totalidad de la heterogénea población que constituyen los CIC. Se ha determinado que para una "adecuada" valoración de CIC es conveniente seleccionar dos o más métodos basados en principios diferentes y asimismo considerar las limitaciones que afecta a cada una de las técnicas elegidas (96).

TABLA N° 7

Métodos antígeno específico para detección de Complejos Inmunes
circulantes (CIC)

Inmunoprecipitación
Filtración en gel
Fraccionamiento en gradiente de sucrosa
Radioinmunoanálisis

Métodos antígeno inespecíficos para CIC

I Ultracentrifugación
 Ultrafiltración
 Filtración en gel
 Crioprecipitación
 Precipitación con Polietilenglicol

II Consumo de Complemento
 Interacción con Clq
 Precipitación de C3
 Radioinmunoensayo con conglutinina
 Enzimainmunoensayo con Clq

 Ensayo con factor reumatoideo

III Agregación plaquetaria
 Inhibición de la citotoxicidad anticuerpo dependiente
 Inhibición de la formación de rosetas
 Ensayo con células Raji
 Ensayo con eritrocitos humanos

 .Combinación con proteína A del Stafilococcus aureus

I:Métodos físicos,II:Métodos que se apoyan en propiedades biológicas de los CIC,III:Técnicas celulares.-

h) Importancia de los CIC en diversas patologías

La importancia de la evaluación de los CIC en sueros patológicos radica en la capacidad potencial que estos tienen para alterar el equilibrio inmunológico por la interacción con receptores humorales y celulares, además la persistencia de los CI en la circulación favorecería la deposición de los mismos en aquellas zonas que tienen un mayor flujo sanguíneo, a riesgo de alterar el correcto funcionamiento de los órganos donde los CIC se depositan.

Para el desarrollo de este trabajo de Tesis se estudiaron pacientes con:

a) Lupus eritematoso sistémico (LES). Se trata de una enfermedad que por su carácter multifactorial afecta piel, articulaciones, riñones, sistema nervioso y a menudo otros órganos. Se lo considera un prototipo de "enfermedad de complejos inmunes". El curso clínico está caracterizado generalmente por períodos de remisión y actividad. En un 90% afecta a las mujeres. En los pacientes con LES se encontraron depósitos de ADN, Ig y C (97). La posible participación de los complejos ADN-antiADN en la patogénesis de la nefritis lúpica fue sugerida por Koffler y col (98). Actualmente se admite que niveles elevados de CIC son en gran parte, responsables del daño renal en el LES. Los CIC activan el sistema C e incorporan componentes a la red Ag-Ac lo cual induce una mayor agregación orientada hacia la eliminación a través del SRE. El sistema C también podría colaborar en la eliminación de CIC por su acción "disolvente" de la red precipitada. Este fenómeno fue descrito por Miller y Nussenzweig (99,100) fundamentalmente es un fenómeno dependiente de la VA del sistema C. En base a los hallazgos básicos de este grupo, otros autores investigaron la capacidad del

suero de pacientes con LES para disolver CI precipitados, preformados (101). Esta propiedad de la VA del C otorga un importante papel al sistema C asociada al "manejo in vivo" de los CIC y determinaría de alguna manera la capacidad inflamatoria de los mismos en su ausencia.

En los pacientes con LES se evaluó la presencia de CIC y se efectuó un perfil del sistema C, determinando el nivel de VA y la capacidad solubilizadora del suero patológico además del nivel hemolítico total (CH50). Estos parámetros fueron relacionados con los estados clínicos de la enfermedad.

b) Neutropenia: Un estado neutropénico se define cuando el número de neutrófilos circulantes en un individuo es inferior a 2000 células/mm³ de sangre. Las neutropenias idiopáticas representan un porcentaje supuestamente muy bajo de la población (se desconocen datos estadísticos), los individuos pueden ser detectados en forma causal o por concurrir al médico clínico por presentar infecciones dérmicas o pulmonares.

Los CIC pueden desempeñar un papel muy importante en el secuestro de las células PMN. Se ha demostrado que los CIC de pacientes con neutropenia idiopática inyectados en conejos provoca el secuestro de las células PMN en el lecho vascular de riñones y pulmones (102); ya sea porque en forma inespecífica interactúan con el RfC, o bien por la presencia de Ac anti-neutrófilos. Esas interacciones estimularían la liberación de proteínas catiónicas de los gránulos azurófilos favoreciendo la agregación celular y la consiguiente activación del sistema C. El fragmento C5a (figura 4) producto de la activación del del C actuaría aumentando la capacidad de adherencia de las células PMN con la consiguiente leucostasis pulmonar y neutropenia periférica.

La acción directa y específica mediada por Ac anti-neutrófilos (103) se presenta en la neutropenia isoimmune neonatal, debido a incompatibilidad materno fetal y esos Ac están implicados también en la neutropenia autoimmune (104, 105). Se ha encontrado que el grado de severidad de la neutropenia puede correlacionarse con la presencia de auto anticuerpos antineutrófilos y la capacidad de éstos de reaccionar con precursores tempranos de la médula (106).

Nuestros pacientes se seleccionaron en ausencia de cualquier otra enfermedad sistémica asociada. En ellos se investigó la relación de los CIC con la fisiopatogenia del proceso neutropénico. Para este fin se determinó el nivel de CIC. Se investigó la presencia, en el suero de estos individuos, de componentes capaces de reaccionar con la membrana de los PMN normales o autólogos además de los niveles de componentes del complemento (C3 y C4).

c) Hemofilia: Se trata de una enfermedad congénita y hereditaria; transmitida por la mujer y expresada en los hijos varones, quienes poseen una deficiencia funcional de los Factores VIII o IX de la coagulación (hemofilia A y B respectivamente) (107).

Esa deficiencia impide que se forme un coágulo resistente que detenga la hemorragia producida por la ruptura de un vaso sanguíneo. Las manifestaciones de ambas hemofilias (A o B) son similares en su comienzo y en su curso clínico. El tratamiento de estos pacientes consiste en la infusión de concentrados de Factor VIII o IX. Puesto que las preparaciones de Factor VIII o IX no son puras, los pacientes son sometidos con gran frecuencia a un estímulo antigénico masivo y presentan diversos defectos en la regulación de su sistema inmune, algunos de ellos atribuibles a la presencia de CIC.

Los pacientes hemofílicos consignados en este trabajo integran el grupo de sujetos de alto riesgo (SAR) de contraer el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El SIDA es una enfermedad descubierta hace aproximadamente unos seis años; se presenta en ciertos grupos de población con serias modificaciones en la inmunidad. Los pacientes desarrollan infecciones oportunistas (108) y presentan o no Sarcoma de Kaposi (109). El SIDA podría estar asociado a un agente infeccioso transmisible por contacto sexual (110). Los varones homo o bisexuales, con actividad sexual promiscua constituyen el grupo de mayor riesgo, ya que el 72% de los casos comunicados corresponden a ese grupo. Los drogadictos (por vía intravenosa), los hemofílicos y las parejas e hijos de estos grupos constituyen el grupo SAR.

En el Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina y Hospital J. Fernández, se estudiaron los primeros casos de SIDA, en Argentina (111).

La crisis provocada por el SIDA ha dado un especial énfasis a la búsqueda de métodos que reduzcan la contaminación del virus en los concentrados plasmáticos de Factor VIII o IX de origen comercial, provenientes de USA o Europa. Estos métodos incluyen la selección de donantes por propia exclusión y ubicación geográfica, exclusión de donantes por cuestionario, exámenes médicos y pruebas serológicas además de procedimientos que incluyen el calentamiento en la preparación de los concentrados.

En el grupo SAR de pacientes hemofílicos se evaluó la presencia de CIC, el nivel de Igs séricas y los niveles de complemento. También se efectuó la correlación entre el nivel de CIC y la función supresora inducida por un mitógeno (Con A).

Los enfermos SIDA y SAR no hemofílicos se estudiaron como grupo control de pacientes infectados no transfundidos.-En estos pacientes además de evaluar la presencia de CIC y nivel de IgG séricas se estudió la actividad funcional del sistema complemento (VC yVA).-

MATERIALES Y METODOS

a) Pacientes

a-1) Lupus Eritematoso Sistémico (LES) : Se distribuyeron en dos grupos: pacientes con LES en actividad (LES-a) y pacientes con LES en remisión (LES-r), clasificados de acuerdo a criterios clínicos y de laboratorio. El grupo LES-r estuvo constituido por pacientes sin signos ni síntomas de LES en actividad. Aquellos que integraban el grupo LES-a presentaban signos severos de la enfermedad o débil actividad manifestada por la positividad de dos o más ensayos de laboratorio (hipo - complementemia, anti-ADN positivo, incremento de la eritrosedimentación, leucopenia). Los títulos de anti-ADN de los pacientes en ambos grupos no difirieron significativamente. (Tabla N° 8).

TABLA N°8

Clasificación de los pacientes con Lupus Eritematoso
Sistémico (LES)

| | |
|---------|--|
| GRUPO 1 | Ausencia de signos y síntomas de LES Parámetros de laboratorio normales |
| GRUPO 2 | Ausencia de signos y síntomas de LES Eritrosedimentación elevada Anti ADN positivo Hipocomplementemia Leucopenia |
| GRUPO 3 | Artritis activa Manifestaciones cutáneas Alopesia Ulceraciones orales Vasculitis cutánea Ulceras cutáneas Ureitis Fiebre |
| GRUPO 4 | Enfermedades del Sistema Nervioso Central Vasculopatía periférica Serositis Anemia Nefritis Sedimento urinario patológico Síndrome Nefrótico |
| GRUPO 5 | Coma Vasculitis gastrointestinal PTI Coagulación Intravascular Hipertensión Maligna Nefritis con Uremia |

En actividad, se consideran a los pacientes pertenecientes a los grupos 3, 4 y 5. Los pacientes deben presentar por lo menos dos parámetros de laboratorio alterados, para ser considerados como pacientes en actividad en el grupo 2.-

- a-2) Neutropenia : Los pacientes se seleccionaron teniendo en cuenta el número de células granulocíticas (inferior o igual a 2000 células/mm³ de sangre), en ausencia de anemia, trombocitopenia, esplenomegalia; con médula ósea normocelular, determinada por punción y biopsia de cresta ilíaca. Los estudios se realizaron en pacientes no tratados o en períodos libres de tratamiento (corticoides, litio, vitamina C) (Tabla N°9).

TABLA N° 9

CRITERIOS DE SELECCION DE PACIENTES CON NEUTROPENIA

IDIOPATICA CRONICA

| | |
|----------------------------|--|
| Número de células PMN | menor o igual a 2000 células /mm ³ de sangre |
| Duración de la Neutropenia | período mayor a un año |
| Drogas o toxinas | exposición no significativa |
| Hipoplasia medular | ausencia |
| Esplenomegalia | ausencia |
| Anemia | ausencia |
| Trombocitopenia | ausencia |
| Médula ósea | normocelular, determinada por punción y biopsia de cresta ilíaca |

- a-3) Hemofilia: Se seleccionaron pacientes con hemofilia A o B severa (valores de Factor VIII o IX inferiores a 0.01 unidades/ml). Se agruparon según presentaran o no síntomas asociados al complejo SIDA (adenopatías, fiebre, púrpura trombocitopénica, pérdida de peso). Los pacientes asintomáticos se seleccionaron excluyendo aquellos con inhibidores de Factor VIII (FVIII), leucopenia, trombocitopenia, linfadenopatías, hepato o esplenomegalia, antecedentes de drogadicción o actividad homosexual; ninguno había sido sometido a cirugía ni recibió transfusiones de sangre en los dos últimos años.
- a-3') Los pacientes hemofílicos asintomáticos se reagruparon de acuerdo a su defecto genético (Hemofilia A o B) y al tratamiento recibido: altas dosis (AD) o bajas dosis (BD) de concentrado liofilizado (LIOF) o tratamiento con crioprecipitado (CRIO) o Factor IX (FIX).
- HA-LIOF-AD: pacientes con HA que recibieron FVIII, $2030^{\pm} 611$ U/Kg/año (\bar{X}^{\pm} DS). La edad promedio de este grupo fue de $15^{\pm} 5$ años.
- HA-LIOF-BD: pacientes que recibieron $285^{\pm} 90$ U/Kg/año (\bar{X}^{\pm} DS). La edad promedio de este grupo fue de $19^{\pm} 8$ años.
- HA-CRIO: pacientes tratados con crioprecipitados obtenidos de donadores de sangre conocidos. La dosis media de CRIO fue $312^{\pm} 183$ U/Kg/año. La edad promedio fue de $17^{\pm} 8$ años.
- HB: pacientes con deficiencia de FIX que recibieron

290[±] 91 U/Kg/año de concentrado de FIX. La edad promedio fue de 21[±] 8 años.

Los pacientes con HA-LIOF-AD y HA-LIOF-BD recibieron concentrados de FVIII de diferentes orígenes (Cutter e Immuno) al azar.

Los datos de los pacientes con hemofilia se compararon con sujetos normales y con individuos que integraban el grupo SAR no hemofílicos (varones homo o bisexuales y drogadictos) y enfermos SIDA no hemofílicos (Tabla N°10).

TABLA N°10

Pacientes con SIDA o alto riesgo de contraer SIDA (SAR)

| | | | |
|---|--|---|--|
| <p><u>SIDA</u> :</p> | <p>Individuos menores de 60 años. Sin alteraciones inmunológicas previas. Ausencia de enfermedad que cause inmunodepresión. Desarrollan infección oportunista y/o Sarcoma de Kaposi.</p> | | |
| <p><u>SAR:</u></p> <p>Hemofílicos bajo tratamiento de reemplazo</p> | <p><u>Hemofilia A</u></p> <p><u>Hemofilia B</u></p> | <p><u>Tratamiento</u></p> <p>Concentrado Comercial de Factor VIII</p> <p>Crioprecipitado no Comercial</p> <p>Concentrado Comercial de Factor IX</p> | <p><u>Dosis</u></p> <p>Alta BAja</p> <p><u>Designación</u></p> <p>(HA-LIOF-AD) (HA-LIOF_BD)</p> <p>(HA-CRIO)</p> <p>(HB)</p> |
| <p>Varones homo o bisexuales y drogadictos</p> | <p><u>No</u> <u>Hemofílicos</u></p> | <p>Ninguno</p> | |

- b) Sueros: Se extrajo sangre por punción venosa. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se separó por centrifugación y se conservó a -70°C para las determinaciones de CIC, estudios de C, determinación del nivel de Igs. Los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos para los ensayos de leucoaglutinación e inmunofluorescencia.
- c) Gamma globulina agregada : Se utilizó gamma globulina (RA-plasma Fracc II Cohn Difco, Lab, Detroit MICH) agregada por calentamiento a 63°C durante 20 minutos. La preparación se centrifugó a 800 g durante 15 minutos a 4°C y se descartó el precipitado. El contenido proteico del sobrenadante se determinó por lectura en un espectrofotómetro a 280 nanómetros.-

d) Determinación de complejos inmunes circulantes

d-1) Precipitación de CIC

I) Principios :

El polietilenglicol (PEG) es un polímero neutro, lineal, soluble en agua. En concentraciones del 20% precipita la Ig nativa y cuando se utiliza al 3.5-4% precipita los CIC formados "in vivo" o "in vitro" dejando la Ig libre en solución (74,160).

II) Procedimiento:

En tubos de plástico, se coloca 0.1 ml de la muestra y 0.9 ml de tampón borato 0.05M pH 8.4, se agrega 1 ml de PEG 7% (PM 6000). Se agita cada tubo y se colocan a 4°C durante 18 horas. A continuación se vuelven a agitar se centrifugan 1 hora a 12000 g a 4°C. Se vuelca el sobrenadante, se agrega 2 ml de PEG 3.5% y se resuspende el sobrenadante. Finalmente se colocan 2 ml de NaOH 0.1 N y se efectúa la lectura en un espectrofotómetro a 280 nm en cuba de cuarzo. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (UDO_{280}). Las determinaciones de CIC, en las muestras incógnitas, siempre se efectúan en paralelo con sueros humanos normales, individualizados, lo cual permite llevar un control interno de la técnica.

En la Tabla 10' se indican los valores expresados en UDO_{280} y en mg/ml de proteína precipitable por PEG (coef. ext. de IgG humana: 0.812) de distintas concentraciones y preparaciones de γ agregada. La figura 7' corresponde a la curva obtenida con los valores promedios de la Tabla 10' (preparación 2).

En la Tabla 10'' se pueden ver los valores de precipitación con PEG de sueros humanos normales, individualizados, en determinaciones repetidas, en distintos días. La Tabla 10''' muestra los valores de sueros humanos normales, distintos, con los que se obtuvieron los datos de $\bar{X}^{\pm} IS$ para el grupo normal. Con las muestras obtenidas de los pacientes de cada grupo se procedió de igual manera.

d-2) C1q en fase sólida

I) Principios:

El C1q purificado puede absorberse a placas de poliestireno. Con

TABLA 10'

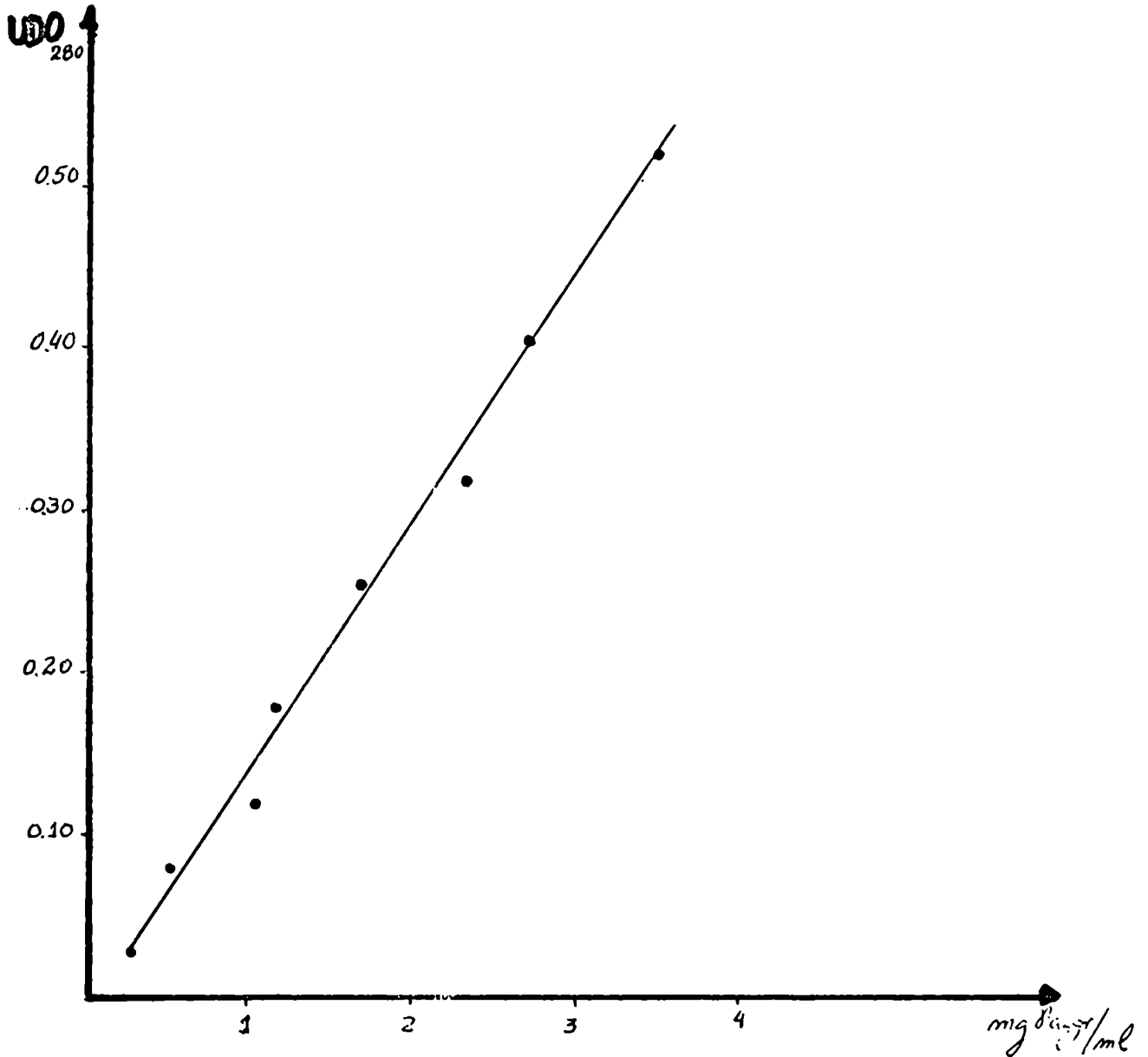
Ejemplos de valoración de la precipitación con PEG en dos preparaciones diferentes de γ agregada

| Preparación 1 γ agregada mg/ml | PEG UDO ₂₈₀ | mg/ml de proteína * precipitada por PEG | Preparación 2 | | | mg/ml de proteína precipitada por PEG \bar{X} (1,2,3) |
|---|---------------------------|--|----------------------------|-----------------------------|------|---|
| | | | γ agregada mg/ml | PEG # UDO ₂₈₀ | | |
| 4.62 | 1.24 | 1.00 | 1 | 2 | 3 | 0.43 |
| 3.46 | 0.98 | 0.65 | - | 0.56 | 0.51 | 0.32 |
| 2.31 | 0.59 | 0.48 | 0.34 | 0.38 | 0.43 | 0.27 |
| 1.15 | 0.30 | 0.24 | 0.23 | 0.30 | 0.34 | 0.20 |
| | | | 0.19 | 0.26 | 0.25 | 0.15 |
| | | | 0.12 | 0.17 | 0.18 | 0.10 |
| | | | 0.12 | 0.12 | - | 0.06 |
| | | | 0.09 | 0.07 | - | 0.03 |
| | | | 0.04 | 0.03 | 0.03 | |

* Coef. de ext. de IgG humana: 0.812; # 1, 2 y 3 corresponden a determinaciones efectuadas en distintos días.

Figura 7'

Curva de η agregada



La η agregada diluida en tampón borato 0.05M, pH 8.4 fué precipitada con PEG. La curva se realizó en base a los datos promedios obtenidos de la preparación 2, que se indican en Tabla 10'.

TABLA 10''

Precipitación con PEG de sueros humanos normales: reproducibilidad del método

| DIA | SHN _a | SHN _b | SHN _c |
|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | UDO ₂₈₀ | UDO ₂₈₀ | UDO ₂₈₀ |
| 1 | 0.10 | 0.10 | 0.16 |
| 2 | 0.10 | 0.14 | 0.18 |
| 3 | 0.16 | 0.19 | 0.18 |
| 4 | 0.10 | 0.15 | 0.20 |
| 5 | 0.13 | 0.19 | 0.15 |
| 6 | 0.18 | 0.17 | 0.16 |
| 7 | | 0.18 | 0.13 |
| 8 | | | 0.15 |
| 9 | | | 0.12 |
| $\bar{X}^{\pm}DS$ | 0.12 [±] 0.03 | 0.16 [±] 0.03 | 0.15 [±] 0.02 |
| n | 6 | 7 | 9 |

Los sueros humanos normales (SHN) a,b y c corresponden a tres individuos normales diferentes. Los sueros son diluïdos 1/10 en tampón borato 0.05M pH 8.4

TABLA 10'''

Precipitación con PEG de sueros humanos normales

| SHN | PEG UDO ₂₈₀ |
|-------------------------|---------------------------|
| 1 | 0.24 |
| 2 | 0.12 |
| 3 | 0.18 |
| 4 | 0.16 |
| 5 | 0.20 |
| 6 | 0.15 |
| 7 | 0.21 |
| 8 | 0.29 |
| 9 | 0.25 |
| 10 | 0.21 |
| 11 | 0.23 |
| 12 | 0.13 |
| 13 | 0.25 |
| 14 | 0.25 |
| 15 | 0.19 |
| 16 | 0.11 |
| 17 | 0.11 |
| 18 | 0.23 |
| 19 | 0.16 |
| 20 | 0.11 |
| \bar{X}^{\dagger} -DS | 0.19 [†] 0.06 |

Los sueros humanos normales (SHN) corresponden a distintos individuos. Las determinaciones se realizaron en diferentes ocasiones en conjunto con los ensayos realizados en los distintos grupos de pacientes.-

el Clq es capaz de combinarse con los CIC y con la gamma globulina agregada, al enfrentar las placas recubiertas con Clq a sueros que poseen los CIC, éstos se adhieren a la fase sólida y pueden ser revelados luego con una reacción inmunoenzimática (Ig-Ab) (ELISA) (79)

II) Procedimiento para la purificación del Clq

Las condiciones del centrifugado para la purificación de Clq son las siguientes: 30 minutos a 12.000 g a 4°C.

Se centrifugan 40 ml de la mezcla de SHN para extraer la capa lipídica. Luego se adicionan 10 ml de sal disódica del ácido etilenediaminotetracético (EDTA) 0.1 M pH 7.5 y se coloca a 37°C durante 10 minutos.

Se transfiere a un baño de hielo. Se ajusta a pH 7.5 y se agregan 400 ml de EDTA 0.005 M pH 7.5 muy lentamente y agitando con suavidad, para evitar la formación de espuma, con una varilla de vidrio. La suspensión se deja 1 hora a 4°C con agitación suave cada 20 minutos.

Se coloca en tubos de plástico transparente para visualizar el precipitado una vez centrifugado. El sobrenadante se descarta, el precipitado se dispersa con una varilla de vidrio, se resuspende en 60 ml de EDTA 0.011 M pH 7.5 y se distribuye en 4 tubos. La operación se repite lavando el precipitado con 30 ml de EDTA 0.011 M pH 7.5 distribuidos en sólo dos tubos. Por último los precipitados se combinan en un único tubo y se lavan con 15 ml de la misma solución. Luego de descartar el sobrenadante, el precipitado final se dispersa y se disuelve en 12 ml de una solución de NaCl 0.75 M EDTA 0.01 M pH 5.0. Se deja la solución durante toda la noche a 4°C. Después de centrifugar el sobrenadante se dializa durante 2 horas contra un litro de EDTA 0.066 M pH 5.0; se cambia el baño de diálisis colocando otro litro de la misma solución y se deja 2 horas más. La suspensión se centrifuga y se lava

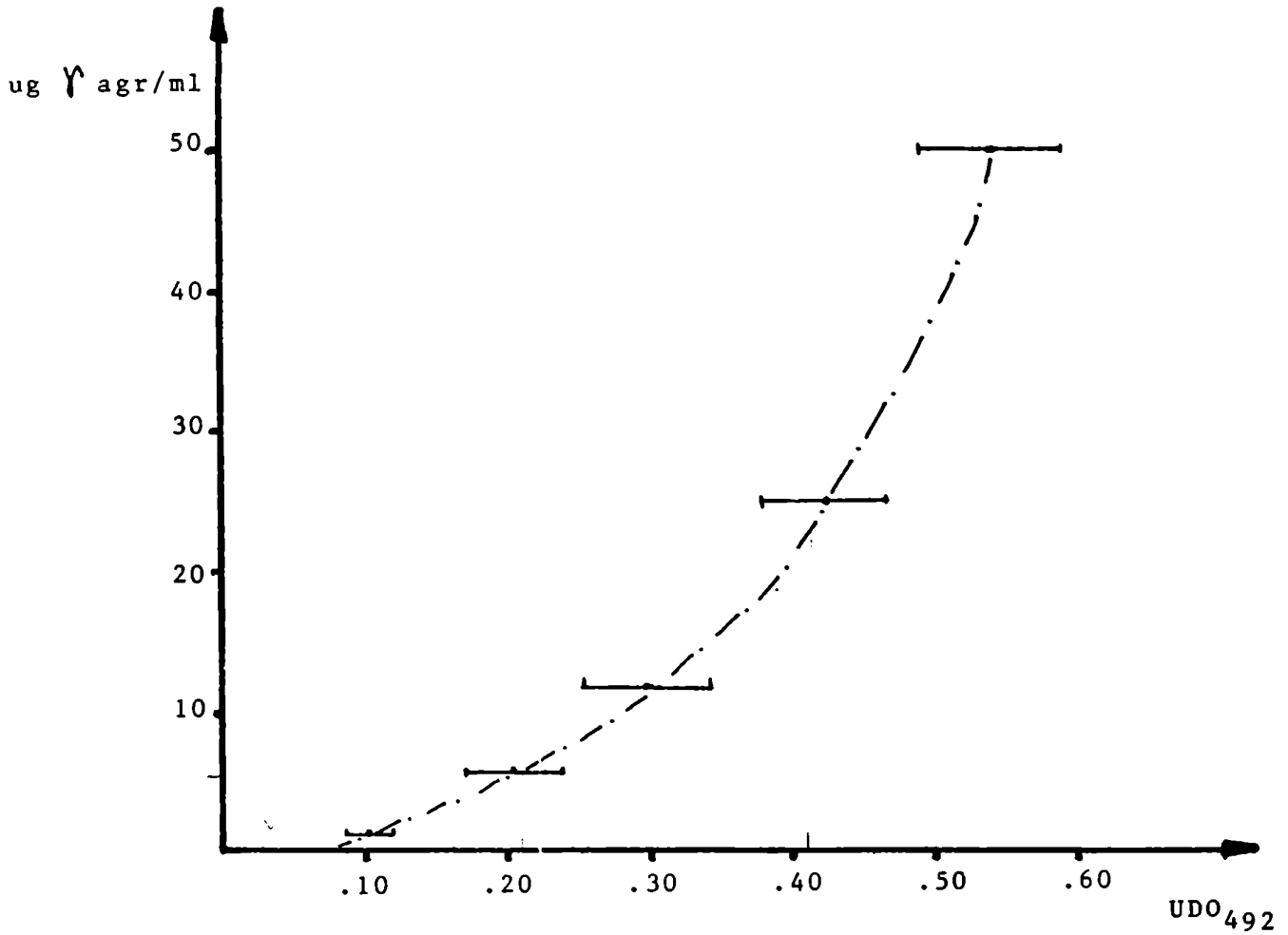
dos veces el precipitado con 5 ml de EDTA 0.066 M pH 7.5 y se deja 2 horas a 4°C antes de centrifugar finalmente en las condiciones indicadas. El Clq purificado está contenido en el sobrenadante límpido. Las proteínas totales pueden determinarse por lectura en un espectrofotómetro a 280 nanómetros, siendo el rendimiento de 1.0 a 1.5 mg/40 ml de mezcla de SHN. La pureza de las preparaciones del Clq se controla por inmunolectroforesis en agarosa al 1% en tampón tris-glicina 0.05 M pH 8.6 NaCl 0.15M.

III) Procedimiento del ELISA (79)

- a) En cada pocillo de la microplaca de poliestireno se colocan 200 ul del Clq purificado (10.0 ug/ml) en solución salina tamponada: 0.15 M NaCl tampón fosfato 0.01 M pH 7.2 (PBS) y se incuba durante 18 horas a 4°C.
- b) Luego se realizan exhaustivos lavados (4-5 veces) con 0.05% Tween 20, 5% suero fetal bovino (SFB) en PBS (T-SFB-PBS); la microplaca se seca por inversión sobre papel de filtro.
- c) En cada pocillo se colocan 200 ul de gelatina al 0.1%, albúmina al 1% en PBS y se incuba durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- d) Paralelamente 1 volumen de cada uno de los sueros se diluyen con 2 volúmenes de EDTA 0.2 M pH 7.5 (Suero/EDTA) y se colocan durante 30 minutos en un baño de agua a 37°C.

Se prepara una curva de gamma globulina agregada con concentraciones de 50 a 3.2 ug/ml en albúmina bovina al 1% en PBS. De cada concentración de gamma globulina agregada se hace una dilución al tercio con EDTA y se colocan en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos (figu-

Figura 8



Curva de gamma globulina agregada (γ agr) con concentraciones de 50 a 3.2 ug/ml .Se indican la \bar{x}^{\pm} ES.

ra 8).

- e) Una vez transcurrido el tiempo de incubación del paso c) se procede tal como se indicó en b).
- f) Los sueros y las distintas concentraciones de gamma globulina agregada se diluyen 1/20 con T-SFB-PBS. Se colocan 200 ul de cada muestra en los pocillos de la microplaca (por duplicado). Se incuba en cámara húmeda durante 60 minutos a 37°C y 30 minutos a 4°C.
- g) Se repite b).
- h) En cada pocillo se colocan 200 ul de la dilución del suero anti-IgG humana marcada con peroxidasa en PBS albúmina bovina al 1%. La dilución del suero se determina por pruebas previas pudiendo ser de 1/1000 a 1/4000. Se incuba durante 30 minutos en cámara húmeda a 37°C.
- i) Se repite b).
- j) Se coloca 200 ul en cada pocillo del sustrato (H₂O₂) al 0.5% en tampón fosfato 0.1 M pH 6.2, 0.4 mg/ml OPD. Se deja durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- k) La reacción se detiene mediante la adición de 100 ul de SO₄H₂ 4N.
- l) Se realiza la lectura de la microplaca en un equipo apropiado a 492 nanómetros.
Los resultados se expresan como unidades de densidad óptica (UDO₄₉₂).

e) Niveles séricos de Inmunoglobulinas: La concentración sérica de Ig se realizó por inmunodifusión radial en placas Nor-Partigen (Boehringer Werke, Argentina, Boehringer).

f) Valoración del Sistema Complemento

- f-1) Niveles séricos de C3 y C4: Las concentraciones séricas de C3 y C4 se realizaron por inmunodifusión radial en placas Nor-Partigen (Boehringer Werke, Argentina, Boehringer).
- f-2) Nivel hemolítico total (CH50): La valoración del nivel hemolítico total de C se determinó según el método descrito por Kent y Fife (114).
- f-3) Actividad de la Vía Alternativa del Complemento (VAC): Se realizó según la técnica descrita por Aguado y col (115). Para ello 200 ul de cada dilución de los sueros (1/15 a 1/27) en solución tamponada de veronal conteniendo 10 mM de ~~ETA~~TA y 0.5 mM Mg⁺⁺ fueron incubados con 100 ul de una suspensión de glóbulos rojos de conejo marcados con ⁵¹Cr durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se separaron por centrifugación los sobrenadantes de los sedimentos globulares. La radioactividad presente en cada una de las fracciones se determinó en un contador gamma. Los resultados fueron graficados en papel logarítmico y el título de VAC se calculó en base a la máxima dilución del suero capaz de lisar el 50% de los glóbulos rojos marcados.
- f-4) Solubilización de CI marcados con ¹²⁵I: La capacidad del suero de solubilizar complejos inmunes preformados (SCI-ensayo de redisolución mediado por C), se estudió de acuerdo a la técnica descrita por Sakurai y col (116). La IgG anti-ovoalbúmina (OA-SIGMA, grado V, Lab St. Louis, USA) fue purificado por cromatografía de afinidad y posteriormente marcada con ¹²⁵I_{Na} utilizando la técnica de cloramina T. Los CI fueron precipitados en una relación molar Ac/Ag: 3.4/1.- La actividad específica de la IgG fue de 0.3 uCi/ug de proteína. El ensayo fue realizado incubando 40 ul de suero con 20 ul de la solución de complejos inmunes OA-¹²⁵I-IgG anti-OA (conteniendo 5.0ug de Ac) durante 45 minutos a 37°C en solución tamponada 0.15mM

Ca⁺⁺ y 0.5 mM Mg⁺⁺. Luego se agregaron 0.44 ml de una suspensión de eritrocitos ovinos al 0.1% en solución tamponada conteniendo 10 mM EDTA pH 7.4 y se centrifugó la mezcla a 5000 g durante 10 minutos, determinándose la radioactividad presente en el precipitado y sobrenadante. Los resultados se expresaron como % de ¹²⁵I liberado al sobrenadante, que fue calculado de la siguiente forma:

$$\begin{array}{l} \text{liberación} \\ \text{de } ^{125}\text{I} \\ \text{(\%)} \end{array} = \frac{\text{cpm sobrenadante}}{\text{cpm del sobrenadante} + \text{cpm del precipitado}} .$$

g) Células :

I) Los leucocitos mononucleares (LM) se obtuvieron a partir de sangre heparinizada de pacientes y dadores normales por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (117).

II) Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) de pacientes neutropénicos y normales se purificaron a partir de sangre desfibrinada por agitación y centrifugación sobre Ficoll Hypaque (117). Se recogió la fracción conteniendo eritrocitos y granulocitos, se diluyó aproximadamente al medio con solución fisiológica (SF), se agregó dextrán 6 % en SF (Dextran 150 Pharmacia Uppsala) en una proporción de tres partes de suspensión celular y una parte de Dextrán 6%. Luego de incubar una hora a 37°C se separó el sobrenadante rico en granulocitos y

se lavó tres veces son SF centrifugando 10 minutos a 400 g. Los eritrocitos contaminantes se eliminaron por shock osmótico con H₂O durante 30 segundos, en frío, restituyendo la tonicidad inmediatamente. Después del tercer lavado los PMN se resuspendieron a 5×10^6 cel/ml en MTC 199/10 mM EDTA. La contaminación con LM no fue mayor del 5%.

g-1) Viabilidad celular: Se determinó por la técnica de exclusión de azul tripán. Se mezclaron 0.1 ml de azul tripán (0.16% en SF) y 0.1 ml de la suspensión celular y se leyó al microscopio óptico entre los 5 y 15 minutos subsiguientes. La viabilidad fue medida al completar cada preparación celular (90-99%) y al finalizar las lecturas de leucoaglutinación (80-90%).

h) Inmunofluorescencia

I) Indirecta: Se incubaron 0.1 ml de una suspensión de células PMN con 0.1 ml de suero autólogo, homólogo o con 0.1 ml de gamma globulina agregada (50.0ug/ml), 30 minutos a 37°C. Luego se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y se realizaron dos lavados con MTC 199, 10 mM EDTA pH 7.5.-A continuación los sedimentos fueron incubados, durante 45 minutos a 4°C, con isotiocianato de fluoresceína (Cappel Lab) y se realizaron tres lavados en MTC 199, 10 mM EDTA pH 7.5.-Finalmente cada sedimento se resuspendió con 0.025 ml de glicerina 60% en PBS. Se coloca una gota sobre un portaobjeto; se cubre y se sella. La lectura se efectúa en un microscopio de fluorescencia (Zeiss con epiiluminación). Los resultados se expresan como porcentaje de células que fluorescen sobre el número total de células contadas.

II) Directa: Se efectúa el mismo procedimiento descrito para inmunofluorescencia indirecta en ausencia de suero.

- i) Leucoaglutinación: Se colocan en tubos plásticos (de 1 ml volumen total) 0.1 ml de una suspensión de células PMN (5×10^6 células/ml) preparada en MTC 199, 10 mM EDTA pH 7.5.-Se preparan de cada muestra de suero diluciones 1/10, con el mismo medio en que se resuspenden las células y se colocan 0.1 ml en el tubo que contiene los PMN. Se agitan y se incuban durante 2 horas a 37°C y 18 horas a 4°C. Pasado ese período de tiempo se colocan en baño de hielo y antes de efectuarse la lectura, en un microscopio óptico, cada tubo se agita fuertemente para eliminar los agregados débiles de células que pudieron formarse. Con un capilar se carga la muestra en una cámara y se leen las células aglutinadas y no aglutinadas. Los resultados se expresan como porcentajes de células aglutinadas sobre el total de células contadas. El control positivo para la leucoaglutinación se realizó utilizando un antisuero preparado por inmunización de conejos con homogenato de PMN humanos obteniéndose un 97-99% de aglutinación. El control con suero de conejo no inmunizado reveló ausencia de aglutinación. Un 46% de leucoaglutinación se obtuvo con gamma globulina agregada (0.5 mg/ul).
- j) Función supresora inducida por Concanavalina A (Con A):
El ensayo se llevó a cabo como se describiera previamente (118)
- j-1) Primer cultivo : (fase de inducción): Los linfocitos mononucleares provenientes de pacientes o de dadores normales, se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero AB Rh (+). Se incubaron durante 24 horas a 37°C con o sin el agregado de 10.0 ug/ml de Con A (Sigma). Finalizado el período de preincubación se lavaron 3 veces con RPMI 1640. Posteriormente, se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640 y se trataron durante 30 minutos a 37°C con 50.0ug/ml de mitomicina C (Sigma) para prevenir la división celular; tanto las células estimuladas con Con A y tratadas con mitomicina C (células su-

presoras), como las tratadas solamente con mitomicina C (células control), se lavaron 3 veces con RPMI 1640, ajustándose la concentración final a 1×10^6 células/ml en medio completo.

j-2) Segundo cultivo (fase de proliferación): alícuotas de 100 ul de linfocitos mononucleares de pacientes o dadores normales mantenidos en cultivo durante la noche (células indicadoras) se cultivaron en microplacas (Falcon 3042) durante 72 horas con 20 ul de una dilución 1/100 de fitohemaglutinina (PHA-P-Difco, Lab. CA. USA) en presencia de 100 ul de células supresoras. A esa combinación de células indicadoras más células supresoras, se le da un pulso de 1 mCi/ml de ^3H -timidina, durante las últimas 18 horas del cultivo. Las placas se recogieron automáticamente y la radioactividad se leyó en un contador Beckman LS100C. El porcentaje de supresión se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ supresión} = \frac{\text{cpm (control+ indicadoras)} - \text{cpm (control+supresoras)}}{\text{cpm (control + indicadoras)}} \times 100$$

Paralelamente se realizaron combinaciones alogeneicas, co-cultivando células supresoras de los pacientes con células indicadoras provenientes de un dador normal y viceversa.

En los co-cultivos alogeneicos entre normales, los valores de supresión no fueron significativamente diferentes a los obtenidos en los cultivos autólogos.

Cuando para cantidades fijas de células indicadoras, se utilizaron diferentes proporciones de células supresoras, la actividad funcional, en los normales fue proporcional a la cantidad de células supresoras agregadas en relaciones de 0.025/1 a 1/1 (supresora-indicadora).

La eficiencia de supresión funcional se calculó en base a la relación

$$\text{Indice de supresión Inducida por Con A} = \frac{\% \text{ de supresión}}{\% \text{ células Leu 2 (+) en fase de inducción}}$$

k) Estadística

Las pruebas que se aplicaron fueron las siguientes:

- a) Prueba de T de Studente (paramétrica)
- b) Prueba de Wilcoxon (no paramétrica)
- c) Prueba de Chi Cuadrado (para diferencias entre proporciones)

Los cálculos de las probabilidades se obtuvieron con una computadora IBM.

l) Colaboración

Los ensayos de solubilización de CI fueron realizados en colaboración con el Bioquímico Jorge Geffner.

Los ensayos de supresión fueron llevados a cabo en colaboración con las Dras María del C. Sasiain, B. Ruibal Ares, S. de la Barrera y la Sra M. Felippo.

RESULTADOS

a) Pacientes con LES

El LES se considera un prototipo de la enfermedad mediada por CI. Las manifestaciones de los CI se evidencian por una sintomatología muy variada que incluye glomerulonefritis, artritis, vasculitis, dermatopatías, etc.

Si bien no está correctamente establecido el mecanismo que operaría, podría estar vinculado a la presencia de CI en tejidos (110). Fundamentalmente esta hipótesis se aplica al papel de los CIC en la producción de daño renal. La presencia crónica de los CI circulantes aumentaría el componente de riesgo en la evolución de esta patología.

En nuestros pacientes con LES se evaluó el nivel de CIC en suero y se estudió el perfil humoral del sistema C, uno de los protagonistas importantes en el manejo y destino de los CIC.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N°9. En ambos grupos patológicos, es decir en los pacientes con LES en actividad (LES-a) y en los pacientes con LES en remisión (LES-r), los niveles de CIC, precipitados con PEG están significativamente elevados y el nivel de CH50 significativamente descendidos en comparación con el grupo control normal.

Cuando se estudia la vía alternativa del complemento (VAC) y la capacidad solubilizadora del suero (SCI) se observa una diferencia significativa entre los grupos LES-a y LES-r; para VAC $p < 0.0002$ y para SCI $p < 0.00005$ (Tabla N°11).

En la Tabla N°12 se muestra la proporción de pacientes LES-a y LES-r con valores alterados de CH50, VAC, SCI y CIC. El 58% de los pacientes LES-a y sólo el 6% del grupo LES-r

tienen niveles descendidos de VAC. La capacidad solubilizadora del suero (SCI), en los pacientes LES-a se encuentra descendida en el 54% y sólo en el 6% de los pacientes LES-r. El grupo LES-a a su vez incluye pacientes con VAC y SCI simultáneamente descendidos (58%), mientras que en el grupo LES-r ninguno de los pacientes presenta esta característica.

En algunos casos se efectuó simultáneamente la valoración de CIC por precipitación con PEG y por ELISA. Como puede observarse en la Tabla N° 13 los niveles de CIC precipitados con PEG están significativamente elevados en ambos grupos, tal como ya se observara en la Tabla N° 11. En cambio al valorar CIC por ELISA solo el grupo LES-a presenta niveles significativamente elevados respecto al control normal.

TABLA N° 11

Actividad hemolítica del complemento (C), solubilización de complejos inmunes (SCI) y complejos inmunes circulantes (CIC) en pacientes con LES y controles normales

| Pacientes | Edad | Actividad hemolítica de C | | SCI ¹²⁵ I-liberado % | CIC UDO280 |
|--------------------|---------------|---------------------------|---------------------|---------------------------------------|------------------------|
| | | unidades/ml | | | |
| LES-r * | | CH50 | VAC | | |
| 1 | 30 | 240 | 135 | 23 | 0.37 |
| 2 | 28 | 188 | 176 | 18 | 0.28 |
| 3 | 41 | 130 | 135 | 15 | 0.20 |
| 4 | 30 | 149 | 135 | 17 | 0.56 |
| 5 | 55 | 232 | 140 | 24 | 0.40 |
| 6 | 22 | 20 | 65 | 37 | 1.00 |
| 7 | 29 | 123 | 135 | 12 | 0.16 |
| 8 | 33 | 153 | 117 | 13 | 0.30 |
| 9 | 45 | 131 | 135 | 19 | 0.80 |
| 10 | 32 | 159 | 142 | 28 | 0.26 |
| 11 | 35 | 149 | 98 | -- | 0.40 |
| 12 | 42 | 85 | 135 | 21 | 0.29 |
| 13 | 44 | 181 | 125 | 13 | 0.28 |
| 14 | 49 | 123 | 135 | 13 | 0.60 |
| 15 | 30 | 207 | 130 | 13 | 0.42 |
| 16# | 25 | 188 | 135 | 26 | 0.11 |
| 17 | 41 | 194 | 125 | 5 | 0.60 |
| $\bar{x} \pm$ DS | | 156 ⁺ 54 | 129 ⁺ 22 | 19 ⁺ 8 | 0.41 ⁺ 0.23 |
| LES-a** | Edad | CH50 | VAC | SCI | CIC |
| 18 | 26 | 95 | 84 | 10 | 0.40 |
| 19 | 34 | 95 | 108 | 11 | 0.25 |
| 20 | 30 | 125 | 128 | 14 | 0.44 |
| 21 | 25 | 20 | 65 | 8 | 0.26 |
| 22 | 29 | 130 | 136 | 9 | 0.30 |
| 23 | 35 | 148 | 135 | 10 | 0.26 |
| 24 | 35 | 148 | 65 | 6 | 0.29 |
| 25 | 33 | 96 | 65 | 4 | 0.24 |
| 26 | 27 | 288 | 65 | 4 | 1.16 |
| 27 | 25 | 116 | 65 | 4 | 0.21 |
| 28 | 27 | 156 | 65 | 4 | 0.39 |
| 29 | 35 | 128 | -- | 12 | 0.30 |
| 30 | 33 | 97 | 75 | 7 | 0.90 |
| $\bar{x} \pm$ DS | | 126 ⁺ 60 | 88 ⁺ 30 | 8 ⁺ 3 | 0.42 ⁺ 0.29 |
| Controles normales | rango de Edad | CH50 | VAC | SCI | CIC |
| $\bar{x} \pm$ DS | 22-44 | 230 ⁺ 40 | 105 ⁺ 14 | 17 ⁺ 4 | 0.19 ⁺ 0.06 |

Leyenda de la Tabla N°11

- * Pacientes con LES en remisión (LES-r)
- ** Pacientes con LES en actividad (LES-a)
- # El paciente N°16 era el único de sexo masculino del grupo LES en estudio.

Los CIC se evaluaron por precipitación con PEG. La vía alternativa del C (VAC) y la capacidad solubilizadora de CI, (SCI) se efectuó según se indica en Materiales y Métodos. Para la estadística se aplicó la prueba de t de Student. Los resultados se indican como $\bar{X} \pm DS$. LES-r vs LES-a para VAC $p < 0.0002$ y para SCI $p < 0.00005$. LES-r vs control normal para CH50 $p < 0.05$. LES-a vs control normal para CH50 $p < 0.02$.

TABLA N° 12

Proporción de pacientes con niveles alterados en suero de: complejos inmunes circulantes (CIC), actividad hemolítica total del complemento (CH50), vía alterna del complemento (VAC) y actividad solubilizadora de complejos inmunes (SCI)

| | CIC | CH50 # | VAC # # | SCI # # | VAC y SCI # # # |
|-----------|---------------|--------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------|
| Pacientes | > 0.31 UD0280 | < 150 unidades /ml | < 77 unidades /ml | 125 I liberado < 9% | por debajo del rango normal |
| LES-r * | 9/17 | 8/17 | 1/17 | 1/16 | 0/16 |
| % | 53 | 47 | 6 | 6 | 0 |
| LES-a** | 5/13 | 11/13 | 7/12 | 7/13 | 7/12 |
| % | 38 | 85 | 58 | 54 | 58 |

Se indica el número de individuos de cada grupo que tienen niveles alterados de CIC ($>\bar{X} + 2DS$), CH50 ($<\bar{X} - 2DS$), VAC ($<\bar{X} - 2DS$), SCI ($<\bar{X} - 2DS$). *Pacientes con LES en remisión. ** Pacientes con LES en actividad. Significación estadística (Prueba de Chi-Cuadrado) # $p < 0.08$, ## $p < 0.04$, ### $p < 0.003$

TABLA N° 13

Evaluación de complejos inmunes circulantes en pacientes con
Lupus eritematoso sistémico

| Pacientes | CIC | n | CIC | n |
|-----------|-------------------------|----|--------------------------|----|
| | UD0280 | | UD0492 | |
| LES-a | 0.54 [±] 0.32* | 12 | 0.31 [±] 0.10** | 15 |
| LES-r | 0.38 [±] 0.21 | 14 | 0.13 [±] 0.07 | 15 |
| Normales | 0.19 [±] 0.06 | 20 | 0.15 [±] 0.04 | 24 |

LES-a: pacientes con lupus eritematoso sistémico en actividad.

LES-r: pacientes en remisión. Las determinaciones de CIC (UD0280) fueron obtenidas por precipitación con PEG y los CIC (UD0492) por la técnica de ELISA. Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm DS$. Se aplicó la prueba de t de Student . * $p < 10^{-6}$; ** $p < 0.0002$.-

b) Pacientes con Neutropenia

Los estudios se efectuaron en las muestras obtenidas de pacientes seleccionados de acuerdo a la descripción que se indica en la Tabla N°9 .

La neutropenia idiopática crónica es considerada una patología hematológica benigna, que se manifiesta por una notoria disminución de las células PMN (menos de 2000 células/mm³ de sangre) por lo cual el individuo neutropénico resulta vulnerable a contraer infecciones, no severas, siendo las más comunes las dérmicas y/ o pulmonares.

La persistencia de CIC podría desempeñar un papel importante en el secuestro de las células PMN, ya sea por acción inespecífica, es decir a través de los RfC o por una acción específica mediada por anticuerpos antineutrófilos. El resultado final en ambos casos sería la eliminación del neocomplejo (PMN-CIC y/o PMN-Ac anti-neutrófilo).

A diferencia de lo que ocurre en LES, estos pacientes no presentan un daño renal asociado a los CIC.

En este trabajo se analizó el significado de la presencia crónica de los CIC con la inducción de la leucopenia.

Los resultados de la valoración de CIC, C4 y C3 se muestran en la Tabla N°14. Los niveles de CIC, evaluados por precipitación con PEG están significativamente elevados respecto al grupo control normal. Los niveles de C3 y C4 séricos, determinados por inmunodifusión radial no presentan diferencias significativas

Se hicieron además estudios sobre la población remanente de PMN en los pacientes con neutropenia. Por un lado se determinó la presencia de Ig asociada a la membrana de PMN por inmunofluorescencia directa (Tabla N°15-A), no encontrándose diferencias entre la proporción de PMN con Ig asociada a la membrana en los individuos normales y pacientes.

En cambio al analizar la capacidad del suero de los pacientes neutropénicos para unirse a la membrana de PMN normales (PMN-N) se observó que tanto por inmunofluorescencia indirecta como por aglutinación, los sueros de los pacientes eran capaces de reaccionar con la superficie de PMN-N (Tabla N°15-B).

Las pruebas de leucoaglutinación producida por los sueros neutropénicos revelaron la presencia de dos subpoblaciones de pacientes : A) con alto poder aglutinante y b) con bajo poder aglutinante, equivalente al expresado por el grupo control normal (Tabla N°15-B). Se examinó además la posibilidad de que los PMN de los pacientes (PMN-p) tuvieran diferente comportamiento frente a la Ig agregada o monomérica (ofrecida por el suero humano normal). Así en los resultados que se muestran en la Tabla N°15 se observa que los PMN-p tienen mayor avidez por captar Ig monomérica (23^+_{-18} ; n= 11) que los PMN-N (13^+_{-8} ; n=19), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0125$). Sin embargo el comportamiento de los PMN-p no difiere de los PMN-N cuando son incubados con gamma globulina agregada o con sueros CIC positivos. (Tabla N°16).

TABLA N° 14

Complejos inmunes circulantes y niveles de complemento
en pacientes neutropénicos

| Sueros | CIC | | C4 | | C3 | |
|---------------|-------------------------|----|---------------------|----|---------------------|----|
| | UDO280 | n | mg/dl | n | mg/dl | n |
| neutropénicos | 0.32 [±] 0.09* | 14 | 160 [±] 46 | 12 | 131 [±] 43 | 10 |
| normales | 0.19 [±] 0.06 | 20 | 101 [±] 17 | 10 | 129 [±] 39 | 10 |

Los niveles de complejos inmunes circulantes (CIC) se determinaron por precipitación con PEG (UDO280) y los niveles de C4 y C3 por ~~inmunodifusión~~ **ra dial**. En todos los casos se indica la $\bar{X} \pm DS$. Se aplicó la prueba de t de Student. * p<0.0005.

TABLA N° 15

evaluación de Inmunoglobulina asociada a la membrana de PMN y evaluación de la capacidad de unión de inmunoglobulina del presente en el suero a PMN-normales

| A | | B | | | | | |
|---------|----------------------|---|-----------------|----------------------|----|--------------------------|----|
| células | % IFD | n | Suero humano de | % IFI | n | % aglutinación | n |
| PMN-p | 2.3 ⁺ 2.1 | 7 | paciente | 38 ⁺ -16* | 14 | a) 21 ⁺ - 11* | 7 |
| PMN-n | 2.8 ⁺ 2.6 | 7 | normal | 13 ⁺ - 8 | 19 | b) 3 ⁺ - 3 | 11 |

A: Inmunofluorescencia Directa (IFD) sobre células PMN de pacientes neutropénicos (p) y de individuos normales (n) Se indican los resultados como \bar{X}^+ DS

B: Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y leucoaglutinación sobre células PMN de individuos normales a) grupo de pacientes con alto poder aglutinante b) grupo de pacientes con bajo poder aglutinante Se indican los resultados como \bar{X}^+ DS. Se aplicó la prueba de t de Student * $p < 0.0005$.

Fijación de inmunoglobulina, por inmunofluorescencia indirecta, a la membrana de células PMN de pacientes neutropénicos e individuos normales

| | Incubadas con: | IFI | | n |
|----------|----------------|---------------------|-------|----|
| | | % de fijación de Ig | | |
| | SH-n | 23 ⁺ | 18 # | 11 |
| * PMN-p | SH-p | 22 ⁺ | 15 | 7 |
| | γ agreg | 29 ⁺ | 14 | 5 |
| | SH-n | 13 ⁺ | 8 | 19 |
| ** PMN-n | SH-p | 38 ⁺ | 16 ## | 14 |
| | γ agreg | 22 ⁺ | 4 | 4 |

Las células PMN se obtuvieron como se indica en Materiales y Métodos. Se incubaron en presencia del suero autólogo, homólogo o con 50 ug /ml de gamma globulina agregada por calor (γ agreg), durante 30 minutos a 37 °C. El % de IFI se determinó después de incubar con F(ab)2 IgG-FITC. * PMN del paciente, ** PMN de individuos normales. Se indica la \bar{X}^+ DS. Se aplicó la prueba de t de Student. # p<0.0125 cuando células PMN-p se incuban con suero humano normal (SH-n). ## p<0.005 cuando las células PMN-n se incuban con suero del paciente (SH-p). El cálculo probabilístico se efectuó en comparación con PMN-n incubados con SH-n.-

c) Pacientes hemofílicos

A partir del descubrimiento del factor VIII concentrado en el crioprecipitado del suero fresco humano (121) los pacientes con hemofilia mejoraron notablemente su calidad de vida, pudiéndose integrar a una actividad normal.

Las preparaciones de Factor VIII y IX (terapia de reemplazo en hemofilia A y B respectivamente) se obtenían en forma masiva a partir de una mezcla de numerosísimos dadores voluntarios de sangre. La dosis diaria utilizada por paciente como profilaxis para evitar hemorragias, fue aumentando con el tiempo. Como consecuencia de ello, el paciente hemofílico se expuso a una extraordinaria cantidad de proteínas extrañas y/ o virus presentes en los concentrados plasmáticos.

Así, se describen en estos individuos diversos desórdenes inmunológicos, (anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica, etc), enfermedades del hígado, marcadores del virus de la hepatitis B (HBV).

La combinación de estas enfermedades y los desórdenes inmunológicos, presentan similitud con lo observado en los pacientes con SIDA, sugiriéndose como una probable vía de contaminación la sangre a partir de la cual se aíslan los factores VIII y IX.

Por tal razón, los pacientes hemofílicos, tratados sin recaudos en la selección de dadores para la obtención de los concentrados, son considerados sujetos de alto riesgo (SAR) de contraer SIDA.

Los pacientes SAR hemofílicos se reagruparon según presentaran o no sintomatología asociada al complejo SIDA. En la Tabla N°17 se observan los resultados obtenidos al evaluar la presencia de CIC por precipitación con PEG y por ELISA, los niveles de C3, C4 y de Ig circulantes. La prueba de ANOVA, aplicada para establecer las diferencias entre los grupos patológicos y el control normal indica una diferencia significativa de los CIC evaluados por PEG ($p < 0.0007$). Sin embargo no se detectan CIC fijadores de C, por ELISA. No se observa descenso de los niveles de C3 y de C4 pero el grado de significación obtenido para C3 ($p < 0.004$) manifiesta un aumento respecto al grupo control normal en los pacientes con sintomatología asociada al SIDA. La valoración de las Igs séricas (A, G, y M) indica que la IgG está significativamente elevada respecto al grupo control normal ($p < 0.0002$) en los pacientes con hemofilia.

Resultados semejantes se aprecian para pacientes con SIDA y SAR no hemofílicos, si bien en el grupo SAR no hemofílico, los CIC (ELISA) son ligeramente elevados con respecto al control ($p < 0.03$). En este grupo de pacientes se analizó además la actividad funcional del sistema C, para valorar la capacidad de manejo de los CIC. Los resultados indican que la actividad VA y VC están preservadas (Tabla N°18).

Se ha postulado que uno de los factores de riesgo para la contaminación con el agente causal del SIDA es el grado de exposición a los concentrados que puedan aportar el agente infeccioso (HIV: human immunodeficiency virus). Así, se analizó en un grupo de pacientes sin síntomas del complejo SIDA la influencia que pudieran tener la dosis y tipo de concentrado recibido sobre el nivel

de CIC, componentes de C e Igs séricas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N°19. Se observan las mismas alteraciones indicadas en los pacientes asintomáticos, en su totalidad, es decir alteraciones a nivel de C3, CIC, evaluados por PEG y nivel de IgG sérica. Los valores elevados de C3 se observan en aquellos pacientes que recibieron altas dosis de Factor VIII ($p < 0.01$). Niveles elevados de CIC (PEG) los presentan todos los individuos hemofílicos, independientemente del tratamiento recibido. Todos los grupos presentan niveles significativamente elevados de IgG, excepto aquellos que recibieron bajas dosis de Factor VIII. Un nivel aún mayor se obtiene en los pacientes que recibieron Factor IX.

Los niveles de CIC precipitados por PEG, se correlacionaron en forma directa con los valores de IgG sérica de los pacientes que recibieron altas dosis de Factor VIII ($r = 0.76$, $p < 0.0005$); crioprecipitado ($r = 0.65$; $p < 0.025$) y Factor IX ($r = 0.90$; $p < 0.0005$).

La evaluación de CIC por ELISA no mostró diferencias con el grupo control normal.

Los elevados niveles de CIC (PEG) y de IgG circulantes en estos pacientes hemofílicos manifiestan un desbalance regulatorio.

Ya que los CIC pueden activar o deprimir funciones mediadas por células, en este estudio se incluyeron pruebas funcionales que permitieron evaluar la actividad de las células T supresoras de los pacientes.

Los datos obtenidos de la evaluación de la actividad supresora de los pacientes hemofílicos se correlacionaron con los niveles de CIC. La figura N°9 indica que la actividad supresora en el grupo que recibió altas dosis de Factor VIII está inversamente relacionada con el nivel de CIC, en el mismo individuo. Esto resulta evidente al confrontar células supresoras de pacientes hemofílicos con células indicadoras de los

mismos pacientes (cultivo autólogo) o de individuos normales (co-cultivo alogeneico), figura 9 A y B. Por lo tanto, las células potencialmente supresoras de los pacientes con niveles elevados de CIC, responden en menor grado al estímulo inductor de la supresión (Con A), que aquellas de los pacientes con bajo nivel de CIC. En los demás grupos tratados se observó la misma tendencia.

TABLA N° 17

Niveles séricos de complejos inmunes circulantes, complemento e inmunoglobulinas en pacientes hemofílicos

| Pacientes hemofílicos | CIC * | CIC | C3** | C4 | IgA | IgG*** | IgM |
|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | UD0280 | UD0492 | mg/dl | mg/dl | mg/dl | mg/dl | mg/dl |
| sintomáticos | 0.50 [±] 0.30 | 0.18 [±] 0.05 | 160 [±] 42.8 | 35.1 [±] 14 | 291 [±] 118 | 2271 [±] 891 | 229 [±] 124 |
| n | 52 | 27 | 11 | 11 | 10 | 11 | 11 |
| asintomáticos | 0.38 [±] 0.26 | 0.16 [±] 0.06 | 128 [±] 72.1 | 34.7 [±] 6 | 240 [±] 188 | 2048 [±] 303 | 251 [±] 83 |
| n | 32 | 19 | 6 | 5 | 6 | 5 | 5 |
| normales | 0.19 [±] 0.05 | 0.15 [±] 0.04 | 80 [±] 8 | 36.4 [±] 11 | 229 [±] 87 | 1230 [±] 244 | 169 [±] 79 |
| n | 20 | 24 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |

Pacientes hemofílicos (A y B) con sintomatología de SIDA y asintomáticos. Las valoraciones de CIC se realizaron por precipitación con PEG (UD0280) y por ELISA (UD0492), los niveles de C e Ig se realizaron por inmunodifusión radial. Se aplicó la prueba de ANOVA. *: p < 0.0007, ** p < 0.0004 y *** p < 0.0002.

TABLA N° 18

Niveles de complejos inmunes circulantes, IgG y complemento en pacientes con SIDA y SAR no hemofílicos

| Pacientes | CIC UD0280 | | CIC UD0492 | | IgG mg/dl. | | Actividad hemolítica del C unidades/ml | | | |
|-------------------|------------|---------------------------|------------|----------------------------|-------------------------------------|-----------|--|------------------------|----------------------|----|
| | n | \bar{X} | n | \bar{X} | n | \bar{X} | CH50 | VAC | | |
| SIDA | 8 | 0.42 [†] -0.17* | 2 | 0.07 [†] -0.0 | 2097 [†] -349 [#] | 3 | 304 [†] -150 | 4 93 [†] -18 | 3 | |
| SAR-no hemofílico | 26 | 0.35 [†] -0.24** | 6 | 0.20 [†] -0.07*** | 1777 [†] -764 [#] | 9 | 280 [†] -108 | 14 94 [†] -15 | 8 | |
| Normales | 20 | 0.19 [†] -0.06 | 24 | 0.15 [†] -0.04 | 1230 [†] -244 | 11 | 230 [†] - | 40 15 | 105 [†] -14 | 18 |

SIDA: pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. SAR-no hemofílicos: sujetos de alto riesgo de contraer SIDA. CIC(UD0280): Complejos inmunes circulantes evaluados por precipitación con PEG. CIC(UD0492) complejos inmunes circulantes evaluados por la técnica de ELISA. CH50: actividad hemolítica total del C. VAC: actividad hemolítica mediada por la vía alterna del C. Los resultados se expresan como \bar{X} [†]-DS. Se aplicó la prueba de t de Student * p<0.00001; ** p<0.005; *** p<0.03; # p<0.0002, ## p<0.03

TABLA N° 19

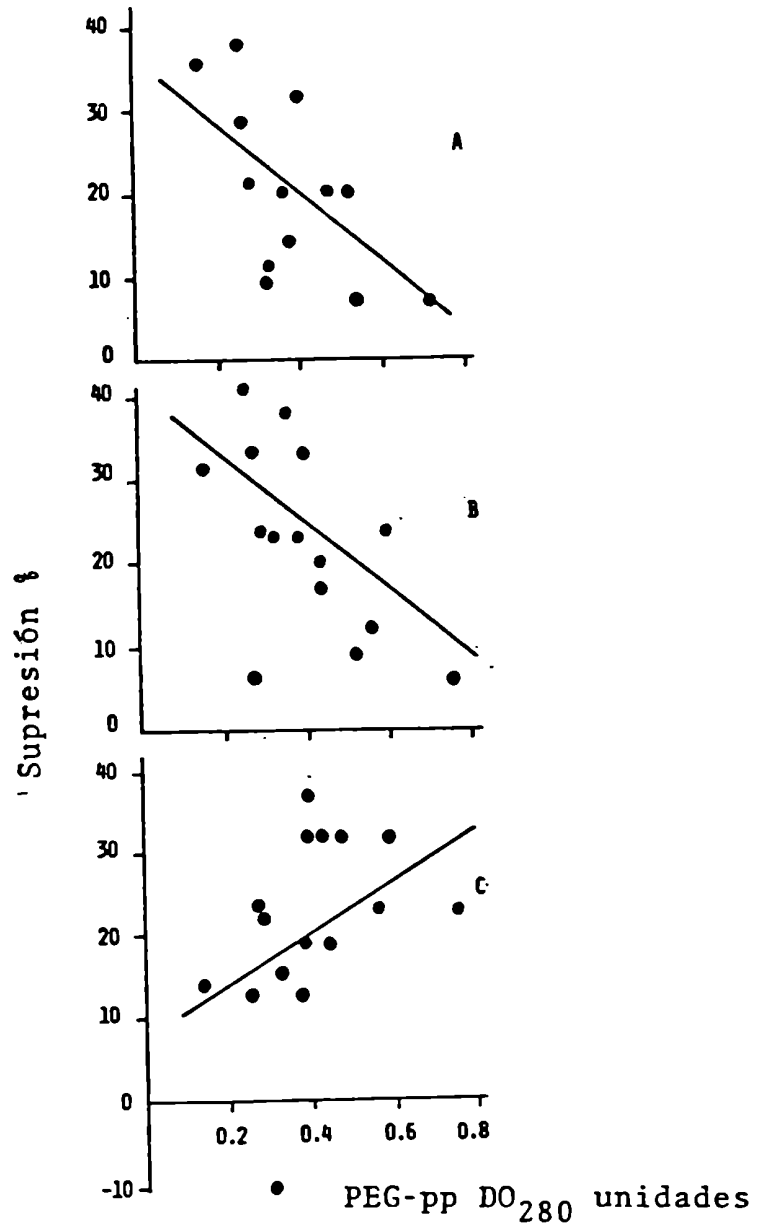
Niveles séricos de complemento, complejos inmunes circulantes e IgG en pacientes con

hemofilia A. B y normales

| Pacientes | C3 * | | C4 | | CIC ** | | CIC | | IgG *** | |
|-----------|------------------------|----|------------------------|----|------------------------|----|------------------------|----|-----------------------|----|
| | mg/dl | n | mg/dl | n | UD0280 | n | UD0492 | n | mg/dl | n |
| AD | 92.9 [±] 13.3 | 14 | 34.1 [±] 10.7 | 14 | 0.36 [±] 0.11 | 14 | 0.15 [±] 0.04 | 10 | 1758 [±] 373 | 15 |
| BD | 88.2 [±] 22.6 | 8 | 38.2 [±] 4.4 | 7 | 0.36 [±] 0.14 | 8 | 0.15 [±] 0.03 | 5 | 1705 [±] 711 | 8 |
| CRIO | 91.4 [±] 31.2 | 6 | 49.3 [±] 25.9 | 6 | 0.38 [±] 0.16 | 7 | 0.14 [±] 0.01 | 3 | 1798 [±] 291 | 7 |
| HB | 68.4 [±] 14.8 | 6 | 26.1 [±] 8.4 | 6 | 0.51 [±] 0.18 | 7 | 0.13 [±] 0.06 | 7 | 2328 [±] 641 | 7 |
| Normales | 79.9 [±] 7.6 | 11 | 36.4 [±] 11.5 | 11 | 0.19 [±] 0.05 | 20 | 0.15 [±] 0.04 | 24 | 1227 [±] 233 | 12 |

HA: pacientes con hemofilia A; que recibieron altas dosis de Factor VIII (AD), bajas dosis (BD) y crioprecipitado (CRIO). HB: pacientes con hemofilia B, que recibieron Factor IX. Las valoraciones de C3, C4 e IgG se realizaron por inmunodifusión radial, las determinaciones de CIC por precipitación con PEG (UD0280) y por ELISA (UD0492). Se indican los resultados como $\bar{X} \pm DS$. La prueba estadística que se aplicó es la de Wilcoxon. * Nivel de C3 elevado AD vs grupo normal, $p < 0.01$; ** Niveles elevados de CIC (PEG) respecto al grupo control normal para AD $p < 10^{-6}$; BD $p < 0.00002$, CRIO $p < 0.002$, HB $p < 0.00004$. *** Niveles elevados de IgG respecto al grupo control normal AD y CRIO $p < 0.004$ y HB $p < 0.0004$.

FIGURA 9



Leyenda de la figura N° 9

Función supresora inducida por Con A en relación al nivel de complejos inmunes circulantes en el grupo de pacientes con hemofilia A que recibieron altas dosis de Factor VIII:

Los complejos inmunes circulantes (CIC) fueron estimados por precipitación con PEG (UDO₂₈₀).

La actividad funcional supresora inducida por Con A se ensayó en cultivos autólogos con células supresoras e indicadoras de los pacientes (A) o en combinaciones alogeneicas, utilizando células supresoras de los pacientes en la etapa de inducción y células indicadoras normales en la etapa de proliferación (B) o células normales supresoras y células indicadoras de los pacientes (C).

A: $r = -0.62, p < 0.05$; B: $r = -0.58, p < 0.05$; C: $r = 0.41, NS$

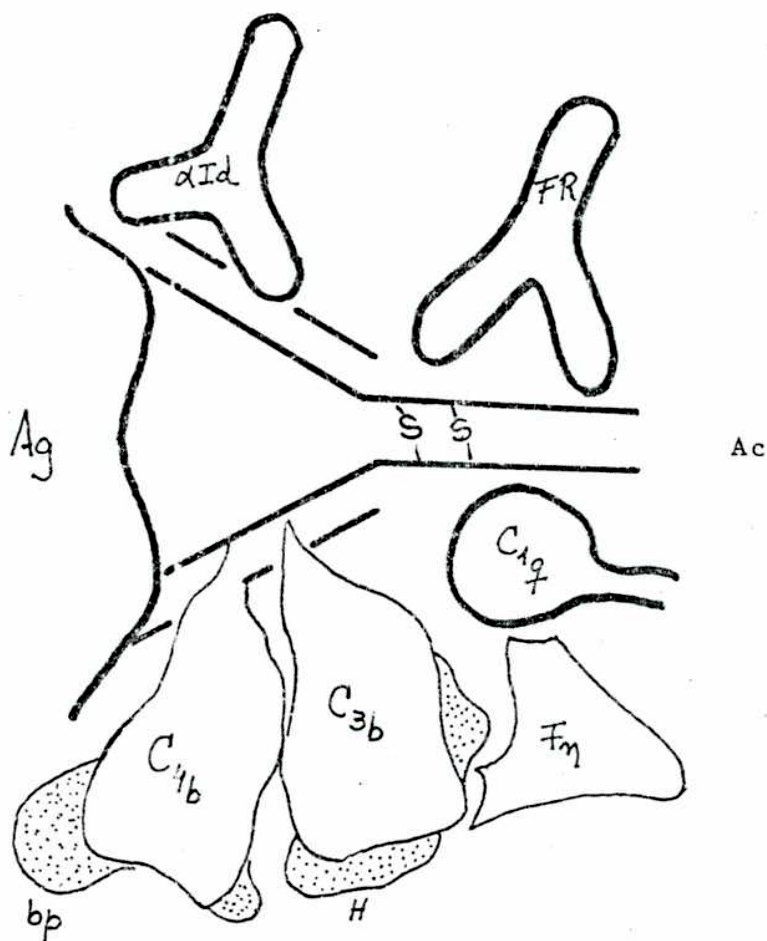
DISCUSION

Un individuo en su medio habitual, se encuentra expuesto constantemente a cientos de antígenos diferentes, cuando estos son internalizados, el organismo procederá a sintetizar y secretar los correspondientes anticuerpos que se unirán a esos antígenos y los eliminarán de la circulación en forma de complejo inmune. La formación de CI es parte de la respuesta inmune normal y es necesaria para la activación de funciones efectoras, las cuales a su vez procederán a la eliminación del complejo. Esto significa la eliminación del antígeno extraño que logró atravesar las primeras barreras de protección ofrecidas por piel y mucosas.

La detección de un nivel basal de CIC, en sueros de individuos normales, resulta fisiológica y se observan cambios cuantitativos y cualitativos de éstos en los individuos sanos (122).

Sin embargo, la persistencia de los CIC perturba el equilibrio dinámico del sistema inmune, puesto que una vez formados actúan como verdaderos disparadores para los sistemas de reconocimiento humoral y celular. Diferentes interacciones pueden establecerse con componentes del sistema C, fibronectina, factor reumatoideo y componentes anti-idiotípicos, cada una de esas proteínas afectan el tamaño e influyen en el destino de los CIC (123) (Figura 10).-

Figura 10



Ag:antígeno;Ac:anticuerpo, Id:anti-idiotipo;FR:factor reumatoideo,C4b y C3b:fragmentos de C4 y C3;bp:proteína que se une a C4b;H:proteína control;Clq:cabeza globular de C1q,Fn: fibronectina.-

En este trabajo hemos enfocado el estudio de los CIC en patologías, en las cuales su presencia es una manifestación constante; es posible que contribuyan al desarrollo de la patología en sí (LES, neutropenia) o bien que tengan impacto sobre la regulación del sistema inmune y sobre la activación de sistemas efectoros (Hemofilia, SAR).

A continuación se discutirán independientemente los resultados obtenidos en las diferentes patologías:

A) LES; B) Neutropenia; C) Hemofilia

A) LES

La valoración de CIC precipitados por PEG involucra un amplio espectro de complejos cualitativamente diferentes (124); incluye los CIC fijadores y no fijadores de C, independientemente de la clase de Ig a la que pertenezca el Ac (IgG, IgA, IgM). El rango de tamaño de los CIC precipitados por PEG es de 7 a 22 S, sin embargo en los pacientes con LES, los CIC precipitados tienen entre 7 y 19 S (27), ese rango se considera pequeño si se compara con los precipitados del suero de pacientes con artritis reumatoidea, 22S (125).

Nuestros resultados (Tablas N° 11 y 12) indican que los pacientes con LES en actividad y LES en remisión tienen niveles de CIC significativamente elevados, cuando se los compara al grupo control normal. Estos datos confirman la presencia de CIC, en los pacientes con LES y concuerdan con datos obtenidos por otros investigadores, utilizando una metodología similar (124).

La persistencia de los CIC en esta patología, puede explicar la derivación a manifestaciones tales como vasculitis, glomerulonefritis, etc. Actualmente se piensa que la glomerulonefritis por CI puede originarse por la formación de CI "in situ" (126), es decir por la reacción de Ac circulantes con Ag glomerulares intrínsecos o bien con el Ag circulante que se deposita preferentemente en el glomérulo. No obstante, la reacción inflamatoria iniciada por los complejos in situ, puede amplificarse por una continua deposición de CIC, conjuntamente con la participación de otros factores, tales como los que ofrece el sistema complemento con la consiguiente progresión y cronicidad del daño renal.

Estudiamos globalmente el sistema complemento en los pacientes con LES y por los resultados obtenidos (Tabla N° 11) se observa que la capacidad hemolítica total del suero en los dos grupos LES-a y LES-r está significativamente descendida respecto al

grupo control normal, evidenciándose una activación del sistema C que involucra probablemente la vía clásica.

Cuando en estos pacientes se efectuaron los estudios que permitían evaluar la capacidad hemolítica del C, mediada por la vía alterna (VAC), se observó que los pacientes LES-a presentaban niveles significativamente inferiores al grupo LES-r. Este descenso observado es relevante ya que si bien la vía alternativa cumple numerosas funciones, parece tener un papel importante en la patogénesis de la glomerulonefritis (127).

Los trabajos de Miller y Nussenzweig (99) indican que la capacidad solubilizadora del suero, es decir la posibilidad de solubilizar complejos inmunes (SCI) precipitantes, preformados (in vitro) requeriría la integridad de la VAC. La Tabla N°9 muestra que el grupo LES-a presenta niveles de SCI significativamente descendidos respecto al grupo control normal; estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores (101, 128) quienes sugieren que valores por debajo del rango normal para SCI están asociados a una perspectiva de evolución menos favorable en LES y en otras enfermedades con niveles altos de CIC. A partir de los resultados obtenidos (Tabla N°11 y 12) se puede decir que la valoración de VAC y SCI sería de utilidad para discriminar entre los pacientes LES en actividad y en remisión. Ninguno de los pacientes del grupo LES-r presentó descenso simultáneo de la actividad funcional de VAC y SCI.

La falta de correlación encontrada entre la cantidad total de CIC, determinada por PEG, y la severidad de la enfermedad, podría explicarse si no se considera como factor principal (para evaluar el posible rol patogénico de los CIC en LES), el nivel absoluto de los CIC, que incluye complejos fijadores y no fijadores de C.

Sin embargo, la evaluación del nivel de CIC aplicando una técnica que involucra fijación de los CIC al primer componente del sistema C (ELISA), indica que sólo el grupo LES-a presenta nivel de CIC elevado respecto al grupo control normal.

La evaluación, por dos técnicas que se apoyan en diferentes propiedades físicas y biológicas de los complejos, en esta patología, resulta de gran utilidad. Las determinaciones de CIC por diferentes técnicas fue propuesta a partir del trabajo en conjunto de varios investigadores (96). Los CIC pueden variar ampliamente, de acuerdo a la patología, en sus propiedades físicas tales como tamaño, relación Ag/Ac, clase de Ac, etc. Además pueden variar en una misma patología. Nosotros observamos, por la precipitación con PEG, la presencia de CIC en ambos grupos, sin especificar sus propiedades; por la valoración con ELISA detectamos una subpoblación, con capacidad de activar el sistema C y que sólo está presente en los pacientes en actividad.

El sistema C cumpliría un papel preponderante como mecanismo compensatorio de la acción fisiopatogénica de los CIC, disminuyendo el tamaño y modificando las características de la red original (99, 100, 129, 130).

De acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo los pacientes LES-a tendrían una deficiente capacidad de desembarazarse de aquellos complejos inmunes con potencial inflamatorio, pronosticando una evolución de la enfermedad asociada a perspectivas poco favorables.-

Conclusiones:

1.-Los niveles de complejos inmunes circulantes (CIC) evaluados por precipitación con polietilenglicol (PEG), evidencian la presencia y persistencia de estos en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), independientemente del estado de la enfermedad.

2.-La capacidad hemolítica total del sistema complemento (C) está descendida en los pacientes con LES en actividad (LES-a) y en remisión (LES-r), si bien el descenso es significativamente mayor en el grupo LES-a.

3.-La actividad hemolítica del C, mediada por la vía alternativa (VAC) está significativamente descendida en el grupo LES-a.

4.-La actividad solubilizadora de complejos inmunes (SCI), mediada por C, está significativamente descendida en el grupo LES-a.

5.-Únicamente el grupo LES-a incluye pacientes con VAC y SCI simultáneamente descendidos.

6.-Los niveles de CIC, evaluados por un ensayo inmunoenzimático (ELISA) están significativamente elevados en el grupo LES-a.

En términos prácticos se postula que es de mayor utilidad la valoración conjunta de la actividad de sistemas involucrados en el manejo y depuración de los complejos inmunes, que la sola determinación de su contenido global.

B) Neutropenia

Por trabajos experimentales, se demostró (131) que los CI interactúan con los PMN ocasionando el secuestro de estas células en el lecho vascular de riñones y pulmones. La extrapolación de estos estudios a humanos, podría explicar la disminución de neutrófilos circulantes en pacientes neutropénicos.

En nuestro grupo de pacientes los niveles elevados de CIC evaluados por precipitación con PEG (Tabla N°14) concuerdan con los obtenidos por otros investigadores (102); los niveles de C3 y C4 del sistema C no difieren significativamente de los valores normales (Tabla N°14).

En este trabajo además de la valoración de CIC, nos interesó efectuar estudios sobre la población de PMN "remanentes". De acuerdo a los datos recogidos, en los PMN de los pacientes no se detectó Ig adherida a su membrana (Tabla N°15-A). Si bien otros investigadores (132) encontraron niveles elevados de IgG asociada a PMN, en 12 de 16 individuos con neutropenia de etiología desconocida, estos pacientes presentaban una enfermedad inmunológica asociada (púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune o LES), lo cual no concuerda con la selección de nuestros pacientes (ver Tabla N°9).

Los estudios del suero de pacientes neutropénicos sobre los PMN-n (Tabla N°15-B), señalan en primer lugar, por técnicas de IFI, que los pacientes poseen mayor cantidad de factores séricos que pueden adherirse a la membrana de PMN-n; estos resultados van acompañados de un elevado nivel de CIC de los sueros. En segundo lugar, por técnicas

de leucoaglutinación, se distinguen dos subpoblaciones de pacientes, una de ellas (a) incluye pacientes cuyos sueros tienen un alto poder aglutinante, mientras que la otra (b) presenta un comportamiento equivalente al obtenido en el grupo normal.

La leucoaglutinación positiva puede ocurrir por interacción de los CIC presentes en el suero con los RFc de los PMN o por interacción del Ac-anti PMN con determinantes expresados sobre la membrana celular. No se puede distinguir si la leucoaglutinación depende de una u otra de las interacciones o si las dos ocurren simultáneamente.

Por su parte la leucoaglutinación negativa, podría ocurrir porque los PMN del donante normal no expresan los determinantes Ag específicos (103) para los factores séricos presentes en el suero del paciente en estudio. Si la leucoaglutinación es negativa empleando sueros CIC positivos y PMN-n es necesario asumir que los CIC no son capaces de reaccionar con el RFc de los PMN-n.

Sabemos que por IFI y por leucoaglutinación se detectarían diferentes componentes séricos, de acuerdo al trabajo de Engelfried y Van Loghem (133).

Fleit y col (134) demuestran la existencia de RFc de baja afinidad sobre la membrana de PMN, por Ac monoclonales (3G8) y consideran que debe ocurrir una progresiva pérdida de RFc de alta afinidad durante la diferenciación mielóide para que sólo se expresen los RFc de baja afinidad en la población madura.

Sobre los PMN normales (135) fue demostrada la presencia de receptores para IgG1 con baja afinidad pero con mayor afinidad para sus dímeros y oligómeros, con estabilidad a temperaturas de 4°C más que a 37°C.

Nuestras condiciones óptimas de tiempo y temperatura, para la reacción de leucoaglutinación, se seleccionaron a partir de distintos esquemas, resultando necesaria una incubación previa a 37°C, durante 2 horas y una incubación prolongada (18 horas) a 4°C, para evidenciar los factores leucoaglutinantes, lo que está demostrando la posible existencia de receptores de baja afinidad.

Mostramos por IFI que los PMN de los pacientes captan mayor cantidad de Ig monomérica, que los PMN normales, cuando se incuban con suero humano normal. De acuerdo a lo expresado anteriormente los PMN poseen baja afinidad para la Ig monomérica (135), por lo cual los resultados de la Tabla N°16 indicarían que puede ocurrir alguna alteración a nivel de membrana en los PMN de los pacientes. Podría también explicarse esa diferencia en el comportamiento, si se considera que la población "remanente" de PMN de los pacientes expresan en mayor proporción Rfc de alta afinidad (característica de los estadios menos maduros).

Gallin (136), por su parte considera la existencia de una heterogeneidad en los PMN circulantes normales, la cual puede ser demostrada por diversos métodos. Así los defectos de la función del neutrófilo reflejarían diferencias en la distribución de la población de PMN. La heterogeneidad sin embargo podría deberse simplemente a variantes en la madurez de los PMN circulantes.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (137,138) demostraron que si los pacientes neutropénicos con niveles elevados de CIC, evaluados por PEG y por Clq, en fase fluída, eran sometidos a plasmaféresis, disminuía el nivel de CIC, acompañándose de un aumento en el número de células PMN circulantes. Consecuentemente con estos resultados se sostuvo que la neutropenia no se debería a problemas en la diferenciación del neutrófilo, sino al secuestro del neo-complejo CIC-PMN. Esta hipótesis es compartida por otros investigadores (102,131).

No se descarta que a través del tratamiento por plasmaféresis se vea favorecida la depuración de los CIC y de cualquier otro factor sérico que pueda colaborar en la remoción de los PMN del torrente circulatorio.

A pesar de la efectividad de la plasmaféresis que sugiere el papel fundamental de factores séricos (CIC o anticuerpos) en la inducción de la neutropenia, los resultados de este trabajo no permiten asegurar que los CIC por sí mismos sean los responsables de la neutropenia y enfatizan la diferencia en el comportamiento de los PMN de los pacientes comparado al de los PMN de individuos normales.

Conclusiones:

1.-Los niveles de complejos inmunes circulantes (CIC) evaluados por polietilenglicol (PEG), están significativamente elevados respecto al grupo control normal.

2.-No se detectan alteraciones significativas de los niveles de C3 y C4 séricos.

3.-Por inmunofluorescencia indirecta y por leucoaglutinación se evidencia la presencia de factores en el suero de los pacientes, capaces de adherirse a la membrana celular de PMN normales.

4.-Las células PMN de los pacientes captan mayor porcentaje de inmunoglobulina monomérica del suero humano normal que las células PMN de los individuos normales.

5.-Las células PMN de los pacientes se comportan en forma similar a las células PMN de los individuos normales en cuanto a la captación de polímeros de inmunoglobulina (sueros CIC positivos o gamma globulina agregada por calor).

En base a estos resultados, se sugiere introducir en la clasificación de los pacientes con neutropenia idiopática crónica, un subgrupo de pacientes con neutropenia asociada a CIC. Esta observación, por sí misma, sería de utilidad para el médico clínico.

En algunos pacientes, los CIC podrían estar relacionados con los factores aglutinantes del suero.

Los estudios sobre los PMN remanentes de los pacientes con neutropenia, indican que además de la posible participación de los CIC en esta patología, deben tenerse presentes las alteraciones en la membrana de los PMN.

C) Hemofilia

Los pacientes con hemofilia A y B integran el grupo de sujetos de alto riesgo (SAR) de contraer SIDA puesto que se ha considerado que el agente causal de esa patología puede ser transmisible a través de la sangre o de los factores antihemofílicos derivados de ella (139).

Los grupos de pacientes que se incluyen en este trabajo, con o sin adenopatías generalizadas u otros síntomas propios del complejo SIDA (Tabla N°17) presentaron niveles elevados de CIC evaluados por PEG. No se detectaron CIC fijadores de C, evaluados por ELISA, excepto en un solo paciente, con sintomatología (0.32 UDO₄₉₂) que correspondió al único individuo con compromiso renal hepático adicional.

Asimismo en los pacientes hemofílicos no se detectaron descensos de los niveles de C3 y C4, si bien puede señalarse un aumento significativo de C3 en el grupo con sintomatología. Como los componentes de C son reactivos de fase aguda, es difícil interpretar la causa de la elevación de C3.

En el grupo control de pacientes con SIDA y SAR no hemofílicos también se observaron altos niveles de CIC y en su gran mayoría, no fueron capaces de reaccionar con el sistema C (ELISA negativo). No se detectaron alteraciones del sistema C y de acuerdo a los datos medios obtenidos, la capacidad hemolítica total del C y la capacidad hemolítica mediada por la vía alterna no presentaron diferencias significativas al ser comparadas con los valores medios del grupo normal. La IgG sérica se encontró significativamente elevada (Tabla N°18).

Se aprecia entonces que tanto en los pacientes SAR hemofílicos como en no hemofílicos y SIDA, la presencia de CIC elevados es una constante. Parece más probable que esté asociada a un proceso masivo de estimulación, ya que tanto en los pacientes con hemofilia y drogadictos (vía de exposición endovenosa) como en los homosexuales (vía mucosa) los niveles de CIC por PEG son elevados. Tampoco parece que la infección con HIV sea un requisito para la generación de CIC. Tanto los pacientes asintomáticos, seropositivos, como en los asintomáticos, seronegativos, presentan CIC elevados (140). La infección con HIV agravaría la situación al acentuar los defectos de regulación inmune.

En todos los pacientes estudiados en esta serie la presencia de CIC elevados no se asocia a daño renal. Estos datos serían acordes con la capacidad del sistema C de estos pacientes para manejar adecuadamente los CIC (Tabla N°18).

Simultáneamente con los factores antihemofílicos, los pacientes hemofílicos (SAR) reciben otras proteínas contaminantes. Así la fibronectina, que co-precipita con criofibrinógeno está presente en el Factor VIII (141). Esto permitiría pensar que el material precipitable con PEG puede estar inespecíficamente aumentado por la presencia de ese complejo proteico. Se ha demostrado la presencia de CIC por técnicas que detectan complejos fijadores de C, en hemofilia, los cuales podían ser relacionadas con los trastornos articulares y renales en algunos pacientes (142); tales sintomatologías están ausentes en el grupo SAR hemofílicos que se estudia en este trabajo. Es de tener en cuenta sin embargo, que la fibronectina puede interferir en la evaluación de CIC por ELISA, ya que puede unirse al

Ciq (figura N°10) e inhibir la reacción (123,143).

Los altos niveles de CIC y de IgG en grupo de pacientes SAR hemofílicos y en el de SIDA y SAR no hemofílicos (Tabla N°17 y 18 respectivamente) apoyarían indirectamente la existencia de una activación B policlonal. En este sentido se ha demostrado en las células B de los pacientes, una mayor producción espontánea de inmunoglobulinas, in vitro, que la de los linfocitos B normales e inhibición de la activación de las células B de esos individuos con diversos mitógenos (144,145).

En cuanto a la calidad de Igs presentes en los pacientes SAR hemofílicos hay un aumento selectivo de IgG. En individuos SAR no hemofílicos, adultos y niños, se han detectado niveles séricos elevados del isotipo IgG1 que correlacionan negativamente con IgG2 e IgG3 (146); la IgG4 en cambio a menudo se encuentra descendida. En cambio, en los pacientes SIDA no hemofílicos, los niveles de las distintas subclases eran variables. El predominio de la IgA (147) en pacientes SAR y SIDA no hemofílicos y el aumento selectivo de IgG en el grupo SAR hemofílico (Tabla N°17) podrían deberse a las diferentes vías de inoculación del agente causal (HIV) para cada una de estas patologías.

En los pacientes hemofílicos (SAR) asintomáticos, en quienes se estudió el efecto de la dosis y el tipo de concentrado, se manifestaron alteraciones similares; niveles elevados de C3 y de CIC, independientemente del tratamiento recibido (Tabla N°19).

Sólo el grupo que recibió bajas dosis de Factor VIII presentó niveles normales de IgG. Por el contrario, los niveles más elevados se detectaron en los pacientes con hemo-

filia B que recibieron Factor IX. Esto puede atribuirse a diferentes características en el proceso de purificación del concentrado de Factor IX, pudiendo influir en el nivel sérico de Ig, por infusión directa.

Los CIC podrían a su vez ejercer una alteración adicional del equilibrio inmune. Así, los complejos que fijaran y en consecuencia liberaran fragmentos de C podrían incrementar la función supresora ya que se ha demostrado que colaborarían en la generación de células Ts (148).

Además, los CIC podrían unirse a RFc de las células e inhibir las funciones celulares dependientes de ellos. Se ha demostrado por experimentos in vitro, que los CIC inhiben la actividad citotóxica de los macrófagos, contra células tumorales (149) u otras células blancas (150).

Por otra parte se sabe que los complejos al reaccionar con macrófagos suscitan la intensa síntesis de derivados del metabolismo del ácido araquidónico como la PGE2 y leucotrienos (151,152) que a su vez tienen importantes efectos moduladores de la respuesta inmune en general (153).

Con respecto al manejo de la respuesta inmune contra el agente infeccioso responsable del SIDA, se ha demostrado que los CIC podrían inducir células T supresoras específicas contra el idiotipo (154).

Basados en estas suposiciones, algunos autores han intentado la remoción de los CIC por plasmaféresis en SIDA pero los resultados indican que los efectos beneficiosos serían transitorios (155).

Las alteraciones en la inmunidad celular de los pacientes hemofílicos fueron descritas por otros investigadores (156,157,158). Asimismo, en nuestro laboratorio se realizaron estudios de inmunidad celular que incluyeron entre otros

la evaluación de la actividad supresora de células T, de los pacientes SAR hemofílicos.

Como los CIC pueden activar o deprimir funciones mediadas por células, resultó de interés correlacionar los datos obtenidos de la actividad funcional supresora de células T con el nivel de CIC de los mismos pacientes. Se obtuvo una correlación inversa en el grupo con hemofilia A que recibió altas dosis de Factor VIII liofilizado. Si los valores altos fueran la consecuencia de una supresión inadecuada cabría esperar que la actividad supresora se relacionara directamente con el nivel de IgG sérica, no obstante esto no fue observado. Los CIC, sin embargo podrían contribuir reduciendo en forma directa la actividad supresora. Se ha demostrado en este sentido que la actividad supresora disminuye, cuando los linfocitos T son incubados con CI que contienen IgG previo el agregado de Con A (159).

Conclusiones:

1.-Los niveles de complejos inmunes circulantes (CIC) evaluados por precipitación con polietilenglicol (PEG), están significativamente elevados en los pacientes que integran el grupo de sujetos de alto riesgo (SAR) de contraer SIDA, hemofílicos y no hemofílicos.

2.-No se detectan CIC fijadores de complemento en hemofilia.

3.-No se observa descenso de C3 ni de C4.

4.-Los niveles de IgG sérica, son elevados, excepto en el grupo que recibió bajas dosis de Factor VIII. También son elevados en SIDA y en el grupo SAR no hemofílicos.

5.-Los niveles de CIC (PEG) del grupo que recibió altas dosis de Factor VIII, correlacionan inversamente con la actividad supresora de células T de los mismos pacientes.

En estos pacientes SAR hemofílicos, la presencia de CIC (PEG) elevados asociada a un defecto en la generación de supresión T inespecífica sugiere su participación en el trastorno general de regulación inmune.

Conclusiones generales

Tal cual se describió en la página 2 el objetivo de este estudio fue saber si las determinaciones de los niveles de complejos inmunes circulantes (CIC) en sueros patológicos, ofrecen un valor diagnóstico y/o pronóstico en sí mismas y si en las patologías asociadas con niveles elevados de CIC era posible correlacionar ese parámetro con aspectos funcionales de inmunidad celular. Por otra parte nos propusimos analizar la utilidad de estudiar en forma simultánea otros parámetros humorales asociados al manejo de los CIC.

De los resultados expuestos en cada una de las secciones surge que en patologías en las cuales se detecta la presencia de CIC, se requeriría el estudio de otros parámetros que permitan evaluar el posible efecto de los complejos en la fisiopatogenia de la enfermedad.

Así en patologías como el LES, en las que el compromiso renal es factor determinante del curso de la enfermedad, el estudio funcional de la vía alternativa del C y la capacidad solubilizadora de complejos mediada por C resultan de utilidad para discriminar entre los pacientes en actividad y en remisión. Los niveles séricos y la caracterización de las distintas subclases de IgG orientarían en cuanto al posible comportamiento de los CIC como agentes determinantes del daño renal.

En patologías como la neutropenia, se destaca la necesidad de analizar no sólo la presencia de factores séricos, CIC o anticuerpos anti-neutrófilos capaces por sí mismos de acelerar la remoción de los PMN del torrente circulatorio, sino que se enfatiza la conveniencia de estudiar la afinidad de los receptores celulares capaces de combinarse con dichos factores humorales.

En hemofilia (sujetos de alto riesgo -SAR- de contraer SIDA) así como en el grupo control de pacientes con SIDA y SAR no hemofílicos, el interés de estudio de los CIC se vincula fundamentalmente a su posible papel como elementos involucrados en trastornos de inmunoregulación. No parecen asociarse a trastornos de la función renal o activación sistémica del complemento.

Las conclusiones generales del presente estudio son las siguientes:

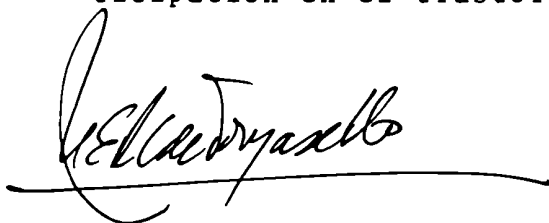
1.- Los niveles de CIC (PEG) se encuentran significativamente elevados en todas las patologías estudiadas: Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Neutropenia, Hemofilia y en el grupo control de pacientes con SIDA y SAR no hemofílicos.

2.- Los CIC fijadores de complemento (ELISA) se encuentran significativamente elevados en pacientes con LES en actividad y discretamente elevados en el grupo SAR no hemofílicos.

3.- En el LES es de utilidad diagnóstica realizar la medición de la actividad de la vía alterna (VA) y solubilización de CIC (SCI) en conjunto con la valoración global de CIC -PEG y CIC -ELISA .

4.- La evaluación de CIC (PEG) permitiría introducir un subgrupo de pacientes con neutropenia asociada a CIC, en la clasificación de los pacientes con neutropenia idiopática crónica.

5.- En los pacientes hemofílicos (SAR hemofílicos) la presencia de CIC (PEG) elevados asociada a un defecto en la generación de supresión T inespecífica sugiere su participación en el trastorno general de regulación inmune.-



BIBLIOGRAFIA

- 1 .-Sell, Stewart: Leucocytes. "Immunology Immunopathology and Immunity" 3th edition, 60; 1980
- 2 .-Finstad, J. and Good, R.A.: The evolution of the immune response III Immunologic response in the lamprey. J. Exp Med 120:1151; 1964
- 3 .-Von Pirquet, C.L. Allergy, Arch Intern Med 7:259; 1911
- 4 .-Germuth, F.G.: A comparative histologic and immunologic study in rabbits to induced hypersensitivity of the serum sickness type. J Exp Med 97:257; 1953
- 5 .-Germuth, F.G. & McKinnon, G.E.: Studies on the biological properties of antigen-antibody complexes. I Anaphylactic shock induced by soluble antigen-antibody complexes in unsensitized normal guinea pigs. Johns Hopkins Med J 101:13; 1957
- 6 .-Dixon, F.; Vazquez, J.J.; Weigie, W. & Cochrane C: Pathogenesis of serum sickness. Arch Pathol 65:18; 1958
- 7 .-Dixon, F.J.; Feldman, J.D. & Vazquez, J.J.: The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. J Exp Med 113:899; 1961
- 8 .-Rabellino, E.E.; Colon, S.; Grey, H.M. & Unanue, R: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I Distribution and quantitation. J Exp Med 133: 156; 1971
- 9 .-Vitetta, E.S. & Uhr, J.W.: Cell surface Ig. V Release from murine splenic lymphocytes. J Exp Med 136:676; 1972
- 10.-Vitetta, E.S.; Baur, S. & Uhr, J.W.: Cell surface Ig: II Isolation and characterization of Ig from mouse splenic lymphocytes. J Exp Med 134:242; 1972
- 11.-Natvig, J.B. & Kunkel, H.G.: Human immunoglobulins: classes, subclass genetic variants and idiotypes. Adv Immunol 16:1; 1973
- 12.-Galvert, J.E.: A function for IgD? Immunology Today 7:136; 1986
- 13.-Kunkel, H.G.; Mannik, M. & Williams, R.C.: Individual antigenic specificity of isolated antibodies. Science 140:1218; 1963
- 14.-Frank, M.M.: Complement. Current Concepts, 1985
- 15.-Mayer, M.M.: Complement and complement fixation In Kabat EA (Ed) Experimental Immunochemistry, ed 2, Springfield, III, Charles C Thomas Publisher, 133; 1961
- 16.-Ratnoff, O.L. & Naff, G.B.: The conversion of C'1s to C'1 esterase by plasmin and trypsin. J Exp Med 125:337; 1967
- 17.-Ward, P.A.; Chaptis, J.; Conroy, M.C. & Lepow, I.H.: Generation by bacterial proteinases of leukotactic factors from human serum and human C3 and C5. J. Immunol 110:1003; 1973

- 18.-Gotze,O.;Muller-Eberhard,:Lysis of erythrocytes by complement in the absence of antibody.J Exp Med 132:898,1970
- 19.-Pillemer,L;Blum,L.& Lepow,I.H.:The properdin system and innmunit I.Demonstration and isolation of a new serum protein,properdin and its role in immune phenomena.Science 120:279,1954
- 20.-Clagett,J.A.;Wilson,C.B. & Weigle,W.O.:Intestinal immune comple thyroiditis in mice.The role of autoantibody to thyroglobulin. J Exp Med 140: 1439,1974
- 21.-Perrin,L.A.& Oldstone,M.B.A.:The formation and fate of virus antigen-antibody complexes.J Immunol 118:316,1977
- 22.-Kabat,E.A.:"Structural concepts in immunology and immunochemistr Halt,New York,1968
- 23.-Mannik,M.;Haakenstad,A.O.& Arend,W.P:The fate and detection of circulating immune complexes.Progress in Immunology II Vol V, eds Brent and Holborow,1974
- 24.-Haakenstad,A.& Mannik,M.:Saturation of the reticuloendothelial system with soluble immune complexes.J Immunol 112:1939,1974
- 25.-Schimidt,D.H.;Kaufman,B.M.& Butler,V.P.:Persistence of hapten-antibody complexes in the circulation of immunized animals after a single intravenous injection of hapten.J Exp Med 139:278,1974
- 26.-Mannik,M.& Arend,W.:Fate of preformed immune complexes in rabbits and Rhus monkeys.J Exp Med 134:19,1971
- 27.-Cochrane,C.G.& Koffler,D.:Immune complex disease in experimental animals and man.Adv Immunol 16:185,1973
- 28.-Nussenzweig,V.:Receptors for immune complexes on lymphocytes. Adv Immunol 19:217,1974
- 29.-Anderson,C.L.& Grey,H.M.:Solubilization and partial characteri- zation of cell membrane Fc receptors.J Immunol 112:819,1977
- 30.-Cunningham-Rundles,C.;Siegal,F.P. & Good,R.A.:Isolation and characterization of human mononuclear cell Fc receptor.Immunoche 15:365,1978
- 31.-Ross,G & Atkinson,J.:Complement receptor structure and function. Immunology Today 6:115,1985
- 32.-Nelson,R.A.:The immune-adherence phenomenon.An immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocytes leadin to enhanced pahgocytosis.Science 118:733,1953
- 33.-Cornacoff,J.B.;Herbert,L.A.;Smead,W.L.;VanAman,M.E.;Birmingham, D.J.& Waxman,F.J.:Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism.J Clin Invest 71:236,1983

- 34.-Henson,P.M.& Spiegelberg,H.L.:Release of serotonin from human platelets induced by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses.J Clin Invest 52:1282,1973.
- 35.-Suba,E.A.& Csako,G.:Clq (Cl) receptor on human platelets:Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by Clq (Cl) molecules.J Immunol 117:304,1976
- 36.-Cazenave,J.P.;Assimeh,S.N.;Painter,R.H.;Packham,M.A.& Mustard,J. Clq inhibition of the interaction of collagen with human platelets J Immunol 116:162,1976
- 37.-Kammer,G.M.& Xhur,P.H.:Binding of circulating immune complexes to human peripheral blood lymphocytes.Effect of complement. Clin Immunol Immunopathol 10:202,1978
- 38.-Basten,A.;Miller,J.F.A.P.;Warner,N.L.;Abrahma,R.;Chia,E.& Gamble J.:A subpopulation of T cells bearing Fc receptors. J Immunol 115:1159,1975
- 39.-Dickler,H.B.& Kunkel,H.G.:Interaction of aggregated -globulin with B lymphocytes.J Exp Med 136:191,1972
- 40.-Theophilopoulos,A.N.;Bokisch,V.A.& Dixon,F.J.:Receptor for soluble C3 and C3b on human lymphoblastoid (Raji) cells.Properties and biological significance.J Exp Med 139:696,1974
- 41.-Theophilopoulos,A.N.;Dixon,F.J.& Bokisch,V.A.:Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells.I Characterization of receptors for IgG Fc and complement and description of the binding mechanism.J Exp Med 140:877,1974
- 42.-Gonzalez-Molina,A.& Spiegelberg,H.L.:Binding of IgE myeloma proteins to human cultured lymphoblastoid cells.J Immunol 117:1838,1976
- 43.-Gonzalez-Molina,A.& Spiegelberg,H.L.:A subpopulation of normal peripheral B lymphocytes that bind IgG.J Clin Invest 59:616,1977
- 44.-Ferrarini,M.;Hoffman,T.;Manfu,S.;Winchester,R.& Kunkel,H.G.: Receptors for IgM on certain human B lymphocytes.
- 45.-Gupta,S.Platsoucas,C.D. & Good,R.:Receptors for IgA on a subpopulation of human B lymphocytes.Poc Natl.Acad.Sci.USA 76:4025,1979
- 46.-Moretta,L.;Miggari,M.C.& Romanzi,C.A.:Loss of Fc receptors for IgG from human T lymphocytes exposed to IgG immune complexes. Nature 272:618,1978
- 47.-Lum,L.G.;Muchmore,A.V.;Keren,D.;Decker,J.D.;Koski,I.;Strober,W & Blaese,R.M.:A receptor for IgA on human T lymphocytes.J Immunol 122:65,1979
- 48.-Moretta,L.;Webb,S.R.;Grossi,C.E.;Lydyard,P.M. & Cooper,M.D.: Functional analysis of two human T-cell subpopulations.Help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG.J Exp Med 146:184,1977

- 49.-Moretta,L.:Human T lymphocyte subpopulations:studies of the mechanism by whiche T cell bearing Fc receptors for IgG supress T dependent B cell differentiation induced by PWM.J Immunol: 122: 984,1979
- 50.-Adv Immunology 11:117,1969
- 51.-Lennan,M.;Howard,A.:evidence for correlation between the antige specificity and charge of human IgG.Immunology 22:1043,1972
- 52.-Henson,P,M.:The adherence of leucocytes and platheles induced by fixed IgG antibody or complement.Immunology 16:107,1969
- 53.-Anwar,A.R.E.& Kay,A.B.:Membrane receptors for IgG and complent (C4,C3b and C3d) on human eosinophils and neutrophils and their relation to eosinophilia.J Immunol 119:976,1977
- 54.-Glovski,M.M.;Hugli,T.E.;Ishizaka,T.;Lichtenstein,L.M.& Erickson B.W.:Anaphylotoxin,-induced histamine release with human leukoc Studies of C3a leukocyte binding and histamine release.J Clin Invest 64:804,1979
- 55.-Messner,R.P.& Jelinek,J.:Receptors for human G globulin on human neutrophils.J Clin Invest 49:2165,1970
- 56.-Mantovani,B.;Rabinovith,M.;Nussenzweig,V.:Phagocytosis of immun complexes by macrophages.Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG). J Exp Med 135:780,1972
- 57.-Ross,G.& Rabellino.E.:Identification of a neutrophil and monocy complement receptor (CR3) that is distinct from lymphocyte CR1 and CR2 and specific for a site contained within C3bi.Fed Proc Fed Amm Soc Exp Biol 38:1467,1979
- 58.-Mantovani,B.;Rabinovithc,M. & Nussenzweig,V.:Phagocytosis of immune complexes by macrophages.Different roles of the macropha receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG)
- 59.-Johnson,P.M.;Trenchev,P.& Faulk,W.P.:Immunological studies of human placentae binding of complexes immunoglobulin by stromal endothelial cells.Clin Exp Immunol 22:133,1973
- 60.-Stingl,G.;Wolff-Schreiner,E.C.;Pichler,W.J.;Gschnait,F.;Knapp,W Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors.Nature 268: 245,1977
- 61.-Gelfand,M.C.;Frank,M.M & Green,I.:A receptor for the third component of complement in the human renal glomerulus.J Exp Med 142:1029,1975
- 62.-Gelfand,J.A.;Fauce,A.S.;Gree,I.& Frank,M.M.:A simple method for the determination of complement receptor-bearing mononuclear cells .J Immunol 116:595,1976

- 63.-Gelfand, M.C.; Frank, M.M.; Green, I. & Shin, M.L.: Binding sites for immune complexes containing IgG in the renal interstitium. Clin Immunol Immunopathol 13:19, 1979
- 64.-Morrison, S.L. & Terres, G.: Enhanced immunologic sensitization of mice by the simultaneous injection of antigen and specific anti-serum. II Effect of varying the antigen-antibody ratio and the amount of immune complex injected. J Immunol 96:901, 1966
- 65.-Theofilopoulos, A.N. & Dixon, F.J.: The biology and detection of immune complexes. Adv Immunol 28:89, 1979
- 66.-Seeger, R.C. & Oppenheim, J.J.: Synergistic interaction of macrophage and lymphocytes in antigen-induced transformation of lymphocytes J Exp Med 132:44, 1970
- 67.-Walker, J.G. & Siskind, G.W.: Studies on the control of antibody synthesis. Effect of antibody affinity upon its ability to suppress antibody formation. Immunology 14:21, 1968
- 68.-Liew, F.Y. & Parish, C.R.: Regulation of the immune response by antibody. I Suppression of antibody formation and concomitant enhancement of cell-mediated immunity by passive antibody. Cell Immunol 4:66, 1972
- 69.-Urh, J.W.; Salvin, S.B. & Pappenheimer, A.M.: II Induction of hypersensitivity in guinea pigs by means of antigen-antibody complexes. J Exp Med 105:11, 1957
- 70.-Hart, D.S.; Lang-Wang, A.; Pawlak, L. & Nisonoff, A.: Suppression of idiotypic specificities in adult mice by administration of anti-idiotypic antibody. J Exp Med 135:1293, 1972
- 71.-Hellstrom, K.E. & Hellstrom, I.: Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. Adv Immunol 18:209, 1974
- 72.-Lustig, H.J. & Bainco, C.: Antibody-mediated cell cytotoxicity in a defined system: regulation by antigen, antibody and complement. J Immunol 116:253, 1976
- 73.-Theofilopoulos, A.N. & Dixon, F.J.: The biology and detection of immune complexes. Adv Immunol 28:89, 1979
- 74.-Creighton, W.D.; Lambert, P.H. & Miescher, P.H.: Detection of antibody and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. J Immunol 111:1219, 1973
- 75.-Zubler, R.H.; Lange, G.; Lambert, P.H. & Miescher, P.S.: Detection of immune complexes in untreated sera by a modified ¹²⁵I-C1q binding test. J Immunol 116:232, 1976
- 76.-Shulman, R.R. & Barker, L.F.: Virus-like antigen and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complement fixation. Science 165:304, 1969

- 77.-Mohammed, I.; Holborow, E. J.; Fry, L.; Thompson, B. R.; Hoffbrand, A. V. & Stewart, J. S.: Multiple immune complexes and hypocomplementaemia in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Lancet* 2:487, 1976
- 78.-Zubler, R. H. & Lambert, P. N.: The ^{125}I -Clq binding test for the detection of soluble immune complexes. "In vitro Methods in cell-mediated and tumor immunity". Edt Barry, R. Bloom and J. David Academic Press 565, 1976
- 79.-Hay, F. C.; Ninehna, L. J. & Roitt, I. M.: Routine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin using solid phase Clq. *Clin Exp Immunol* 24:396, 1976
- 80.-Lachmann, P. J.: Conglutinin and immunocglutinin. *Adv Immunol* 6: 479, 1967
- 81.-Eisenberg, R. A.; Theofilopoulos, A. W. & Dixon, F. J.: Use of bovine conglutinin for the assay of immune complexes. *J Immunol* 118:1428 1977
- 82.-Eisenberg, R.: The specificity and polyvalency of binding a monoclonal rheumatoid factor. *Immunochemistry* 13:355, 1976
- 83.-Gabriel, A.; Agnello, V.: Two new radioimmunoassay for detection of immune complexes. *J Clin Invest* 59:990, 1977
- 84.-Myllyla, G.: Aggregation of human blood platelets by immune complexes in the sedimentation pattern test. *Scand J Hematol (Suppl)* 19:1, 1973
- 85.-Scheinberg, M. A. & Cathcart, E. S.: Antibody-dependent direct cytotoxicity of human lymphocytes. I Studies on peripheral blood lymphocytes and sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 24:317, 1976
- 86.-Morito, T.; Tanimoto, K.; Hashimoto, Y.: Fc-rosette inhibition by hypocomplementaemic systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 35: 415, 1976
- 87.-Theofilopoulos, A. N.; Dixon, F. J.; Bokisch, V. A.: Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. I: Characterization of receptors for IgG Fc of the binding mechanism. *J. Exp Med* 140: 877, 1974
- 88.-Theofilopoulos, A. N.; Wilson, C. B.; Bokisch, V. A.: Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. II Use of Raki cells to detect circulating immune complexes in animal and human sera. *J Exp Med* 140:1234, 1974
- 89.-Gupta, R. C.; McDuffier, F.; Tappeiner, G.: Binding of soluble immune complexes to Raki lymphocytes. Role of receptors for complement components, Clq and C3-C3b. *Immunology* 34:715, 1978
- 90.-Tsuda, F.; Miyakawa, Y. & Mayumi, M.: Application of human erythrocyte to a radioimmune assay of immune complexes serum. *Immunology* 37: 681, 1979

- 91.-Hajos, S.A.; Margni, R.A.; Perdigón, G.; Manghi, M.A. & Olivera, R. Binding of immunoglobulins and immune complexes to erythrocytes of vertebrate. *Immunochemistry* 15:623, 1978
- 92.-Margni, R.A.; Perdigón, G.; Manghi, M.A. & Hajos, S.E.: Detection of immune complexes. *Medicina* 39:183, 1979
- 93.-Mackenzies, M.R.; Warner, N.L. & Mitchell, G.F.: The binding of murine immunoglobulins to Staphylococcal protein A. *J Immunol* 120:1493, 1978
- 94.-Chenais, F.; Virella, G.; Patrick, C.C.: Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using Staphylococcal protein A-Sepharose as substrate. *J Immunol Methods* 18:183, 1977
- 95.-Mc Douglal, J.S.; Redcha, P.B.; Inman, R.D. & Christian, C.L.: Binding of immunoglobulin G aggregates and immune complexes in human sera to Staphylococci containing protein A. *J Clin Invest* 63:627, 1979
- 96.-Lambert, P.H.; Dixon, F.J.; Zubler, R.H.; Agnello, V.; Cambiaso, C.; Casali, P.; Clarke, J.; Cowdery, J.S.; McDuffie, R.C.; Hay, F.C. MacLennan I.C.M.; Masson, P.; Muller-Eberhard, H.J.; Penttinen, K.; Smith, M.; Tappeiner, G.; Theofilopoulos, A.N. & Verroust, P.: A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods of detecting immune complexes in serum. *J Clin Lab Immunol* 1:1, 1978
- 97.-Harbek, R.J.; Bardana, E.J.; Kohler, P.F. & Carr, R.I.: DNA-anti DNA complexes: their detection in systemic lupus erythematosus sera. *J Clin Invest* 52:789, 1973
- 98.-Koffler, D.; Shur, P.H. & Kunkel, H.G.: Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 126:607, 1967
- 99.-Miller, G.W. & Nussenzweig, V.: A new complement function: solubilization of antigen-antibody aggregates. *Proc Nat Acad Sci USA* 72:418, 1975
- 100.-Czop, J.; Nussenzweig, V.: Studies on the mechanism of solubilization of immune precipitates by serum. *J Exp Med* 143:615, 1976
- 101.-Aguado, M.T.; Perrin, L.H.; Miescher, P.A. & Lambert, P.H.: Decrease in capacity to solubilize immune complexes in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 24:1225, 1981
- 102.-Caligaris-Cappio, F.; Camussi, G. & Gavosto, F.: Idiopathic neutropenia with normocellular bone marrow: an immune complex disease. *Brit J Haematology* 43:595, 1979
- 103.-Clay, M.E. & Kline, W.E.: Neutrophil antibodies: detection and clinical application. *Focus* 47:805, 1981

- 104.-Wintrobe Maxwll: Clinical Hematology (8th edition) 1981
- 105.-Boxer, L.Á.: Autoimmune neutropenia. N Engl J Med 293:784, 1975
- 106.-Harmon, D.C.: The severity of immune neutropenia correlate with the maturational specificity of anti-neutrophil antibody. Brit J Haemat 58:209, 1984
- 107.-Hougie, C.: Trastornos de la hemostasia: alteraciones congénitas de los factores de coagulación sanguínea. Hematología Williams, W. Beutler, E.; Erslev, A. J. Rundles, R. W. (Ed Salvat) 1491, 1983
- 108.-Fauci, A.; Macher, A. M.; Longo, D. L.; Lane, H. C.; Rook, A. M.; Masur, H. & Gelmann, E. P.: NIH Conference. Acquired immunodeficiency syndrome epidemiologic clinical, immunologic and therapeutic consideration. Ann Int Med 100:92, 1982
- 109.-Mathur-Wagh & Milduan, D.: Prodromal syndromes in AIDS. Ann N Y Acad SCI Vol 437:184, 1984
- 110.-Montagnier, L.; Brunet, J. B. & Klatzmann, D.: Le SIDA et son virus. La Recherche 16:750, 1985
- 111.-Scaglione, C.; Cahn, P.; Muchnik, G.; Pérez, H.; Cordero, A.; Prados, A. Besuschio, s.; de Bracco, M. M.; Estevez, M. E.: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA): experiencia en la Argentina. Medicina (Bs As) 45:312, 1985
- 112.-Gottlieb, M. S.; Schoroff, R.; Shanker, H. M.; Weisman, D. D.; Fan, P. T.: Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence for a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 305:1425, 1981
- 113.-Kornfeld, A.; Vande Stowe, R. A.; Lange, M.; Reddy, M. M. & Grieco, M. H.: T lymphocyte subpopulations in homosexual men. N. Engl J Med 307:729, 1982
- 114.-Kent, J. K. & Fife, E. H.: Precise standardization of reagents for complement fixation. Am J Trop Med Hyg 12:103, 1963
- 115.-Aguado, M. T.; Perrin, L. H.; Ramirez, R.; Miescher, P. A. & Lambert, P. H. Evaluation of alternative pathway and factor B haemolytic activities in patients with systemic lupus erythematosus correlations with the alternative pathway regulatory proteins
- 116.-Sakurai, T.; Fujita, T.; Kono, I.; Kabashima, T.; Yamane, K.; Tamura, H. & Kashiwagi, H.: Complement-mediated solubilization of immune complexes in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 48: 37, 1982
- 117.-Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 21 (Suppl 97):77, 1968
- 118.-Sasiain, M. C.; Ruibal Ares, B.; Baliña, L. M.; Valder, R.; Bachmann, A. E.: Con A induced suppressor cells in lepromatous leprosy patients during and after erythema nodosum episode. Int J Leprosy 51:321, 1983

- 119.-Koffler,D.;Agnello,V.;Winchester,R.;Kunkel,H.G.:The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases.J Clin Invest 52:198, 1973
- 120.-Lane,C.H. & Fauce,A.S.:Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome.Ann Rev Immunol (Ed Paul Fathman Metzger) 3:477,1985
- 121.-Pool,J.;Hershgl,J.& Pappenhagen,A.R.:High potency anti-hemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin in precipitate Nature (London) 203:312,1964
- 122.-Puskás,E.;Fust,G.;Angyal,I.;Chiphi,N.& Gergely,J.:Serial measurement of circulating immune complexes in healthy subjects. Immunology Letters 4:223,1982
- 123.-Nydegger,U.:A place for soluble immune complexes in clinical immunology:Immunology Today 6:80,1985
- 124.-Chia,D.;Barnett,E.V.;Yamagata,J.;Knutson,E.;Restivo,C.& Furst,D. Quantitation and characterization of soluble immune complexes precipitated from sera by polyethylene glycol (PEG).Clin Exp Immunol 37:399,1979
- 125.-Normansell,D.E.& Stanworth,D.R.:Ultracentrifugal studies of the reactions of rheumatoid factor with native human C1-globulin. Immunology 10:527,1966
- 126.-Kyoichi,Kano:Immune complex disease.Immunology Today 7:96,1986
- 127.-Fearon,D.T.;Daha,M.R.;Strom,T.B.;Weiler,J.M.;Carpenter,C.B.& Austen,K.F.:Pathways of complement activation in membranoproliferative glomerulonephritis and allograft rejection.Transplant Proc 9:729,1977
- 128.-Schifferli,J.A.;Morris,S.M.;Dash,A.& Peter,D.K.:Complement mediate solubilization in patients with systemic lupus erythematosus,nephritis or vasculitis.Clin Exp Immunol 46:685,1981
- 129.-Takahashi,M.;Czop,I.; Ferreira,A.& Nussenzweig,V.:Mechanism of solubilization of immune aggregates by complement.Implications for immunopathology.Transplant Rev 32:121,1976
- 130.-Isturiz,M.A.,Fink,S.B. and De Bracco,M.M.de E.:Reversal of immune complex inhibition of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by normal human serum.Clin Exp Immunol 48:685,1982
- 131.-Camussi,G.;Tetta,C.& Caligaris-Cappio,F.:The detection of immune-complexes on the surface of polymorphonuclear neutrophils Immunology 58:135,1979
- 132.-Cines,D.B.;Passero,F.;Dupont Guerry,I.V.;Bina,M.;Dusak,B.; Schreiber,A.D.:Granulocyte-associated IgG in neutropenic disorders.Blood 59:124,1982

- 133.-Engelfried,C.P.& Van Loghem,J.J.:Studies on leukocyte iso and auto-antibodies.Erit J Haematol 7:223,1961
- 134.-Fleit,H.B.;Wright,S.D.;Durie,J.E.;Valinsky,J.E.& Unkeless,J.C.:Ontogeny of Fc receptors and complement receptor (CR3) during human myeloid differentiation. J Clin Invest 73:516,1984
- 135.-Kurlander,R.J.& Btker,J.:The binding of human immunoglobulin G1 monomer and small,covalently crosslinked polymers of immunoglobulin G1 to human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes.J Clin Invest 69:1,1982
- 136.-Gallin,J.I.:Human neutrophil heterogeneity exists,but is it meanigful? Blood 63:977,1984
- 137.-Mondini,N.G.;Pavlovsky,A.;Zirulnik,J.;Fejes,M.;Tettamanzi,A.;Segal-Eiras,A.:Complejos inmunes circulantes en pacientes con neutropenia idiopática crónica.Sangre 27:53,1982
- 138.-Segal-Eiras,A.;Fejes,M.;Bachmann,A.E.;Mondini,N.G.; Pavlovsky,A.A. & Zirulnik,J.:Plasmaféresis en neutropenia idiopática crónica con inmunocomplejos.Medicina 41(Suppl) 141,1981
- 139.-Gascon,P.;Zoumbos,N.C.& Young,N.S.:Immunologic abnormalities in patients receiving multiple blood transfusion. Ann Inter Med 100:173,1984
- 140.-Anselmo,A.;Muchnik,G.;Pérez Bianco,R.;de la Barreira,S.; Riera,N.E.;de Bracco M.M. & Tezanos Pinto,M.:Anticuerpos anti-HTLV-III /LAV,síntomas clínicos y determinaciones inmunológicas en pacientes con hemofilia en Buenos Aires. Medicina 45:312,1985
- 141.- Smith J.et al:Factor VIII concentrate as a source of fibronectin for replacement therapy (letter). J Clin Pathol 37:1196,1984
- 142.-Hilgartner,M.W.;Inman,R.D.& Miller,C.H.:Increased circulating immune complex leves in hemophilia patients post-infusion. Tromb Haemostasis 46:189,1981

- 143.-Fukuda, K.;Seino,J.;Kinoshita,Y.;Sudo,K.;Horigome,I.; Saito,T.;Furuyama,T.& Yoshinaga,K.:Circulating immune complex-like material which bind to heat inactivated Clq interfere with the Clq solid phase assay for immune complexes.Tohoku J Exp Med 146:449,1985
- 144.-Jin,Z.;Cleveland,R.P.& Kaufman,D.B.:Abnormalities of in vitro immunoglobulin production by B lymphocytes in patients with hemophilia A.6th International Congress of Immunology.Abstract 453,1986
- 145.-Cunningham-Rundles,A.;Michelis,M.A.& Masur,H.:Serum suppression of lymphocyte activation in vitro in acquired immunodeficiency disease.J Clin Immunol 3:156,1983
- 146.-Blanche,S.;Couderc,L.J.;Matheron S.& Preud'Homme,J.L.: IgG subclass levels in the acquired immunodeficiency syndrome and lymphadenopathy syndrome.6th International Congress of Immunology.Abstract 450,1986
- 147.-Lightfoote,M.M.;Folks,T.M.;Sell,K.W.:Analysis of immune complex components isolated from serum of AIDS patients. Fed Proc 43:1921,1984
- 148.-Meuth,J.L.;Morgan,E.L.;Discipio,R.G.& Hugli,T.E.:Suppression of T lymphocyte functions by human C3 fragments.1.-Inhibition of human T cell proliferate responses by a kallikrein cleavage fragment of human iC3b.J Immunol 130:2605,1983
- 149.-Eparza,I.R.;Green,R.& Shreiber,R.D.:inhibition of macrophage tumoricidal activity by immune complexes and antered erythrocytes.J Immunol 131:2117,1983
- 150.-Hellstrom,K.E.& Hellstrom,I.:Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens.Adv Immunol 18:209,1974
- 151.-Goldyne,M.E.& Stobo,J.D.:Immunoregulatory role of prostaglandi and related lipids.Critical Reviews in Immunology 2:189,1981
- 152.-Rouzer,C.A.;Scott,W.A.;Hamill,A.L.;Liv,F.T.;Katz,D.H.& Cohn,Z.A.:Secretion of leukotriene C and others arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobul E immune complexes.J Exp Med 156:1077,1982

- 153.-Malmsten,C.L.:Leukotrienes:Mediators of inflammation and immediate hypersensitivity reactions.Critical Reviews in Immunology 4:307 ,1984
- 154.-Caulfield,M.J.;Luce,K.J.;Proffih,M.R.& Cerny,J.:Induction of idiotype specific suppressor T cell with antigen/antibody complexes .J Exp Med 157:1713,1983
- 155.-Lotze,M.:Tratamiento de las alteraciones inmunológicas SIDA."El SIDA" -edt SALVAT 233,1986
- 156.-Ledermann,M.M.;Ratnoff,O.D.;Scillian,J.J.;Jones,P.K. & Shacter,B.:Impaired cell mediated immunity in patients with hemophilia.N Eng J Med 308:79,1983
- 157.-de Shazo,R.D.;Andes,W.A.;Nordberg,J.;Newton,J.B.S.;Daul,C.&Brozelca,B. :An immunologic evaluation of hemophilic patients and their wives.Ann Int Med 99:159,1983
- 158.-Goldsmith,J.C.;Moseley,P.L.;Monick,M.;Brady,M.;Hunninghale,W.:T-lymphocyte subpopulation abnormalities in apparently healthy patients with hemophilia.Ann Int Med 98:194,1983
- 159.-Dublong,J.H.;Forre,O.;Chattapadlyay,C.& Natvig,J.B.:Concanavalin A induces suppressor cell activity in both T and non T cells:most of the suppressor cells do not carry HLA-DR antigens.Scand J Immunol 15:87,1982.-
- 160.- Digeon,M.;Laver,M.;Riza,J. Bach,J.F.:Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assay with polyethylene glycol. J Immunol Methods 16:165,1977