

27 FEB 2008

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESPECIALIZACIÓN EN INMUNOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

*“Evaluación Inmunológica de Líquidos Cefalorraquídeos de Pacientes con
Esclerosis Múltiple, en Búsqueda de Nuevas Herramientas
Diagnósticas. ICGES 2005-2006”*

Estudiante: *Lcda. Griselda B. Arteaga. TM*

Cédula: *N-19-1191*

Asesor: *Dr. Juan Miguel Pascale. MD. MSc. PhD*

*Tesis de Maestría para ser sometido a
consideración por la Vicerrectoria de
Investigación y postgrado, para optar
por el título de Magíster en Ciencias
Biomédicas con Especialización en
Inmunología*

*Panamá, República de Panamá
Noviembre, 2007*

Dedicado a las memorias de:

El Gran Maestro de Tecnólogos Médicos:

Profesor Basilio Gómez

Y

Mi querida Abuela:

Lucia González de Arteaga.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	
ESCLEROSIS MULTIPLE	11
1. Antecedentes Históricos	12
2. Generalidades	13
3. Inmunopatología de la Esclerosis Múltiple	14
4. Curso Clínico de la Esclerosis Múltiple	23
4.1 Actividad Clínica	26
4.1.1 Recaída	24
4.1.2 Progresión	
4.1.3 Actividad y Progresión en la Enfermedad subclínica	26
5. Diagnóstico de la Esclerosis Múltiple	26
5.1 Resonancia Magnética	27
5.2 Potenciales de Evocado	
5.3 Estudio del LCR	28
5.3.1 Bandas Oligoclonales	31
5.3.2 Cadenas Ligeras kappa y lambda	33
IV. METODOLOGÍA	38
1. Aspectos Metodológicos	39
2. Evaluación de la Barrera Hematoencefálica y la Síntesis Intratecal de Inmunoglobulinas	40
3. Medición de Citoquinas	43
3.1 Principio del ELISA	
3.2 Procedimiento del ELISA	44
3.2.1 Preparación de Reactivos	
3.2.2 Procedimiento	45
3.2.3 Cálculo de Resultados	46
4. Detección Nefelométrica	47
3.1 Principio de Nefelometría	
3.2 Procedimiento	
3.3 Reporte de Resultados	

V. RESULTADOS	48
1. Resultados	49
VI. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	59
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
VIII. BIBLIOGRAFIA	72
1. Citas Bibliográficas	73
2. Bibliografía Consultada	76
IX. ANEXOS	77
1. Tamaño de la muestra para el estudio según Nivel de confianza	78
2. Ilustraciones técnicas	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Formación de Múltiples Cicatricen en la Vaina de Mielina	14
2. Mecanismos de Inflamación y Respuesta Inmune en la Esclerosis Múltiple.	17
3. Estructura del Receptor Soluble de Interleucina-2	21
4. Tipo de Esclerosis Múltiple y Grado de Discapacidad	25
4. Corrida de Bandas Oligoclonales por Isoelectroenfoque de LCR y suero	33
5. Recombinación y Expresión de los genes de las Cadenas Pesadas y Ligeras de las Inmunoglobulinas	36
7. Inducción de Enema causado por las Cadenas Ligeras kappa libre tras la degranulación de los mastocitos	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Concentración de IL-10 en pg/ml en LCR según Grupo de Pacientes.	51
2. Concentración de sIL-2R en pg/ml en LCR según Grupo de Pacientes.	51
3. Características Generales de las muestras participantes	54
4. Concentración de CLk libre en g/l obtenidas por nefelometría según grupo	54
5. Características de los Pacientes por Grupo	54
6. Valor Diagnóstico de CLk libre en comparación con BO por IEE	57

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico	Páginas
1. Concentración de sIL-2R en pg/ml del LCR por Grupo	52
2. Porcentaje de LCR con valores positivos para el sIL-2R	53
3. Bloxpot de Concentraciones de CLk libre en LCR por Grupo	55
4. Características del Espacio Intratecal según Grupo	55
5. Concentración de CLk libre en LCR Versus el Índice de Albúmina	56
6. Correlación entre los valores de CLk total y CLk libre en LCR Según Grupo	58
7. Correlación entre los cocientes de Inmunoglobulina G y CLk total	58

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Imagen	Páginas
1. Principio del Nefelómetro	80
2. Vista Frontal del Nefelómetro Image/Beckman-Coulter	80
3. Pantalla de Programa de Muestras	81
4. Reactivos de Inmunoglobulinas y Albúmina	81
5. Carrusel de Muestras	82
6. Vista frontal de Hitachi 911-Roche	83
7. Reactivos para medir CLk libre de binding-site	83
8. Principio de la técnica de ELISA	84
9. Kits de ELISA utilizados para medir citocinas	84
10. Lavador de placas de ELISA	85
11. Placa de ELISA con los resultados del sIL-2R listo para ser leídas en el espectrofotómetro	85

ABREVIATURAS UTILIZADAS

BHE:	Barrera Hematoencéfalica
BO:	Bandas Oligoclonales
CLk:	Cadenas Ligeras kappa
EAE:	Enfermedad Alérgica Experimental
ELISA:	Enzyme Linked Immuno Sorvent Assay
EM:	Esclerosis Múltiple
LCR:	Líquido Cefalorraquídeo
ICGES:	Instituto Conmemorativo Gorgas Para Estudios de la Salud
IEE:	Isoelectroenfoque
IgG:	Inmunoglobulina G
IL-10:	Interleuquina 10
INFγ:	Interferón gama
PMB:	Proteína Mielínica Básica
sIL-2R:	Receptor soluble de Interleuquina 2
SNC:	Sistema Nervioso Central
TNFα:	Factor de Necrosis Tumoral alfa

RESUMEN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria, caracterizada por la desmielinización de la sustancia blanca. Su diagnóstico está basado en parámetros clínicos y paraclínicos. No existe una prueba diagnóstica definitiva para esta enfermedad. En este estudio, cuantificamos por nefelometría la forma libre de las cadenas ligeras kappa (CLklibre) de las inmunoglobulinas y medimos la concentración de varias citocinas en el LCR por el método de ELISA. De esta manera evaluamos la inmunidad humoral y celular intratecal de los pacientes del estudio, con el fin de encontrar nuevas herramientas que contribuyan al diagnóstico de esta enfermedad. Se analizaron 63 muestras pares de LCR y sueros a los cuales se les determinó los cocientes de albúmina y el índice de Link, parámetros que brindan información sobre el estado de la barrera hematoencefálica (BHE) y la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Luego de conocer el estado intratecal en estos pacientes, se midió la concentración de CLk libre en el LCR. Además, trabajamos con 68 LCRs a los cuales se evaluaron las concentraciones de IL-10, TNF α y INF γ y sIL-2R. Los resultados obtenidos al evaluar la presencia de CLk libre de las inmunoglobulinas, fueron comparados con el método de referencia (Bandas Oligoclonales/Isoelectroenfoque), encontrando que la técnica de CLk libres de las inmunoglobulinas por nefelometría presenta una sensibilidad del 94% y una especificidad de 83%. Los resultados obtenidos en cuanto el estado intratecal de nuestras muestras tenemos que: en el grupo I (pacientes que no padecen EM por los métodos de laboratorio) el 24% presenta daño de la BHE y síntesis intratecal, y el 20% presentan valores detectables de CLk libre. Mientras que para el grupo II (paciente con síntesis intratecal de Ig detectada por BO, con posible EM) presentan un 67% de síntesis intratecal y un 92% presencia de CLklibre, El estado de la BHE varía dependiendo que patrón de BO presente. En cuanto a las citocinas medidas, a excepción del sIL-2R, no mostraron valores detectables por esta metodología. En base a nuestros resultados, concluimos que, la técnica de nefelometría para detectar las CLk libres de las inmunoglobulinas es una metodología sensible, rápida y de bajo costo que puede contribuir con el diagnóstico de la EM, y que nos ofrece una evaluación de la respuesta inmune humoral, mientras que el sIL-2R contribuye a evaluar el estado inmune celular del espacio intratecal de estos pacientes.

Palabras clave: *Esclerosis Múltiple, Cadenas ligeras kappa libre de los anticuerpos, Índice de Link, Cociente de Albúmina, Receptor Soluble de IL-2.*

SUMMARY

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory disease, characterized by demyelination of the white matter. The MS diagnosis is based on clinical and paraclinical parameters. There is not any definitive diagnostic test for this disorder. In our study, we quantified the kappa free light chain (kFLC) of the immunoglobulins and determined the intrathecal concentration of several cytokines using capture ELISA. In this way, we evaluated the humoral and cellular immunity of the intrathecal space, with the objective to find new tools for the laboratory diagnosis of MS. We analyzed 63 paired CSF (Cerebral Spinal Fluid) and serum samples and calculated the albumin quotient and the Link index. These parameters give information about BBB (Brain Blood Barrier) status and Intrathecal synthesis of immunoglobulins. After we knew the intrathecal status of the patients, we measured the kFLC levels in CFS. In addition, we analyzed 68 CFS samples in order to evaluate levels of IL-10, TNF α , INF γ , and the sIL-2R. The results obtain of kFLC were compared with the gold standard method (Oligoclonal Band by Isoelectrofocusing), and we found that nephelometry has a sensitivity of 94% and a specificity of 83%. Concerning the intrathecal status, in group I (no qualified as MS by laboratories data), the 24% of the samples had BBB injuries and intrathecal immunoglobulin synthesis, and 20% had detectable values of kFLC. While for group II (patients with intrathecal synthesis by Oligoclonal Bands), 67% had intrathecal immunoglobulin synthesis and 92% presented detectable levels of kFLC. With respect to the cytokines, only sIL-2R showed detectable values by this methodology. Based on our results, we concluded that nephelometry is a sensitive, fast, and low cost methodology to determine kFLC in spinal fluid, and that can efficiently contribute with the laboratory diagnosis of MS. It is tempting to propose that kFLC contributes to the evaluation of the humoral immune response, while the sIL-2R is useful to evaluate the cellular immune state in the intrathecal space of MS patients.

Words keys: Multiple Sclerosis, kappa free light chain of the immunoglobulins, Link Index, Albumin quotient, Soluble Receptor of IL-2

I. INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria autoinmune discapacitante que afecta el Sistema Nervioso Central (SNC) y cuya etiología se desconoce. Un estimado de más de 350 000 personas en los Estados Unidos poseen EM con 10 000 casos nuevos cada año (1). En Panamá para el 2005, la prevalencia fue de 5.3 por 100 000 habitantes, con 19 casos nuevos para el 2006. (2)

La entidad clínica de la Esclerosis Múltiple tiene más de un siglo de haber sido descrita, sin embargo, no se comprende claramente el mecanismo a través del cual la respuesta inmune se activa y cómo se generan y mantienen circulando los clones de linfocitos auto reactivos. Tanto anticuerpos como células inmunes atacan a la mielina, el tejido adiposo que rodea y protege la fibra nerviosa del cerebro, los nervios ópticos y la médula espinal. La inflamación y la pérdida de mielina provocan la interrupción de la transmisión nerviosa y de esta forma se ven afectadas importantes funciones motoras y sensoriales. (3)

Recientemente, se han obtenido datos prometedores, especialmente al estudiar moléculas de adhesión, proteasas, citocinas y sus receptores. La mayoría de ellas han podido correlacionarse positivamente con la actividad de la enfermedad y el daño de la Barrera Hematoencefálica (BHE). Las citocinas, quimiocinas y proteasas son liberadas por células activadas, mientras que las moléculas de adhesión y los receptores de citocinas se separan de la superficie celular. Estas moléculas circulan en los líquidos corporales y pueden ser detectadas en la sangre y LCR.

Las citocinas son importantes mediadores durante la respuesta inmune. La interleucina-1 (IL-1), Factor de Necrosis Tumoral α/β , (TNF α /TNF β) e Interferón Gamma (INF γ) son citocinas pro- inflamatorias. El INF γ , es liberado frente a una respuesta inmune mediada por Th1 mientras que las interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6) e interleucina -10 (IL-10) son citocinas anti-inflamatorias que responden al tipo de respuesta inmune Th2. Se cree que el recobro del paciente es mediado por las células Th2 que secretan citocinas anti-inflamatorias que pueden desactivar a los macrófagos. (1)

El equilibrio de las distintas citocinas y la determinación de sus concentraciones orientan en gran medida el sentido de la reacción inmune. Por su parte, el receptor soluble de IL-2, aparece tras la activación de células T. La estimulación crónica de las células T provoca la liberación de este receptor, por tanto, la determinación de un aumento en las concentraciones séricas son consideradas como marcador de una estimulación antigénica potente.

En cuanto al diagnóstico de la EM es complejo y se basa en aspectos clínicos, imagenológicos, electrofisiológicos y de laboratorio. El diagnóstico de laboratorio consiste en la detección de bandas oligoclonales (BO) en LCR, pero estas bandas no son exclusivas de la EM, ya que pueden encontrarse en otras enfermedades neurológicas como enfermedad cerebrovascular, vasculitis, Síndrome de Gilliam-Barré e infecciones con el Virus de Inmunodeficiencia Humana. (4)

Existen diversos criterios diagnósticos para la EM, entre ellos el Criterio de Mc Donald que indica que se debe asociar la presencia de bandas oligoclonales de tipo IgG y/o un índice elevado de IgG con la diseminación espacial de donde haya dos o más lesiones consistentes con EM.

Se han estudiado la presencia de muchos metabolitos en el LCR de estos pacientes con el fin de nutrir las herramientas diagnósticas que se poseen, entre estos la medición de las cadenas ligeras libres de las inmunoglobulinas. Desde hace más de treinta años se vienen realizando diversos estudios dirigidos a evaluar la presencia y el índice de las cadenas ligeras libres, de los cuales se han obtenido resultados congruentes que asocian la presencia de las mismas a la confirmación de la EM. El problema ha sido las metodologías utilizadas para medirlas, las cuales no eran de fácil implementación en los laboratorios clínicos de rutina. Quizás como expresan Jenkins et al. 2001, esta utilidad de las cadenas ligeras kappa y lambda no ha sido explotada, ya que los nuevos conocimientos sólo han sido publicados en revistas de neurología, escasamente leídas por los bioquímicos clínicos.

Siendo la EM una enfermedad que carece tanto de recursos de laboratorio que orienten al clínico acerca del estado inmunológico del paciente antes y durante el tratamiento, y de pruebas diagnósticas confirmatorias de esta patología nos plantearemos los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Correlacionar la concentración en LCR de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias en pacientes con Esclerosis Múltiple.
- Determinar las concentraciones de cadenas ligeras libres kappa en LCR de pacientes con Esclerosis Múltiple.

Específicos:

- Determinar las concentraciones de TNF- γ , INF- α , IL-10 y del receptor soluble de IL-2 por la técnica de ELISA en LCR de pacientes con Esclerosis Múltiple.
- Cuantificar por la técnica de nefelometría las cadenas kappa total y libre en LCR y suero.
- Establecer un valor índice para calcular el valor de las cadenas ligeras libres en LCR a partir del valor de cadenas ligeras totales.
- Evaluar el estado de la BHE a través del cálculo del Cociente de Albúmina en LCR.
- Evaluar la presencia de síntesis intratecal a través del Cociente de Inmunoglobulina G o Índice de Link

HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN:

El mecanismo inmune causante del daño presente en el SNC de pacientes con EM puede ser evaluado a través de las mediciones en LCR de las concentraciones de citocinas pro y antiinflamatorias, y de las concentraciones de inmunoglobulinas y sus cadenas ligeras tipo kappa. Dichas concentraciones nos sirven de herramientas diagnósticas de laboratorio para esta enfermedad.

HIPOTESIS NULA:

Los LCR de pacientes con EM no presentan alteraciones de las citocinas y receptores escogidos en este estudio, ni valores alterados de las cadenas ligeras kappa libres y totales de las inmunoglobulinas, por lo tanto ninguno de estos metabolitos pueden asociarse al estado de la enfermedad, ni poseen utilidad diagnóstica alguna.

HIPOTESIS ALTERNATIVA:

Los LCR de pacientes con EM presentan alteraciones de las citocinas y receptores escogidos en este estudio, y valores alterados de las cadenas ligeras kappa libres y totales de las inmunoglobulinas, por lo tanto estos metabolitos poseen utilidad diagnóstica y pronóstica.

JUSTIFICACIÓN:

La Esclerosis múltiple, aunque muy estudiada, carece de herramientas diagnósticas simples en los laboratorios clínicos de rutina. El diagnóstico de laboratorio actual, esta basado prácticamente en la detección de bandas oligoclonales, el cual es un método con un apreciable grado de sensibilidad, pero con un alto grado de complejidad para ser realizado en laboratorios de diagnóstico donde generalmente se trabajan grandes cantidades de muestra con un número de personal reducido. Además, es necesario encontrar pruebas de monitoreo que brinden información sobre el estado clínico de la enfermedad en determinado momento, lo que contribuirá a la evaluación del tratamiento, ya que para esto el clínico solo posee recursos imagenológicos y semiológicos.

Por estas razones hemos decidido estudiar tres de las citocinas, y un receptor de citocinas, considerados de los más importantes determinantes del estado de la enfermedad en la EM, por un método sencillo en el cual se pueda analizar un apreciable número de muestras en un corto tiempo a un costo razonable como es la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

A través de la revisión bibliográfica nos hemos podido percatar que se viene haciendo énfasis por más de treinta años de la presencia de cadenas ligeras de los anticuerpos kappa y lambda en los LCR de pacientes con EM, y que los resultados son congruentes con las BO sin embargo no se han aplicado al diagnóstico clínico por el laboratorio ya que presentaban el mismo grado de dificultad que las BO. En este estudio se tiene como objetivo probar el método de Nefelometría para la medición de

estas cadenas, ya que en la actualidad existen en el mercado reactivos para medir estas cadenas ligeras por nefelometría con aparatos automatizados presentes en los principales hospitales, que arrojan resultados en pocos minutos, lo que mejoraría el tiempo de respuesta de parte del laboratorio, contribuyendo a un diagnóstico más rápido y el inicio de tratamiento en un tiempo más corto, lo que beneficiaría al bienestar del paciente y a la economía del estado.

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA
ESCLEROSIS MÚLTIPLE

1. ANTECEDENTES HISTORICOS:

La Esclerosis Múltiple (EM) no es una enfermedad nueva. Sus efectos sobre el cerebro fueron descritos desde 1830, y fue identificada como una entidad clínica alrededor de 1860. Incluso, escritos de la edad Media describen individuos con esta condición. La EM es el desorden neurológico más común en adultos jóvenes; existen aproximadamente 350,000 personas con EM en los Estados Unidos y un estimado de 2 millones de pacientes en todo el mundo. (5) En Panamá, desde el inicio del Estudio Colaborativo de Esclerosis Múltiple en Panamá y Centroamérica en el año 2000 se ha observado el aumento de casos nuevos diagnosticados por año, teniendo una incidencia de 5.3 casos por cada 100 000 habitantes, y 19 casos nuevos por año (2)

En las últimas décadas las investigaciones sobre este desorden han sido enérgicas en países como los Estados Unidos. En 1996, el U.S. National Institutes of Health gasto casi 83 millones de dólares en investigaciones sobre EM, lo que excede a la suma utilizada este mismo año para asma, tuberculosis y cáncer cervical. (5)

Como resultado se han realizado importantes progresos en la definición de los cambios patológicos de la EM, usando nuevas técnicas para la evaluación, y desarrollando nuevos tratamientos que pueden modificar el curso de la enfermedad. Aún así son muchas las dudas que quedan por resolver, por ejemplo: ¿Por qué la EM aparece en unas personas y no en otras? ¿Que papel juegan los genes? ¿Qué incita la respuesta autoinmune? ¿Por qué es dos veces más frecuente en mujeres que en

hombres? Nosotros nos enfocaremos a investigar técnicas de laboratorio que nos ayuden a entender el estado inmune del individuo en los diferentes estados de la enfermedad, que puedan contribuir en un futuro no solo al diagnóstico por el laboratorio, sino también al monitoreo del tratamiento.

2. GENERALIDADES:

Esclerosis Múltiple (EM) que literariamente significa “muchas cicatrices”, refiriéndose a las lesiones que se acumulan en el cerebro y la médula espinal que se presentan en el curso de esta enfermedad (ver fig.1). Estas cicatrices o lesiones, son el resultado de la muerte de células nerviosas, cuyos axones han sido desprovistos de la vaina de mielina que normalmente los protegen y permiten la conducción del impulso nervioso.

La EM es una enfermedad crónica y degenerativa, usualmente comienza en la adultez temprana y se hace visible al afectar el control muscular y al afectar varias funciones cerebrales. Muchas personas vivirán con EM por décadas después de ser diagnosticadas, pero reduce la expectativa de vida de 10 a 15 años, y cerca de la mitad de los pacientes sobreviven 30 años o más después de presentar los primeros síntomas. (5)

La EM es la causa más frecuente de incapacidad neurológica relacionada con enfermedad en los países occidentales. Los síntomas pueden ser leves, como adormecimiento en las extremidades, o graves como parálisis o pérdida de la visión. La edad del diagnóstico oscila entre los 20-40 años de edad. Las personas que sufren de esta enfermedad producen células T autorreactivas que participan en la formación

respuesta inflamatoria que destruiría la mielina, dando lugar a la sintomatología clínica de la enfermedad. (7)

Es ampliamente conocido que el mimetismo molecular se señala como un mecanismo que culmina en autoinmunidad, el reconocimiento de los péptidos encefalitógenos de la Proteína Mielínica Básica (PMB), uno de los principales componentes de la vaina de mielina, permite valorar la magnitud con la que proteínas de otros organismos los imitan. Por ejemplo un péptido de esta proteína mielínica (residuos de aminoácidos del 61-69) es altamente homólogo de un péptido de la proteína P3 del virus del sarampión. Estudios han comparado la secuencia del péptido de la PMB de la secuencia 66-75 con proteínas virales, encontrándose homologías de las secuencias de virus animales como el virus de influenza, polioma, adenovirus, Sarcoma de Rous, leucemia de Abelson, poliomielitis, virus de Epstein-Barr y de la hepatitis B.

Se ha sometido a prueba esta hipótesis, tomando un péptido de la enzima polimerasa del virus de la hepatitis B, el cual muestra una homología del 60% con una secuencia del péptido encefalitógeno de la PMB. Se inmunizaron conejos con este péptido, y se demostró que el mismo producía tanto formación de anticuerpos como proliferación de células T que reaccionaban de manera cruzada con la PMB, así mismo el SNC de los conejos inmunizados mostró la infiltración de células características de la Enfermedad Alérgica Experimental, el mejor modelo animal que explica la EM.

La susceptibilidad a este tipo de autoinmunidad también puede estar influida por el haplotipo MHC (Molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad) del individuo, ya que cierto tipo de moléculas de MHC clase I o II pueden ser más eficaces que otras en la presentación del péptido homólogo para la activación de las células T. (6)

En una infección la presentación de estos péptidos virales o bacterianos por las células presentadoras de antígenos profesionales activan las células T autoreactivas. En este estado las células T pueden atravesar la Barrera Hematoencefálica (BHE), y dentro del SNC iniciar la respuesta inflamatoria, que finalmente concluye con la destrucción de la mielina. (1)

El reclutamiento de leucocitos dentro del SNC amplifica la respuesta inmune local mediante la activación de células gliales (principales astrocitos y células de la microglía) que participan activamente del proceso inflamatorio en curso. La microglía activada es la población fundamental de fagocitos en el estadio inicial de la desmielinización, y se encuentran citocinas primarias en los astrocitos situados a los bordes de las placas de EM. Cuando se amplifica la respuesta local inflamatoria, se produce la inmunidad específica generadora de células T contra los componentes de la mielina en el SNC de los pacientes con EM. Las citocinas primarias inflamatorias pueden por si mismas inducir la destrucción de la mielina y producir la liberación de sus componentes, que se convierten en inmunogénicos y estimulan la respuesta específica de los linfocitos.

Las citocinas clasificadas como citocinas proinflamatorias, tales como: Interferón gamma (INF- γ), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y la

Alérgica Experimental (EAE), el mejor modelo animal que explica la EM . Las quimioquinas mejoran la migración de las células T y monocitos a través de quimioatracción directa, ya que activan las integrinas leucocitarias que unen sus receptores en las células endoteliales.

El CD54 (ICAM-1), una proteína de superficie de 76-114 kDa con cinco dominios extracelulares de Inmunoglobulinas (Ig), se une al receptor de membrana del CD11a (integrina LFA-1) y del CD11b (Mac-1) sobre la superficie de los leucocitos. El CD106 (VCAM-1), otra molécula que pertenece a la superfamilia de las Ig, con siete dominios extracelulares se une con la alfa-4-integrinas (como la VLA-4 o CD49d), la cual se encuentra expresada en la mayoría de las células mononucleares. Tanto CD54 como CD106, juegan un importante papel en la interacción endotelio-leucocito y en la extravasación, y éstas como sus respectivos ligandos se han identificado sobre las células inflamatorias de las lesiones de EM, sin embargo no se han encontrado en cerebros normales.

Se han realizados varios estudios dirigidos a establecer las concentraciones particulares de citocinas en los pacientes de EM encontrándose resultados conflictivos, quizás por cuestiones metodológicas o por la complejidad biológica propias de estas moléculas. Las citocinas son secretadas localmente, se encuentran libres a concentraciones muy bajas, y poseen una vida media corta ya que son metabolizadas rápidamente por las células circundantes. Además es necesario no limitarse a estudiar una citoquina en particular, ya que es necesario estudiar la interrelación existente entre las concentraciones de diferentes citocinas en un mismo

individuo en determinado momento o estado clínico de la enfermedad. Una citoquina puede modular la secreción de otras por lo que es necesario examinar varias citocinas relacionadas de manera sinérgica y/o anérgicamente para entender su participación en el proceso de salud-enfermedad. (9)

En estudios de EAE, las células Th1, han sido asociadas con la patogénesis de la enfermedad. En varios estudios se han examinado tejidos de cerebros de ratas con lesiones por expresión de citocinas, encontrándose presente citocinas como el IFN- γ , TNF- α e IL-12 durante la enfermedad aguda, pero no en las remisiones. De igual forma en estudios de placas de EM, se encontró TNF- α en lesiones crónicas, lo que sugiere una asociación específica entre el TNF- α y las lesiones. (1).

Ya es conocido que el IFN- γ induce la exacerbación de la enfermedad, es un potente inductor de la expresión de MHC II sobre una gran variedad de células presentadoras de antígenos, además su significancia clínica fue demostrada cuando se administró sistémicamente como tratamiento y ocasionó la exacerbación de la enfermedad en pacientes con RRMS.(10)

Mientras que la IL-10, una citoquina antiinflamatoria producida por linfocitos Th2, se encuentra en altas concentraciones por linfocitos T específicos para mielina en pacientes en remisión. La IL-10 mantiene las células dendríticas (CD) inmaduras haciéndolas resistentes a las señales de maduración inducidas por los lipopolisacáridos. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan por una baja capacidad aloestimuladora y una también baja producción de citocinas

proinflamatorias como la IL-12, IL-6, y TNF- α . Estos hechos hacen a las CD inmaduras en un potencial inductor de tolerancia en enfermedades autoinmunes.

Estudios *in vitro* muestran que CD inmaduras procedentes de individuos sanos inducen la producción de IL-10, cuando se cultivan células CD4⁺ no proliferativas y células T alogénicas. Contrariamente las CD maduras inducen a una fuerte expansión de las células T hacia Th1. La mayoría de los efectos inmunosupresores de la IL-10 están relacionados con la inhibición de la función de presentación antigénica de las células presentadoras de antígenos, lo que la convierte en una fuerte candidata terapéutica. (11)

El receptor de membrana de la interleucina-2 (IL-2) es una proteína trimérica formada por las cadenas alfa (α), beta (β) y gamma(γ). Las cadena α y β intervienen en la unión a la citoquina, y las cadenas β y γ en la transducción de señales. Fig.3

El IL-2R α es un polipéptido de 55 kD que aparece tras la activación de la célula T y que originalmente se le denominó antígeno Tac (del inglés T activation). En condiciones basales el linfocito T expresa las subunidades beta y gamma del receptor, mientras que la expresión de la cadena alfa se produce tras la presentación de un antígeno por una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y su reconocimiento a través del receptor de células T (TCR). Paralelamente, el linfocito T sintetiza IL-2, que se unirá al receptor de membrana y será el responsable de la activación y expansión clonal de los linfocitos T. El receptor soluble de la interleucina-2 (sIL-2R) se genera a partir de una ruptura proteolítica de la subunidad alfa. El sIL-2R se libera proporcionalmente a la expresión del receptor de membrana

principales acciones de la IL-2 tenemos que estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, B y NK

Los procesos de autoagresión incluyen a menudo secreción de IL-2 y de la forma soluble de su receptor como indicador de la activación de células T autoreactivas. El incremento de las concentraciones séricas de la IL-2 y su receptor soluble han sido reportados en pacientes con EM, especialmente en los estados activos de la enfermedad. (12)

En cuanto a los linfocitos o células B, han sido detectados en lesiones de EM por muchos años, sin embargo este hallazgo es menos consistente que el de células T, por lo que las investigaciones se han enfocado principalmente en linfocitos T. Sin embargo ahora se sabe que ambos participan activamente en la inmunopatología de la EM. Los linfocitos T secretan citocinas que estimulan a las células B a secretar anticuerpos que causan la desmielinización.

En el LCR de pacientes con EM las proteínas de la familia de las inmunoglobulinas a la cual pertenecen los anticuerpos, se encuentran a menudo a concentraciones más altas que en personas sanas. El incremento de inmunoglobulinas es debido a la producción de un pequeño grupo de clones diferentes de células B a las cuales se les ha inducido proliferar. Las células B del LCR de estos pacientes poseen mutaciones en su secuencia de DNA que codifica para la producción de anticuerpos, lo cual es consistente con la acción de la selección de un antígeno por un anticuerpo con alta afinidad por el sitio de unión al antígeno.

Tales eventos son comúnmente observados en una respuesta inmune contra antígenos foráneos (como en infecciones bacterianas), así como también en una respuesta autoinmune humoral. Sin embargo, no han sido identificados ni los antígenos foráneos, ni los autoantígenos, causantes de la generación de las bandas oligoclonales. (5)

Se enfatizará más la importancia de la inmunidad humoral al discutir sobre las cadenas ligeras de los anticuerpos.

4. Curso Clínico De La Esclerosis Múltiple:

Se conoce en la actualidad que la EM es una enfermedad activa en la mayoría de los pacientes la mayor parte del tiempo. Esta actividad posee secuelas reversibles e irreversibles; las secuelas irreversibles conducen a la discapacidad progresiva de muchos pacientes. La EM toma varias formas, distinguiéndose por diferentes patrones de actividad, los cuales pueden producir empeoramiento en ambos tipos de EM tanto en la de remisión como en la progresión.

En la EM de remisión el desmejoramiento ocurre en la mayor parte de los pacientes durante los ataques agudos con recobros incompletos. Mientras que en la EM de tipo progresivo el patrón dominante es una acumulación gradual de alteraciones neurológicas, con un lento desmejoramiento clínico.

Tanto la actividad como la progresión de la enfermedad poseen componentes clínicos y subclínicos. La actividad clínica de la enfermedad y la progresión son evaluadas por la observación y la exploración del estado neurológico. Componentes subclínicos referentes a cambios patológicos no observables en el examen clínico, pueden ser detectados con ayuda de pruebas de laboratorios y parámetros neuroimagenológicos. (5)

Se han identificado tres cursos clínicos en la Esclerosis Múltiple :

- *Esclerosis Múltiple con periodos de Exacerbación-Remisión* (RRMS, del inglés: Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis), se caracteriza por periodos de exacerbaciones, seguidos de remisiones parciales o totales de los síntomas;
- *Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva* (SPMS del inglés: Secondary Progressive Multiple Sclerosis), en la cual la condición de progresión va seguida de un período previo de RRMS;
- *Esclerosis Múltiple Progresiva Primaria* (PPMS del inglés: Primary Progressive Multiple Sclerosis), consistente en una forma progresiva de EM sin remisiones. (1).

4.1. Actividad Clínica:

4.1.1. Recaídas:

Las recaídas se refieren a los ataques agudos de la enfermedad. Involucra ataques agudos o comienzo de síntomas abruptos, con afectación local del SNC. Entre los síntomas típicos se encuentra disminución o pérdida de la visión de un ojo (neuritis óptica), entumecimiento o parálisis de una parte del cuerpo (afectación de sistema sensorial), debilidad de una parte del cuerpo

4.1.2. Progresión

Las formas clínicas de recaída de EM se caracterizan por exacerbaciones de enfermedad aguda. En contraste, la EM progresiva esta caracterizada por un lento deterioro e incremento del déficit neurológico, y es la forma mas severa de EM y tiene peor pronóstico que la RRMS.

4.1.3. Actividad y Progresión en la Enfermedad Subclínica:

Los parámetros clínicos en la recaída y progresión subestiman el daño real del tejido. Cuando macroscópicamente el tejido cerebral parece ser normal, al ser observado bajo el microscopio, se puede detectar inflamación, gliosis, y daño de la mielina. Estudios clínicos de cerebros aparentemente normales suelen revelar cambios en las organelas como lisosomas, enzimas y constituyentes de la mielina. Además numerosas investigaciones de técnicas neuroimagenológicas pueden detectar cambios en el cerebro y médula espinal que parecen como áreas normales libres de lesiones por resonancia magnética convencional. Los cambios en el tejido cerebral aparentemente normal son generalmente pronunciados en pacientes de EM con discapacidad severa.

Aún así, la MRI convencional indica que la mayoría de la formación de lesiones nuevas son clínicamente silentes, lo que significa que el examen clínico no revela los síntomas correspondientes. Aproximadamente 80-90% de las nuevas lesiones cerebrales no producen recaídas identificables. En conclusión, las manifestaciones clínicas de la EM posiblemente representen

solo “la punta del iceberg”, con la mayoría de los daños ocurriendo mucho antes de ser detectable, hasta que la acumulación de los mismos sobrepasa la habilidad del SNC de compensar los mismos. (5)

5. Diagnóstico De La Esclerosis Múltiple:

El diagnóstico de la Esclerosis múltiple (EM) está basado en parámetros clínicos tales como: historia médica y exploración neurológica, parámetros paraclínicos: como MRI (Imagenología por Resonancia Magnética), Bandas Oligoclonales (BO) en Líquido Ceforraquídeo (LCR) y potenciales de evocado. No existe una prueba diagnóstica específica para la EM, y la naturaleza intermitente de la enfermedad y la alta variabilidad de síntomas dificultan el diagnóstico. Cuadro 1

Cuadro 1 Signos y Síntomas Iniciales de la Esclerosis Múltiple

Síntomas Frecuentes	Síntomas poco Frecuentes
<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones sensoriales • Debilidad • Dificultad para caminar • Disminución de la visión monocular • Pérdida de coordinación 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones con la vejiga urinaria • Problemas intestinales • Disfunción sexual • Dificultades cognitivas • Dolor

Fuente: **Multiple Sclerosis: Current Status and Strategies for the Future**, Board on Neuroscience and Behavioral Health, 2001 (5)

La presentación de la EM puede ser monosintomática o tener signos y síntomas multifocales; muchos desordenes neurodegenerativos son similares a la esclerosis múltiple en sus presentaciones. El criterio diagnóstico general fue establecido en 1965 por el comité Nacional de Esclerosis Múltiple de los Estados Unidos y decía que un diagnóstico “clínicamente definido” de EM requiere que se evidencien dos o más lesiones de la materia blanca en por lo menos dos ocasiones. Para 1983, este criterio fue extendido por Poser et al. Al incluir el uso de parámetros paraclínicos, estandarizándose los criterios diagnósticos. cuadro 2

En julio del 2000 un comité internacional revisó estos criterios, y le dio a la información obtenida a través de la RMI un componente más integral incorporándola como criterio diagnóstico para la PPMS (Primary Progressive MS).

Los criterios de Poser fueron revisados y redefinidos. Estos se basan ahora en la presentación clínica, las anomalías del LCR, las anomalías del cerebro y médula espinal (MRI) y los potenciales de evocado. Utilizando estos criterios por lo menos un año de progresión clínica documentada, puede ser diagnosticada la PPMS .

5.1 Resonancia Magnética:

La RMI revela daños neuropatológicos en el 70-95% de las personas con EM, sin embargo su alta sensibilidad con una limitada especificidad conduce frecuentemente a errores diagnósticos, ya que otras condiciones como mielopatías y encefalomielitís pueden causar lesiones similares a las presentadas en la EM. Por lo tanto, es importante que la imagenología sea usada en combinación con otros datos clínicos.

Cuadro 2. Criterio Diagnóstico de Poser para la Esclerosis Múltiple

Categoría	Evidencia Clínica		Evidencia Paraclínica	BO _{LCR} /IgG	
Diagnóstico Clínico:					
Definitivo	2	2			
	2	1	Y	1	
Probable	2	1			
	1	2			
	1	1	y	1	
Diagnóstico Soportado por el Laboratorio:					
Definitivo	2	1	o	1	+
	1	2			+
	1	1	y	1	+
Probable	2				

Fuente: Multiple Sclerosis: Current Status and Strategies for the Future, Board on Neuroscience and Behavioral Health, 2001 (5)

5.2 Potenciales de evocados:

Cuando la desmielinización o esclerosis ocurre, la conducción nerviosa de los impulsos a través de los axones es más lenta o interrumpida. La discapacidad para conducirse refleja en un incremento en la latencia de los potenciales de evocado o en un incremento en la cantidad de tiempo entre la presentación de un estímulo sensorial y su resultante cambio en el campo eléctrico del cerebro. Los potenciales de evocado son medidos poniendo pequeños electrodos en la cabeza, en la región correspondiente al estímulo estudiado. Respuestas anormales de potenciales de evocado a diferentes tipos de estímulos proveen pistas para localizar las placas o lesiones y son útiles en la detección de lesiones clínicamente silentes que no producen síntomas observables fácilmente. Sin embargo los potenciales de evocado anormales no son exclusivos de la EM.

5.3 Estudio De Líquido Cefalorraquideo (LCR)

La síntesis intratecal de inmunoglobulinas es frecuentemente observada en desordenes inflamatorios del SNC tanto infecciosos como autoinmunes, y se ha demostrado su alto valor diagnóstico. Debido a que pequeñas cantidades de inmunoglobulinas séricas atraviesan la BHE por transferencia pasiva, es necesario diferenciar el origen de las inmunoglobulinas presentes en el LCR antes de diagnosticar su origen intratecal. (13)

Para confirmar la síntesis intratecal de inmunoglobulinas que se produce en respuesta a diversas enfermedades neurológicas, la comparación de las razones LCR/suero han sido realizadas con un enfoque lineal, como lo hace el índice IgG o por medio de la velocidad de síntesis de IgG de Tourtellotte.

La albúmina es una proteína que sirve como marcador del paso de moléculas a través de la barrera sangre-LCR, ya que su síntesis es hepática, no se cataboliza ni se modifica al atravesar la barrera y posee características fisicoquímicas bien estudiadas y definidas. La razón albúmina ($Q_{alb} = \text{albúmina LCR} / \text{albúmina suero}$) nos permite evaluar el funcionamiento de la barrera hematoencefálica.

En general los índices de LCR/suero no son lo suficiente sensibles para diferenciar la síntesis intratecal. Existen también métodos de evaluación cualitativos como la detección de Bandas Oligoclonales y en algunos casos de bandas producidas por las cadenas ligeras kappa y lambda. Generalmente realizado por SDS-PAGE, inmunotinción o inmunofijación, que ofrecen mayor sensibilidad, pero no dan resultados cuantificables y son subjetivos. (15)

5.3.1 Bandas Oligoclonales

Muchos pacientes con EM poseen bandas oligoclonales (BO) en su LCR sin embargo, éstas también se encuentran en otras enfermedades neurológicas como por ejemplo enfermedad cerebrovascular, vasculitis, Guilliam-Barré, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, entre otras.

En 1988, Davenport y Keren definieron bandas oligoclonales positivas como la presencia de más de una banda en la región gamma del LCR, sin su correspondiente banda en el suero. Las BO son producidas por la presentación de anticuerpos particulares que pueden ser visualizados como bandas cuando las proteínas del LCR son separadas en un gel de electroforesis. Cada una de las bandas contiene un único tipo de anticuerpos producidos por un único clon de células B, en la EM ese anticuerpo es aún desconocido. (5)

En 1994 el Comité Europeo de Esclerosis Múltiple (Committee of the European Concerted Action for Multiple Sclerosis) recomendó que patrones de isoelectroenfoque diferentes de IgG debían ser reportados por el laboratorio, cada uno con una interpretación concerniente a la presencia o ausencia de síntesis intratecal de bandas oligoclonales; clasificándose en cinco categorías o patrones los tipos de bandas obtenidos:

- Patrón I: No hay bandas presentes en LCR normal,
- Patrón II: LCR con bandas oligoclonales, sin presencia de las mismas en suero.
- Patrón III: LCR presenta bandas oligoclonales, algunas de las cuales se observan en el suero.
- Patrón IV: LCR y suero presentan las mismas bandas oligoclonales, sin producción local de bandas
- Patrón V: Se observan bandas monoclonales tanto en LCR como en suero.

Aquellos pacientes que poseen patrones del tipo II y III (síntesis intratecal de bandas oligoclonales) tienen que ser diferenciados si padecen de EM u otra enfermedad neurológica, especialmente aquellos en las etapas tempranas de la enfermedad donde se requieren de por lo menos dos criterios de ataques clínicos espaciados en el tiempo para clasificarlos. (4)

Las BO que se presentan sólo en LCR están asociadas con una gran variedad de enfermedades inflamatorias del SNC, aparecen en el 90% de los pacientes con EM en algún momento durante el curso de la enfermedad. Sin embargo el incremento de IgG en LCR no es específico de EM, pero es una indicación de enfermedad neural crónica.

Si las BO son halladas tanto en LCR como en suero, y los patrones son los mismos en ambos fluidos, entonces la patología primaria se encuentra fuera del SNC y el LCR esta reflejando las anormalidades de las gamma globulinas séricas.

pasiva a través de la BHE, por lo que es necesario diferenciar el origen de las inmunoglobulinas, antes de que sean diagnosticadas como de síntesis intratecal.

Las inmunoglobulinas son proteínas producidas por las células B al ser estimuladas por un antígeno específico, poseen una estructura común de cuatro cadenas peptídicas. Esta estructura está integrada por dos cadenas ligeras idénticas y polipeptídicas, con un peso molecular aproximado de 25kDa y dos cadenas pesadas de de 50kDa o mayor. Cada cadena ligera esta unida a cadena pesada por un enlace disulfuro y por interacciones no covalentes para formar un heterodímero. Existen cinco tipos de cadenas pesadas o isotipos: M, G, A, E y D; cada una de las cuales puede unirse a una cadena ligera de tipo kappa (κ) o lambda (λ).

Las dos clases o isotipos de cadenas ligeras se distinguen por sus regiones carboxi terminales (regiones C). Las regiones C de todas las moléculas de anticuerpos que contienen cadena kappa (CL κ) tienen una secuencia de aminoácidos idéntica y son distintas de las secuencias de la región C de las cadenas ligeras lambda (CL λ). En el ser humano el 60% de las moléculas de anticuerpo tienen cadenas ligeras κ , y alrededor del 40% tienen cadenas ligeras λ . Se producen cambios notables de esta proporción cuando tiene lugar una expansión monoclonal de células B neoplásicas, debido a que el clon neoplásico produce moléculas de anticuerpos con la misma cadena ligera.

La recombinación de los segmentos génicos de la inmunoglobulina en cada locus ocurre en un orden preciso. En una célula B en desarrollo, la primera recombinación de genes tiene lugar en el locus de la cadena pesada, siendo la cadena μ la primera cadena en formarse. La formación de la cadena μ regula la recombinación somática posterior de los genes de Ig inhibiendo el reordenamiento del locus de cadena pesada del otro cromosoma y estimulando el reordenamiento de los genes de cadena ligera. Se reordena en primer lugar el locus κ , y la producción de las CL κ inhibe el reordenamiento del locus λ . Por consiguiente un clon individual de células B puede producir solo uno de los dos tipos de cadenas ligeras durante su vida. (Fig N°6)

Las cadenas ligeras son secretadas junto a la molécula de inmunoglobulina intacta por las células plasmáticas. Sin embargo, ha sido bien documentado que las células plasmáticas también pueden secretar cadenas ligeras libres producidas en exceso con relación a las cadenas pesadas. Estudios en humanos demuestran que solo el 60% de las cadenas ligeras sintetizadas son incorporadas para formar parte de la cadena completa de inmunoglobulina, la fracción remanente es liberada al suero como cadena ligera libre, por lo que es normal encontrarlas normalmente en suero, LCR y orina. Estas cadenas muestran afinidad específica en el sitio de unión al antígeno. (18)

Las cadenas ligeras libres κ son capaces de sensibilizar a los mastocitos, los cuales almacenan una gran variedad de mediadores activos que pueden ser liberados rápidamente después de la activación celular. La unión específica del antígeno a la

IV. METODOLOGÍA

1. Aspectos Metodológicos

1.1 Tipo de estudio: No experimental, analítico, transversal.

1.2 Variables:

- **Dependiente:** Estado inmunológico del espacio intratecal, el cual puede encontrarse en un estado normal cuando existe un equilibrio en las concentraciones de citocinas, ausencia de síntesis intratecal de inmunoglobulinas y ausencia de bandas oligoclonales, o anormal cuando se presenta un aumento de citoquinas Th1 o Th2, síntesis intratecal de inmunoglobulinas y presencia de patrones de bandas oligoclonales.
- **Independiente:** Concentración de interleucinas, receptor soluble de IL-2, la síntesis intratecal de inmunoglobulinas, la presencia de bandas oligoclonales, parámetros que afectaran el espacio intratecal.

1.3 Universo

El universo esta constituido por todas las muestras que llegaron en el período de abril del 2005 hasta diciembre del 2006 a la sección de Genómica y Proteómica del Instituto Conmemorativo Gorgas para Estudios de la Salud (ICGES) para la realización estudios para el diagnóstico de Esclerosis Múltiple. Este universo esta constituido de 174 LCR con su contraparte de suero.

1.4 Muestra para estudio de citocinas:

Se midieron las concentraciones de la IL-10, el TNF- α , el INF- γ , y del receptor soluble de la IL-2 por la técnica de ELISA, en 68 muestras de Líquidos Ceforraquídeos; las cuales fueron seleccionada estratificadamente dependiendo el patrón de bandas oligoclonales (BO) informado previamente por el departamento de genómica y proteómica del ICGES para cada una. Se estratificarón en dos grupos según patrón: Grupo I, el cual incluye el patrones 1 en el cuales no hay evidencia de síntesis intratecal por la técnica de IEE, y el Grupo II, que incluye los patrones 2 (grupo IIa) y 3(grupo IIb), en los cuales se demuestra la síntesis intratecal de inmunoglobulinas por la técnica de IEE. En cada uno de los cuales se presentan muestras de pacientes tanto masculinos como femeninos, todos referidos por la existencia de signos y síntomas asociados con EM.

1.5 Muestras para estudios Nefelométricos:

Las concentraciones séricas y en LCR de Inmunoglobulina G, Albúmina, y cadenas libres kappa totales, fueron medidas con un nefelómetro Image, de Beckman Coulter, con reactivos específicos para cada analito (perla de látex recubierta por anticuerpos específicos) de esta misma marca. Los resultados, no fueron considerados como valores individuales, se utilizaron para calcular los índices que indican el estado de la barrera hematoécefálica, y la síntesis intratecal de inmunoglobulina G. Por otro lado se midió las cadenas ligeras kappa libre de los anticuerpos con un nefelómetro Hitachi 912 de Roche y con reactivos anti cadena kappa libre de Binding Site. Todos los datos obtenidos se tabularon en una tabla de Excel, con las fórmulas necesarias para calcular los índices antes mencionados.

Las muestras fueron clasificadas según el patrón de Bandas Oligoclonales presentados por la técnica de Isoelectroenfoque. Se trabajaron con muestras clasificadas dentro de los patrones 1 al 4 de BO, de las cuales se dividieron en dos grupos, el grupo I, abarcan las muestras clasificadas como patrones 1 y 4, el grupo II que a su vez fue subdividido en los subgrupos a y b. El subgrupo IIa contiene las muestras que presentaron patrón 2 de BO y finalmente el subgrupo IIb que incluye las muestras con un patrón 3 de BO. Se analizaron un total de 63 muestras de pacientes de ambos sexos, cincuenta mujeres, y 13 hombres.

1.6 Cálculo del tamaño muestral:

El tamaño de la muestra se cálculo con la función STAT cal del programa Epi Info para muestras escogidas al azar para estudios descriptivos. El cálculo de la frecuencia fue realizado con las muestras a las cuales se les había reportado patrón 2 de BO, siendo éstas 39 de las 174.

<i>Población:</i>	<i>174</i>
<i>Frecuencia específica:</i>	<i>22%</i>
<i>Error aceptable:</i>	<i>0.05</i>

Obteniendo los resultados presentados en el anexo 1 según el nivel de confianza.

n=32 para una confianza del 99.9%

n=13 para un 95%

1.7 Criterios de Inclusión y exclusión

Inclusión:

- Todos los LCR de pacientes diagnosticados clínicamente con Esclerosis Múltiple los cuales se hayan analizado previamente por BO, que vengan acompañados de sus respectivas muestras séricas tomadas concomitantemente y acompañados con el formulario de solicitud de prueba debidamente llenado.

Exclusión:

- Muestras de LCR que no se acompañen de muestras séricas y/o formularios de solicitud
- Muestras que muestran indicios de contaminación bacteriana, hemólisis, que puedan interferir con los resultados.
- Muestras con volumen menor de 500ul

2.0 Medición de Citocinas

La medición de $INF-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-10 y del sIL-2R en LCR Research, Besançon, France, se llevó a cabo por medio de la técnica de ELISA de Sandwich marca Diaclone Research, Besançon, France. Esta técnica fue utilizada en común para la medición de todas estas citocinas, y solo varía, en cuanto al procedimiento, en los tiempos de incubación. La misma se llevó a cabo sólo en los LCR y el cálculo del cociente de albúmina nos orientará la posibilidad de que valores alterados provengan de fuera del SNC.

Para determinar los intervalos de referencia solo se consideran los resultados obtenidos de muestras provenientes de pacientes sin EM (por las condición de toma de muestra y resultado de BO tomaremos al grupo I como grupo normal). Se definen los intervalos de referencia el punto donde cae el 95% de las muestras de este grupo. Este 95% esta definido como la media mas o menos dos desviaciones estándar.

2.1 Principio Del ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay):

Un anticuerpo monoclonal específico para el metabolito que se quiere medir ha sido pegado en la fase sólida (micropozo). Las muestras, controles y estándares con concentraciones conocidas del metabolito son añadidas a estos micropozos y son incubadas junto con un anticuerpo monoclonal biotilado idéntico al unido al pozo. Luego de remover las sustancias no reactantes con lavados, se realiza una segunda incubación con estreptoavidina unida a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Por la alta afinidad de la estreptoavidina con la biotina estas se unirán. Posteriormente se eliminan los remantes no reactantes a través de lavados, y se agrega el cromógeno: Tetrametilbencidina, el cual en presencia de la enzima y el substrato cambiará de color, la reacción se detiene con un ácido y se mide la absorbancia a 450nm.

2.2 Procedimiento ELISA:

2.2.1 Preparación de Reactivos:

Buffer de Lavado:

Diluir el Buffer de lavado concentrado 200x en un cilindro graduado, evitando la formación de espuma. Aforar el contenido del envase (10ml) hasta 2 000ml. Almacenar de 2 a 25° C.

Buffer diluyente de Estándar:

Añadir el contenido de un vial (10x) a 225ml de agua destilada, antes de su uso.

Estándares:

Reconstituir los estándares con el volumen indicado en la etiqueta del vial del con el diluyente del estándar proporcionado por el kit. Esta reconstitución produce una concentración específica del estándar, se debe dejar reposar por 5 minutos, y mezclar suavemente. No se deben conservar los sobrantes para próximas detecciones.

Preparación de Controles:

Reconstituir los controles con los buffer diluyentes de estándar proporcionados con el volumen específico dado en la etiqueta del vial. Dejar reposar por 5 minutos y mezcle suavemente.

Preparación del Anticuerpo Biotinilado:

Preparar antes de su uso en un tubo de vidrio, diluir 240ul del anticuerpo con 6 369ul del diluyente del anticuerpo biotinilado.

Preparación de la Estreptoavidina-HRP:

Diluir la estreptoavidina-HRP 1:100 justo antes de usar, añadiendo 0.5ml del diluyente de HRP al vial que contiene la Estreptoavidina-HRP concentrada. Luego realizar una segunda dilución utilizando 150ul de la dilución de estreptoavidina-HRP con 10ml del diluyente.

2.2.2 Procedimiento:

1. Dejar atemperar todos los reactivos a TA y mézclelos antes de su uso.
2. Remover las tiras suficientes de micropozos para los estándares, controles y muestras, y póngalas en el plato de ELISA.
3. Añadir 100ul del diluyente del estándar B1, B2, C1, C2, D1, D2, E1, E2, F1 y F2. Pipetear 200 ul del estándar a los pozos A1 y A2. Transfiera 100ul de A1 y A2 a B1 y B2 respectivamente. Mezclar con repetidas aspiraciones y pasar del pozo B1, B2 al C1 y C2, repetir el mismo procedimiento hasta los pozos F1 y F2, en los cuales, luego de mezclar desechar los últimos 100ul de esta mezcla dejando 100ul en los pozos.
4. Añadir 100ul del diluyente del estándar a los pozos G1 Y G2, estos serán los pozos blancos.
5. Añadir 100ul del control y las muestras a cada uno de los pozos designados.
6. Agregar 50ul del anticuerpo específico biotilnado a cada pozo.
7. Cubrir el plato e incube de 18-25° C (1-3hr dependiendo el metabolito que se está midiendo)
8. Remover el cobertor y lave los posillos de la siguiente manera:
 - a. Aspirar completamente el líquido de cada pozo;
 - b. Dispensar 300ul de la solución de lavado en cada pozo;
 - c. Aspirar el contenido de cada pozo;
 - d. Repetir los pasos b y c dos veces más.
9. Preparar la solución de Estreptoavidina antes de su uso.

10. Añadir 100ul de la Estreptoavídina-HRP a cada pozo incluyendo los blancos
11. Incubar a temperatura ambiente (18-25° C) por 30 minutos.
12. Repetir los pasos de lavado igual que en 8.
13. Pipetear 100ul de la solución TMB lista para usar a cada pozo incluyendo los blancos. Incube de 12-15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.
14. Detener la reacción agregando 100ul de la solución de parada y leer inmediatamente a 450nm con un filtro de referencia de 620nm.

2.2.3 Cálculos de los Resultados:

- Calcular el promedio de las absorbancias para cada duplicado de estándares, controles y muestras. Los duplicados deben estar entre el 20 % de la media.
 - Crear una curva linear de los estándares, graficando el promedio de las absorbancias (en el eje de las ordenadas), contra la concentración del estándar (en el eje de las abscisas).
 - Determinar la concentración de la citoquina de cada muestra, encontrando el valor de la absorbancia en la ordenada y extendiéndola hacia el eje horizontal.
- De otra manera, se pueden obtener los valores de pendiente e intercepto de la curva de estándares y sustituir los valores de absorbancia para obtener concentraciones, se puede automatizar este procedimiento con ayuda de tablas de Excel.

3.0 Detección Nefelométrica

La detección de Albúmina, Inmunoglobulina G, y Cadenas Ligeras kappa y (libre y ligada) se realizó por nefelometría cinética automatizada con el Sistema inmunoquímico Image de Beckman Coulter. Mientras que la medición de cadenas ligeras libres Kappa se midieron con el nefelometro de Roche, Hitachi 911 y el reactivo de Binding site. (ver ilustraciones del anexo I).

3.1 Evaluación de la Barrera Hematoencefálica y la Síntesis Intratecal de Inmunoglobulina

La posibilidad de daño de la barrera hematoencefálica se evaluó por el índice de albúmina que se determina mediante la siguiente relación:

Índice de Albúmina:

$$Q_{ALB} = \frac{ALB_{ser}}{ALB_{LCR}} \times 1000$$

Donde: ALB_{ser}: Concentración de albúmina en el suero

ALB_{LCR}: Concentración de albúmina en el Líquido Ceforraquídeo.

Valores del índice de albúmina > 6.8 indican daño de la barrera hematoencefálica

Hay varias fórmulas que pueden ser utilizadas para evaluar la presencia de síntesis intratecal de inmunoglobulinas.

$$\text{Índice de IgG o Índice de Link} = \frac{IgG_{LCR}/IgG_{suero}}{ALB_{LCR}/ALB_{suero}}$$

Que es igual que:

$$\text{Índice de IgG} = \frac{\text{IgG}_{\text{LCR}}/\text{ALB}_{\text{LCR}}}{\text{IgG}_{\text{suero}}/\text{ALB}_{\text{suero}}}$$

Donde: IgG_{LCR} : es la concentración de inmunoglobulina G en el LCR

$\text{IgG}_{\text{suero}}$: es la concentración de la inmunoglobulina G en el suero

$\text{ALB}_{\text{suero}}$: Concentración de albúmina en el suero

ALB_{LCR} : Concentración de albúmina en el Líquido Cefalorraquídeo.

Valores del Índice de Link > 0.68 indican síntesis intratecal de inmunoglobulina G

3.2 Evaluación de Cadenas ligeras de las inmunoglobulinas kappa

Para evaluar las cadenas ligeras se midieron las concentraciones de cadenas ligeras totales (unidas al anticuerpo y libres) por el método de nefelometría en suero y LCR, además de medir la concentración de las cadenas ligeras libres en los LCR. La vida media en el suero de las cadenas ligeras libres es demasiado corta (2-4 hrs) por la rápida eliminación renal, esta ruta de aclaramiento no es aplicable al espacio intratecal, por lo que se puede asumir que la vida media de estas cadenas en el LCR es comparable a la de otras proteínas. Así, pequeñas cantidades de síntesis intratecal de inmunoglobulinas, con una concomitante secreción de cadenas ligeras libres las convierten en un marcador potencialmente sensible para medir la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. (15)

La metodología utilizada en nuestro estudio tiene un límite de detección de 8 mg/dl. Razón por la cual se tomaran valores iguales o menores de este como

negativos o indetectables. Se correlacionaron los valores obtenidos de cadena ligera de los anticuerpos kappa libre, con los valores obtenidos de cadena ligera kappa total y de inmunoglobulina G, con el fin de establecer un factor que nos permita calcular de manera indirecta el valor de kappa libre a partir del valor de la concentración de kappa total e IgG.

3.3 Principio Del Nefelómetro:

El nefelómetro cinético mide el aumento de la intensidad de la luz dispersada por las partículas suspendidas (inmunocomplejos antígeno-anticuerpo) en una cubeta. La fuente de luz es un rayo láser de 670nm. El detector está colocado en un ángulo de 90° con respecto al rayo láser. La nefelometría es una técnica de referencia para la medición de inmunoglobulinas, por su alta sensibilidad.

3.4 Procedimiento:

1. Calibrar el nefelómetro para cada una de las pruebas.
2. Realiza los controles alto, medio y bajo para cada una de las pruebas.
3. Programar las pruebas requeridas con el código de identificación, especificar el tipo de muestra.
4. Imprimir la lista de trabajo y servir las muestras de acuerdo a estas.
5. Verificar la presencia de reactivos, buffer de muestra, y cubetas de dilución en el equipo e Iniciar la corrida.

3.5 Reporte de Resultados:

Los resultados de la albúmina, inmunoglobulina G y cadenas ligeras totales se dan en miligramos de la sustancia medida por decilitro de solución. Mientras que los de cadena ligera libre se expresan en miligramos por litro.

V. RESULTADOS

1. RESULTADOS

1.1 Concentración de Citocinas por ELISA

Los valores obtenidos para el TNF- α y INF- γ fueron indetectables, mientras que los obtenidos para IL-10 son muy bajos y no se observa diferencia significativa entre los diferentes grupos. Cuadro 1.

Cuadro 1. Concentración de IL-10 en pg/ml en LCR Según Grupo de Pacientes.

GRUPO	n	%	x (pg/ml)	Vmin. (pg/ml)	Vmáx. (pg/ml)
I	40	58.8	0.836	0.768	1.32
Ila	21	30.9	0.805	0.768	1.12
Ilb	7	10.3	0.882	0.658	1.06

Fuente: Datos primarios obtenidos por técnica de ELISA.

A diferencia de las citocinas, el receptor soluble de para la IL-2, arrojo resultados desde 0.0 pg/ml, hasta 508pg/ml, y se puede observar diferencias entre las medianas de los grupos analizados. Cuadro 2

Cuadro 2. Concentración de sIL-2R en pg/ml en LCR Según Grupo de Pacientes.

Grupo	N	Vmin (pg/ml)	1°cuartil	mediana (pg/ml)	3°cuartil (pg/ml)	Vmáx (pg/ml)	DS
I	28	0.0	0.00	9.10	40.18	76.74	24.38
II	27	0.0	18.19	33.65	101.57	508.00	117.37

Fuente: Datos primarios obtenidos por técnica de ELISA.

1.2 Mediciones Nefelométricas

Cuadro 3. Características Generales de las muestras participantes

Características	Grupo I	Grupo IIa	Grupo IIb
N Según sexo(F/M)	27(22/5)	24(18/6)	12(10/2)
Edad x(min-max)	39.4(17-66)	34(11-60)	41.8(17-68)

Se encontró la presencia de CLk libres (valores mayores de 0.8g/l, límite inferior de detección) en el 92% de los LCR de los grupos IIa y IIb y en un 26% (7 de 27 LCR) del grupo I.

Cuadro 4. Concentraciones de CLk libre en pg/ml obtenidas por nefelometría según grupo:

Grupo	N	Vmin	1°cuartil	media	3°cuartil	Vmáx
I	18	0.8	0.8	0.994	0.8	2.90
II	36	0.8	3.2	15.9	26	44.6

Fuente: datos primarios obtenidos por nefelometría.

Cuadro 5. Características del Espacio Intratecal de los pacientes por grupo

Características	Grupo I	Grupo IIa	Grupo IIb
Daño de la BHE. ($Q_{alb} \geq 6.8$)	24%	33%	67%
Síntesis Intratecal. ($Q_{1,ink} \geq 0.65$)	24%	60%	67%
Presencia de $CLk_{free} > 0.8$	20%	92%	92%
sIL-2R > 58.7 pg/ml	25%	40%	

Fuente: Datos primarios obtenidos en el presente estudio

Cuadro 6. Valor diagnóstico de CLk libre en comparación con BO por IEE

		BO POR IEE		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
CLkf	PRESENCIA	33	3	36
	AUSENCIA	2	15	17
	TOTAL	35	18	53

Sensibilidad	94.29%
Especificidad	83.33%
VPP	91.67%
VPN	88.24%
Índice kappa	0.7

Fuente: Cálculos realizados a partir de datos obtenidos al medir CLk libre por medir por nefelometría y compararlo contra el método de referencia de BO por IEE.

1.2.3 Evaluación de la concentración de las cadenas totales kappa de los anticuerpos

Los valores de las cadenas ligeras kappa totales no correlacionan con el valor obtenido de las cadenas ligeras kappa libres (gráfica 6), sin embargo correlacionan directamente con los valores de Inmunoglobulina G (gráfica 7).

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al evaluar la presencia de cadenas ligeras kappa libres, fue necesario establecer si las mismas eran el resultado de la síntesis dentro del SNC o si eran procedentes de la periferia, para establecer esta situación utilizamos el cociente de albúmina para excluir del estudio a todas las muestras del grupo I que demostraron tener daño en la BHE, ya que de estar presente concentraciones de este metabolito en este grupo “normal” podría ser procedente del suero y no producida intratecalmente.

Para analizar el significado estadístico de la presencia de CLk libres (cuadro 4), se excluyó del Grupo I todos aquellos LCR que presentaron índice de albúmina mayor de 6.8, que indica ruptura de la BHE (no compatible con resultados de muestras negativas). Además se excluyeron dos muestras con patrón I de BO, ya que presentaron evidencias de lesiones reveladas por resonancia magnética. En total se excluyeron 9 muestras con patrón I por considerarlas sospechosas de EM u otra enfermedad inflamatoria.

Es interesante enfatizar que dentro de estas muestras excluidas se encontró una muestra con un valor de kappa de 21.5g/ml y de sIL-2R de 246.83, además el reporte clínico presenta que el paciente muestra múltiples lesiones de la sustancia blanca por resonancia magnética, por lo que se podría presumir una de dos posibilidades, la primera, que se puede detectar concentraciones de CLkfree de los anticuerpos por nefelometría antes de que sean posible detectar las bandas oligoclonales, o la segunda, por lo complicado que se vuelve la detección de la

técnica de isoelectroénfoque, la cual depende de la objetividad del lector, no se haya podido reportar como patrón II. Este, no es el primer estudio en donde se presenta un caso como este, también se ha podido evidenciar en los estudios de Goffete , que a diferencia de nosotros detecto CLk libre por inmunoelectroforesis-capilaridad.

Luego de la exclusión de estas muestras, encontramos para la detección de CLk libre de las inmunoglobulinas que, en el grupo I, se presentó un 20% de muestras con valores mayores al límite de detección (0.8g/l).

En el grupo II, encontramos en el 92% de las muestras de los LCR presentaron diferentes concentraciones de cadenas ligeras libres kappa de los anticuerpos, porcentaje similar a los encontrados por Sindic et al (1991), quienes reportaron la presencia de cadenas ligeras kappa libre, por la técnica de inunmoafinidad mediada por capilaridad en LCR, con la misma frecuencia, en un grupo de 48 pacientes con esclerosis múltiple definida clínicamente y con bandas oligoclonales IgG positivas en LCR, mientras que no se demostró la presencia de la CLk libre en ninguno de las 26 muestras procedentes de pacientes que no poseían enfermedades inflamatorias del SNC. Los resultados de Sindic fueron apoyado posteriormente por Korsakova (1997), quien comparó la presencia de la CLk libre en saliva, lágrimas, orina y LCR, determinando que esta se encontraba presente en el 87% (13 de 15) de los LCR procedentes de pacientes con EM, contrariamente a lo que sucedía con las muestras procedentes de individuos que no padecían de enfermedades no inflamatorias del SNC. De igual manera, pero con la técnica de inmunofijación, Jenkins concluye que el 93% de pacientes con EM clínicamente confirmados presentan CLk libres en LCR.

Los rangos de valores obtenidos para los pacientes del grupo II fue de 0.8 a 44.6g/l, observándose sólo un valor en el límite no detectable. Al revisar la literatura encontramos los estudios de Fisher en el 2004, quién midió por la misma metodología un grupo de pacientes con características similares, encontrando valores en el grupo similar al grupo II entre 0.29-28.3g/l.

Otro hecho interesante que pudimos observar fue que una muestra del grupo IIa, salió por debajo del límite de detección de la prueba, la misma, no era un caso de EM, ya que la resonancia magnética, potenciales de evocado salieron negativos, en adición, posteriores evaluaciones clínicas clasificaron a este paciente con otro tipo de enfermedad no inflamatoria.

En el grupo IIb, la única muestra que presentó un valor de CLk libres menor que el límite de detección es proveniente de un paciente que posteriormente se diagnosticó con tumor del tallo cerebral.

Todas estas asociaciones de los resultados con la clínica nos permiten inferir el poder predictivo de esta prueba. Los cuales fueron confirmados con los cálculos correspondientes en relación a la detección de Bandas Oligoclonales por Inmunolectroforesis como método de referencia, la cual aunque no es una prueba 100% específica, ni 100% sensible, es el método de referencia utilizado actualmente para el diagnóstico de laboratorio de la EM. Si observamos los resultados del cuadro 6, podemos observar que se obtuvo un valor de sensibilidad del 94%, y una

especificidad del 83.3%, lo que significa que de 100 pacientes que se sometan a esta prueba solo 6 no serán detectados y 17 podrían ser clasificados como enfermos de EM sin estarlos. También resultó un valor predictivo positivo (VPP) de 91.6%, lo cual nos indica que 91 de 100 pacientes con este examen positivo son enfermos de esclerosis múltiple, mientras que el valor predictivo negativo (VPN), fue del 88.2%, valor que nos habla que sólo el 12% de los individuos negativos para esta prueba podrían realmente tener Esclerosis Múltiple. Estos resultados atribuyen a la medición de CLk libre de los anticuerpos por nefelometría una metodología con valiosos atributos para ser considerada evaluar en los pacientes sospechosos de EM. Aunque existen muchos estudios por diferentes metodologías que demuestran el valor diagnóstico de esta prueba, todavía no se ha considerado como una prueba de rutina para el diagnóstico de EM, posiblemente porque hasta hace pocos años atrás no se tenían los reactivos y la tecnología de la nefelometría para medirlas, por lo cual si las técnicas disponibles poseían el mismo grado de dificultad necesario para medir Bandas Oligoclonales, no existía ninguna ventaja para tomarlas en cuenta. Sin embargo, hoy hay disponible un nefelómetro en la mayoría de los hospitales generales, los cuales pueden realizar esta medición en pocos minutos, sumado con el hecho que pueden calcular los cocientes de albúmina e IgG. Esto aportaría información de laboratorio muy valiosa del estado intratecal del paciente.

Realmente existían controversias entre el uso de la medición cuantitativa, o la tradicional cualitativa, antes de que se propusiera la técnica de nefelometría, pero ambas tienen sus ventajas y desventajas. Anteriormente sólo se tenía como técnica cuantitativa la evaluación de los Índices de IgG, los cuales tienen un 75% de

sensibilidad versus el 95% que ofrece la técnica de isoelectroenfoque; ahora se aporta la medición cuantitativa de CLk libres la cual tiene un 92-94% de sensibilidad. Además, puede ser de utilidad para monitorear la terapia o para el pronóstico de la enfermedad, como explica Thompson en el editorial de *Clinical Chemistry* donde se publicaron los estudios de Fisher (15).

También consideramos evaluar las cadenas ligeras totales, para obtener un factor que nos permitiera calcular el valor de las cadenas ligeras libres, lo cual no fue posible ya que los datos no siguen un patrón proporcional. Sin embargo, sí pudimos notar que los valores de CLk totales de los pacientes del grupo II se encontraban anormalmente altos cuando se comparaban con los del grupo I; además, al comparar estos valores con los de IgG encontramos que eran valores muy similares debido a que las cadenas ligeras libres tienen valores muy bajos en LCR comparados con los de la kappa unida al anticuerpo. Por lo cual podemos sugerir que en caso de no poseer el reactivo de IgG para calcular los índices de Link o el cociente de IgG, podrá ser usada la detección de cadenas ligeras kappa totales.

En cuanto a la evaluación del estado de la BHE podemos observar que como era de esperar, se presentó el mayor porcentaje de pacientes con este indicador positivo en el grupo IIb, el cual reúne a las muestras con un patrón de bandas oligoclonales tipo 3. En este grupo se observan bandas en el líquido cefalorraquídeo que también se encuentran en el suero, y además, otras bandas exclusivas del espacio intratecal, por lo tanto, en este grupo se espera el mayor porcentaje (67% comparado con el 33% obtenido para el grupo IIa y el 24% para el grupo I) de los pacientes con el cociente de albúmina anormalmente alto. Este fenómeno se explicaría por la

presencia aumentada de proteínas séricas en el espacio intratecal por la ruptura de la BHE. Además se evidencia la existencia de síntesis intratecal en el 67% de las muestras al calcular el Índice de Link o de IgG.

Aunque los estudios de la evaluación cualitativa de la síntesis intratecal a partir de los diferentes índices son muy diferentes, unos aseguran que se pueden detectar hasta un 92% de los pacientes (24), mientras que otros sólo el 70% (25). En nuestros resultados, se muestra alterado este índice en el 60% de las muestras del grupo IIa y en el 67% del grupo IIb. Por estas razones no podemos afirmar si este es el mejor resultado que podríamos tener, ya que puede ser necesario establecer los rangos normales para estos índices propios del laboratorio donde se trabajaron estas muestras. En nuestro estudio tomamos como valor límite mayor para el índice de Link 0.65, el cual es un valor recomendado por la literatura consultada (26). Encontramos que un 24% de los pacientes del grupo I presenta síntesis intratecal de inmunoglobulinas.

Podemos graficar los valores de las cadenas ligeras kappa libres V_s el cociente de albúmina y observar como se distribuyen los diferentes grupos al trazar dos líneas de corte sobre los valores límites, este es el principio del reibergrama el cual utiliza una curva hiperbólica para ubicar los valores obtenidos de una muestra, brindando con una simple observación sobre la gráfica datos del estado intratecal del individuo, y del estado de la barrera hematoencefálica.

En cuanto a la evaluación del patrón de citocinas pro y antiinflamatorias, aunque es ampliamente conocido que en los pacientes que padecen de EM se desencadena una reacción inmunológica de tipo celular en la cual es de esperar encontrar presente diferentes patrones de citocinas, las mismas no fueron detectadas por los métodos de ELISA utilizados en este estudio, posiblemente por la naturaleza propia de estas moléculas o por la sensibilidad de la técnica usada.

Las citocinas son secretadas localmente, se encuentran libres a concentraciones muy bajas, y poseen una vida media corta ya que son metabolizadas rápidamente por las células circundantes (22), razones por las cuales es necesario utilizar métodos más sensibles como la citometría de flujo que nos permite medir la concentración intracelular de citocinas, antes de ser secretadas y metabolizadas. El inconveniente de esta técnica es la necesidad de equipo especializado, tales como un citómetro de flujo, los equipos necesarios para realizar cultivo celular, además de muestras de LCR frescas con células viables, por lo tanto puede ser considerado para estudios, pero no es una técnica conveniente para el diagnóstico y monitoreo oportuno, especialmente cuando no es posible analizar inmediatamente las muestras o los pacientes son provenientes de otros países como ocurre en este caso.

En cuanto al sIL-2R, se ha establecido su utilización como marcador de la activación de las células T autoreactivas, por lo tanto se encontrará aumentado en cualquier enfermedad en la cual se desencadene una respuesta inmune de tipo celular. Múltiples estudios han informado de presencia de concentraciones aumentadas de este receptor en LCR de pacientes con EM, especialmente en aquellos que se

pacientes con la presentación clínica de remisión-exacerbación y después de un periodo de exacerbación (23).

En nuestro estudio obtuvimos una diferencia estadísticamente significativa entre los valores del sIL-2R de los grupos I y II. Se observó que un 41% de las muestras del grupo II poseen concentraciones anormalmente altas de este receptor, queda pendiente para próximos estudios correlacionar estos datos con el estadio clínico de la enfermedad al momento de tomar la muestra. Además es preciso determinar si del 10.7% de las muestras que presentaron valores anormalmente altos del sIL-2R en el grupo I, se pudieran asociar a la existencia de otra enfermedad inflamatoria diferente a la EM.

Para determinar concentraciones esperadas en los LCR normales calculamos un intervalo de referencia con las muestras trabajadas. Sin embargo para que estos puedan ser usados en la práctica clínica hay que aumentar el grupo I hasta 120 muestras, por lo que los límites de referencia utilizados en este estudio deben ser confirmados aumentando el número de muestras.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. CONCLUSIONES

Aunque la presencia de cadenas ligeras kappa libres ha sido descrita desde los años 70, este hecho no ha sido desarrollado por los laboratorios clínicos, esto puede ser debido a la complejidad de la metodología existentes para determinarla. Hoy presentamos un método de fácil adaptación por los laboratorios de diagnóstico clínico, con un costo razonable, y sobre todo con un alto porcentaje de sensibilidad y especificidad.

Si bien, no podemos recomendar en este estudio los valores de referencia de esta prueba, podemos afirmar que la presencia de la misma es indicativo de un proceso inflamatorio de tipo humoral dentro del sistema nervioso central, y se presenta en el 92% de los pacientes clínicamente confirmados de esclerosis múltiple, por lo cual constituye una herramienta diagnóstica de gran utilidad. Sumado ha este hecho, podemos evaluar el estado de la barrera hematoencefálica para detectar aquellos casos en los cuales la presencia de la misma sea procedente del plasma debido al daño de la barrera hematoencefálica, por lo que aunque no descarta la esclerosis múltiple, podría ser presuntivo de otra enfermedad inflamatoria.

Por otro lado, podemos concluir que la técnica de ELISA utilizada no es recomendada para medir citocinas como: IL-10, INF- α y TNF- γ en LCR por razones ya discutidas. Sin embargo, esta técnica ha resultado muy buena para determinar la concentración del sIL-2R en el Líquido Cefalorraquídeo, por lo cual hemos podido evaluar de forma indirecta, el estado de activación celular de por parte de los linfocitos T de nuestras muestras.

RECOMENDACIONES

No es nuestro objetivo, ni consideramos recomendable, dejar de realizar la prueba de Bandas Oligoclonales para el diagnóstico de EM, sin embargo, la realidad de los países Centroamericanos de donde provienen estas muestras, es que no poseen la técnica de isoelectroenfoque (que nos brinda un 96% de sensibilidad) disponibles en sus hospitales por ser una técnica costosa (\$50.00 dólares americanos por paciente si no es necesario repetirla, lo que aumentaría el valor al doble), demorada (4.0 a 4.5 horas para obtener el resultado de 4 pacientes) y requiere de personal entrenado y materiales de uso menos frecuentes en laboratorios automatizados como son la mayoría de los laboratorios clínicos hospitalarios.

Si realizamos una evaluación de tipo cuantitativa automatizada de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas tenemos que el solo medir la cadena ligera kappa libre de los anticuerpos nos brinda una sensibilidad del 94%, con un tiempo estimado de respuesta de una hora por el laboratorio, no necesita la muestra sérica (por la característica de la molécula anteriormente discutida), su valor es considerablemente más bajo (\$8.00 dólares americanos) y sobre todo, se realiza con un nefelómetro automatizado, los cuales están fácilmente disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos de hospitales y centros de servicio de salud.

Además, si queremos evaluar el estado de la barrera hematoencefálica y la síntesis intratecal por IgG tendríamos que medir en LCR y suero la concentración de Albúmina y de Inmunoglobulina G, lo que nos aumentaría el valor \$6.00 dólares

americanos más, estaríamos utilizando el mismo equipo, la misma muestra y por lo tanto el tiempo de respuesta sería el mismo. Por lo tanto nosotros recomendamos realizar un perfil de estudio de LCR que incluya la evaluación del cociente de albúmina, el índice de Link y la CLk libre, lo cual no costará más de \$15.00 dólares por paciente, un treinta por ciento del valor de la determinación de BO por IEE.

No podemos dejar de mencionar las implicaciones que podría tener conocer el valor de las cadenas ligeras kappa libres y correlacionarlo con el estado de la enfermedad, por que como ya vimos estas tienen la capacidad de activar las células mastoides y desencadenar una respuesta inflamatoria intensa, por lo cual podría ser una prueba de seguimiento y monitoreo de la enfermedad, pero para esto se debe correlacionar el estado clínico de los pacientes con el valor de la concentración de este metabolito. Otro marcador de monitoreo de pronosis y tratamiento lo constituye el receptor soluble de la IL-2, el cual se viene estudiando hace mucho tiempo, con resultados un poco conflictivos debido a la técnica. Nosotros consideramos que el kit utilizado para determinarlo funcionó muy bien cuando se utiliza sin diluir el líquido, recordemos que este kit fue diseñado para suero y no LCR por lo cual aconseja diluirlo para evitar fenómenos de prozona. Por lo tanto recomendamos fuertemente realizar un estudio con muestras de LCR de pacientes negativos para esclerosis múltiple y otras enfermedades inflamatorias del SNC para establecer los valores de referencia de este analito el cual nos brinda información del estado de activación de la inmunidad celular, causante del mayor daño sobre la mielina del SNC.

VII. BIBLIOGRAFIA

Citas Bibliográficas

1. Bar-Or A, Oliveira E, Anderson D, Hafler D. **Molecular pathogenesis of multiple sclerosis.** *Journal of Neuroimmunology* 1999;100: 252-259.
2. Ministerio de Salud, Caja de Seguro Social e ICGES) y privadas (Centro Médico Paitilla, Clínica Hospital San Fernando, Clínica Hospital Mae Lewis y Clínica Hospital Dr. Venancio Villarreal. **Estudio Colaborativo de Esclerosis Múltiple en Panamá y Centroamérica. 2000-2006.**
3. Prat A, Biernacki K, Antel J. **Th1 and Th2 lymphocyte migration across the human BBB is specifically regulated by interferon β and copolymer-1.** *Journal of Autoimmunity* 2005; 25: 119-124.
4. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. **Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis.** *Annals of Neurology.* 2001;50(1):121-127.
5. Joy J, Johnston R. **Multiple Sclerosis: Current Status and Strategies for the Future.** Board on Neuroscience and Behavioral Health. 2001 <http://www.nap.edu/catalog/10031.html>
6. R. Goldsby, T. Kindt, B Osborne, J. Kuby. **Inmunología.** V Ed. Mc Graw Hill, México. 2004
7. Duran I, Martínez EM, Brieva L, Tintoré M. **Similar Pro and Anti-Inflammatory Cytokine Production in the Different Clinical Forms of Multiple Sclerosis.** *Multiple Sclerosis* 2001;7:151-156
8. Eikelenboom M, Killestein J, Uitdehaag B, Polman C. **Sex Differences in Proinflammatory Cytokine Profiles of Progressive Patients in Multiple Sclerosis.** *Multiple Sclerosis* 2005;1:520-523
9. Crucian B, Dunne, Friedman H, Ragsdale R, Widen R. **Alterations in Peripheral Blood Mononuclear Cell Cytokine Production in Response to Phytohemagglutinin in Multiple Sclerosis Patients.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1995;Nov:766-769

10. Frohman E, Filippi M, Stuve O, Waxman S, Corboy J, Phillips J, Lucchinetti C. **Characterizing the Mechanisms of Progression in Multiple Sclerosis Evidence and New Hypotheses for Future Directions.** ArchNeurol.2005; 62: 1345-1356.
11. Adikari S, Pettersson A, Soderstrom M, Huang Y-M. **Interleukin-10-Modulated Immature Dendritic Cells Control the Proinflammatory Environment in Multiple Sclerosis.** Scandinavian Journal of Immunology 2004;59: 600-606
12. Sharief M, Thompson E. **Correlation of interleukin-2 and solubleinterleukin-2 receptor with clinical activity of multiple sclerosis.** J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1993; 56: 169-174
13. Reiber C, Menegus M, Rudick R. **Free Light Chains in Multiple Sclerosis and Infections of the CNS.** Neurology 1987;37:1334-8
14. Dorta C, García N, García E et al. **Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y síntesis intratecal de inmunoglobulinas.** Bases moleculares de la Neuroinmunología Revista Cubana de Pediatría 2005; 77:3-4
15. Fischer C, Arnet B, Koehler J, Lotz J, Lackner K. **Kappa Free Light Chains in Cerebrospinal Fluid as Markers of Intrathecal Immunoglobulin Synthesis.** Clinical Chemistry 2004;50,10:1809-1813
16. Keir G, et al. **Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: An annotated update.** Ann . Clin . Biochem 1990;27:436-443.
17. A. Abbas, A. Lichtman, J. Pober. **Inmunología Celular y Molecular.** IV Ed. Mc Graw Hil, España. 2002
18. Redegeld F, Van Der Heijden M, Kool M, Heijdra B, Garssen J, Kraneveld A, Van Loveren H, Nijkamp F. **Immunoglobulin-free light chains elicit immediate hypersensitivity-like responses.** Publicación online: 17 June 2002, doi:10.1038/nm722
19. Röcken M, Hültner L. **Heavy function for light chain.** Nature Medicine 2002; 8,7:694-701
20. Goffette S, Schulep M, Kuprez T, Sindic C. **Detection of oligoclonal free kappa chain in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected of multiple sclerosis.** J Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2004;75: 308-310
21. Rinker J, Trinkaus K, Cross A. **Elevated CSF free kappa light chain correlate with disability prognosis in multiple sclerosis.** Neurology 2006;67:1288-1290.

22. Oè Zenci, Kouwenhoven M, Huang Y, Kivisa K, Link H. **Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis.** Clin Exp Immunol 2000; 120:147-153
23. Sivieri S, Ferrarini A, Gallo P. **Multiple Sclerosis: IL-2 and sIL-2R levels in cerebrospinal fluid and serum.** Review of literature and critical analysis of ELISA pitfalls. Multiple Sclerosis 1998; 4:7-11
24. Blennow K, Fredman P, Svennerhdm L. **Formulas for the quantitation of intrathecal IgG production.** Journal of the Neurological Sciences 1994;121:90-96
25. Link H, Huang Y. **Oligoclonal bands en Multiple Sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness.** Neuroimmunology 2006; 180(1-2):17-28
26. Oehniger C. **Análisis Inmunoproteicos del Líquido Cefalorraquideo/suero-Albúmina e Inmunoglobulinas en la Esclerosis Múltiple. Valor Diagnóstico.** Arch Inst, Neurol 2003;6 (1)
27. Dorta A, García E, Padilla B. **Bases moleculares de la Neuroinmunología (II). El reibergrama y su uso en Neuroinmunología.** Rev Cubana Pediatr 2005; 77:3-4

Bibliografía Consultada:

1. Allal, C. Ghaffor, M., Immunoenzymatic determination of free immunoglobulin light chain in the cerebrospinal fluid: its value in the biological diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Inst Pasteur Alger.* 1989;57:111-24
2. Bakhiet M, Ozenci V, Link H. **A New Cell Enzyme-Kinked Immunosorbent Assay Demonstrates Gamma Interferon Suppression by Beta Interferon in Multiple Sclerosis.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999;415-419
3. . Dorta A, García E, Padilla B. **Bases moleculares de la Neuroinmunología (I). Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y síntesis intratecal de inmunoglobulinas** *Rev Cubana Pediatr* 2005; 77:3-4
4. Keir G. **Isoelectric Focusing of cerebrospinal fluid Immunoglobulin G: An annotated update.** *Ann Clin Biochem* 1990;27:436-443
5. Howard L, Weiner, Dennis J. Selkoe. . **Review article: Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases.** *Nature* 2002; 420: 879-884
6. Martino G, Poliani P. **El significado patogénico de la esclerosis múltiple.** *Rev Neurol* 2000;30(12):1213-1217
7. Oehninger, C. Buzó R. **Utilidad de los marcadores biológicos en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con esclerosis múltiple. Test de los 5 humores.** Instituto de Neurología. Hospital de Clínicas. Montevideo. Uruguay.
8. Sindic, C., Laterre, E. **Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases . An immunoaffinity blot study.** *J. Neuroimmunol.* 1991;33(1):63-72

VIII. ANEXOS

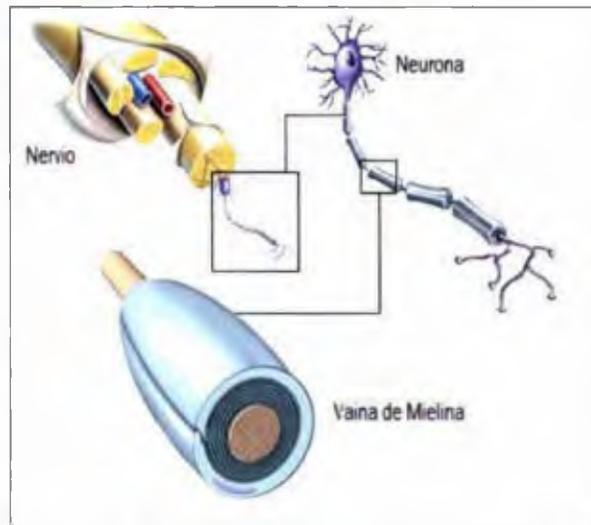
AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

- *Dr Juan Miguel Pascale: por toda la confianza depositada en mi, sus buenos consejos y su dirección siempre acertada.*
- *Licda Dalis Mojica: por toda su cooperación al facilitarnos los resultados de Bandas Oligoclonales y su apoyo de siempre.*
- *Dr. Blas Armien: por su dedicación en los análisis estadísticos de este estudio.*
- *Lcda. Fátima Vargas: por permitirme usar los equipos de la sección de inmunología del CHMDrAAM, y por su apoyo y guía desinteresada.*
- *Lcdo. Juan González: por todo el tiempo concedido para poder realizar estas pruebas, sus buenos consejos, y su gran amistad.*
- *Lcda. Yaneth de González: por su apoyo técnico para el procesamiento de las muestras en el Hospital de Especialidades Pediátricas*
- *SENACYT: por el financiamiento de este proyecto*
- *A mis familiares y amigos que siempre estuvieron incentivandme a culminar esta etapa de mi vida, A todos ellos Muchas Gracias...*

de lesiones inflamatorias a lo largo de la vaina de mielina de las fibras nerviosas. Como la mielina actúa a manera de aislamiento de las fibras nerviosas, la desintegración de la vaina causa numerosas disfunciones neurológicas. (6)

Fig.1 Formación de Múltiples Cicatrices en la Vaina de Mielina



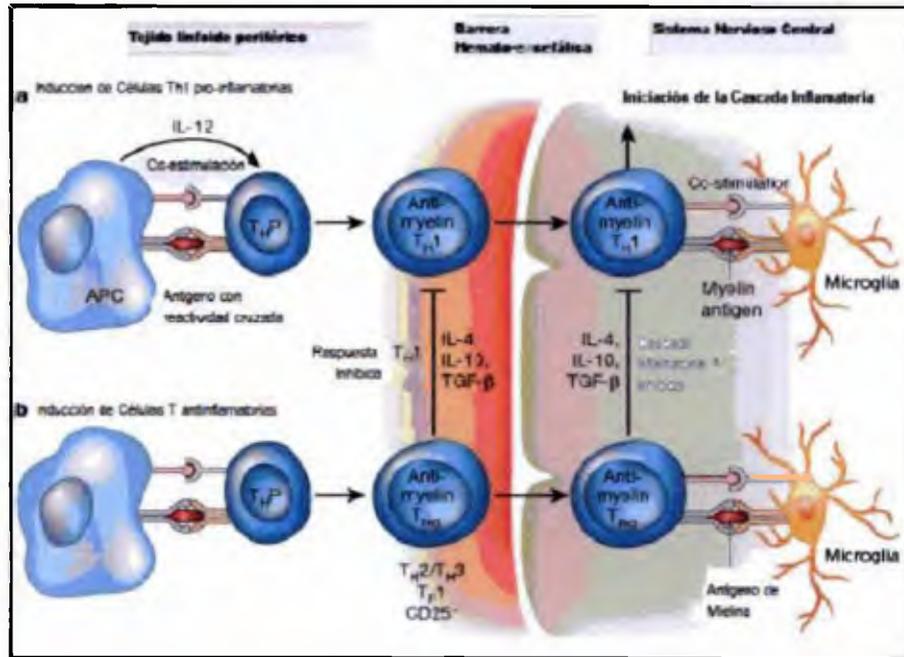
Fuente: Nucleus Communications. 2005

3. INMUNOPATOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM es una enfermedad inflamatoria del SNC caracterizada por: la desmielinización de la sustancia blanca, infiltrados de células T y macrófagos que conducen a un daño axonal y pérdida de la función neurológica. La teoría actual propone que por un mecanismo desconocido, se produciría una pérdida de la tolerancia frente a determinados autoantígenos, lo que daría lugar a la activación de clones autoreactivos de linfocitos T que a través de un proceso de adhesión al endotelio y penetración a través del mismo al interior del SNC desencadenaría una

Interleuquina-2 (IL-2), son producidas por las células T colaboradoras de tipo 1 o Th1 (de sus siglas en inglés o T helper cell). Existe otro tipo de citocinas, las citocinas antiinflamatorias producidas por las células T colaboradoras de tipo 2 o Th2 como las Interleucinas-4 (IL-4) o la Interleucina-10 (IL-10). Se hipotetiza que un desbalance entre estos tipos de citocinas es la principal causa de estas y otras enfermedades autoinmunes. (8)

Fig. 2. Mecanismo de Inflamación y Respuesta Inmune en la Esclerosis Múltiple

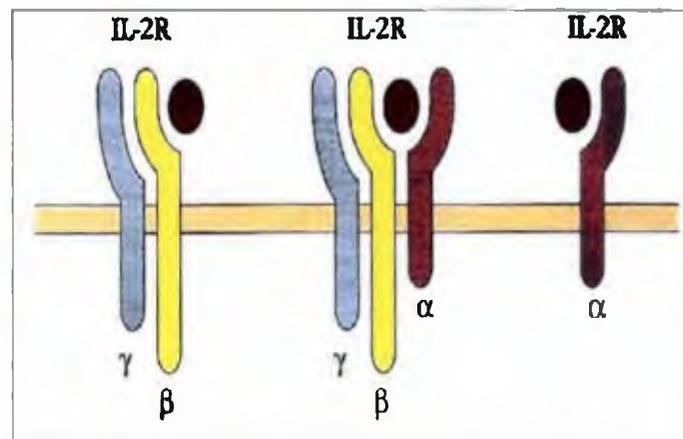


Fuente: Nature 2002, December. 420, 879-884

En modelos animales las citocinas proinflamatorias secretadas por las células Th1 activas producen la migración de estas células desde la periferia hacia el SNC donde participan en la desmielinización y en la patología asociada a la Enfermedad

y se considera una evidencia indirecta de activación de células T. La función del receptor soluble no se comprende en su totalidad. Los datos apuntan a que sIL-2R e IL-2R compiten por la IL-2, de modo que IL-2R regula la acción biológica de esta citocina sobre el linfocito. Entre las principales acciones de la IL-2 tenemos que estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, B y NK

Fig 3. Estructura del Receptor de IL-2

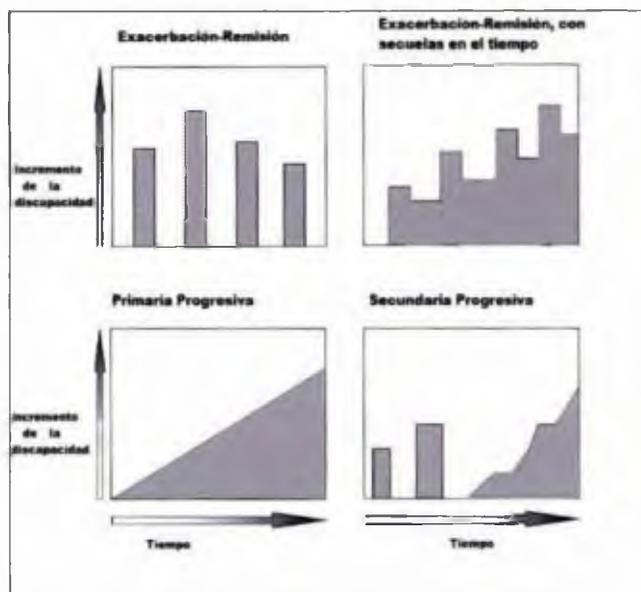


Fuente: Inmunología. R. Goldsby, J.Kuby, T. Kind
V Edición, Mc Graw Hill. 2004.

El receptor soluble de la interleucina-2 (sIL-2R) se genera a partir de una ruptura proteolítica de la subunidad alfa. El sIL-2R se libera proporcionalmente a la expresión del receptor de membrana y se considera una evidencia indirecta de activación de células T. La función del receptor soluble no se comprende en su totalidad. Los datos apuntan a que sIL-2R e IL-2R compiten por la IL-2, de modo que IL-2R regula la acción biológica de esta citocina sobre el linfocito. Entre las

(afectación del sistema motor), pérdida de coordinación (afectación del sistema cerebelar). Tempranamente en el proceso de enfermedad de EM, las recaídas

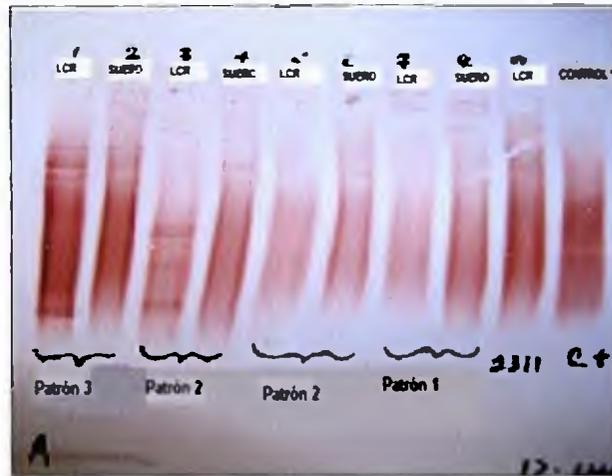
Fig. 4. Tipo de Esclerosis Múltiple y Grado de Discapacidad.



Fuente: Adaptada de Lublin and Reingold. 1996. (5)

parecen involucrar anomalías del sistema sensorial, motor, cerebelar y visual. Posteriormente en este proceso involucran la vejiga, el intestino y la función sexual. Los ataques de la enfermedad aguda son el rasgo característico del subtipo Recaída-Remisión de EM. Sin embargo las recaídas también ocurren en pacientes con el subtipo de EM Recaída Progresiva y en varios pacientes con el subtipo de EM Progresiva Secundaria. En el único subtipo que jamás se presenta las recaídas es en la EM Primaria Progresiva.

Fig 5. Corrida de Isoelectroenfoque de muestras pareadas de LCR y suero



Fuente: Proporcionado por el Dpto. Genómica y Proteómica del ICGES. Lcda. Dalis Mojica

Cuando los patrones encontrados en el LCR y el suero son diferentes, y hay más bandas en LCR que en suero, es sugestivo de una patología que involucra el SNC. Sin embargo, hay que tomar muy en cuenta que aproximadamente el 2-3% de los pacientes con EM clínicamente confirmados no muestran evidencia de BO en el LCR. (16)

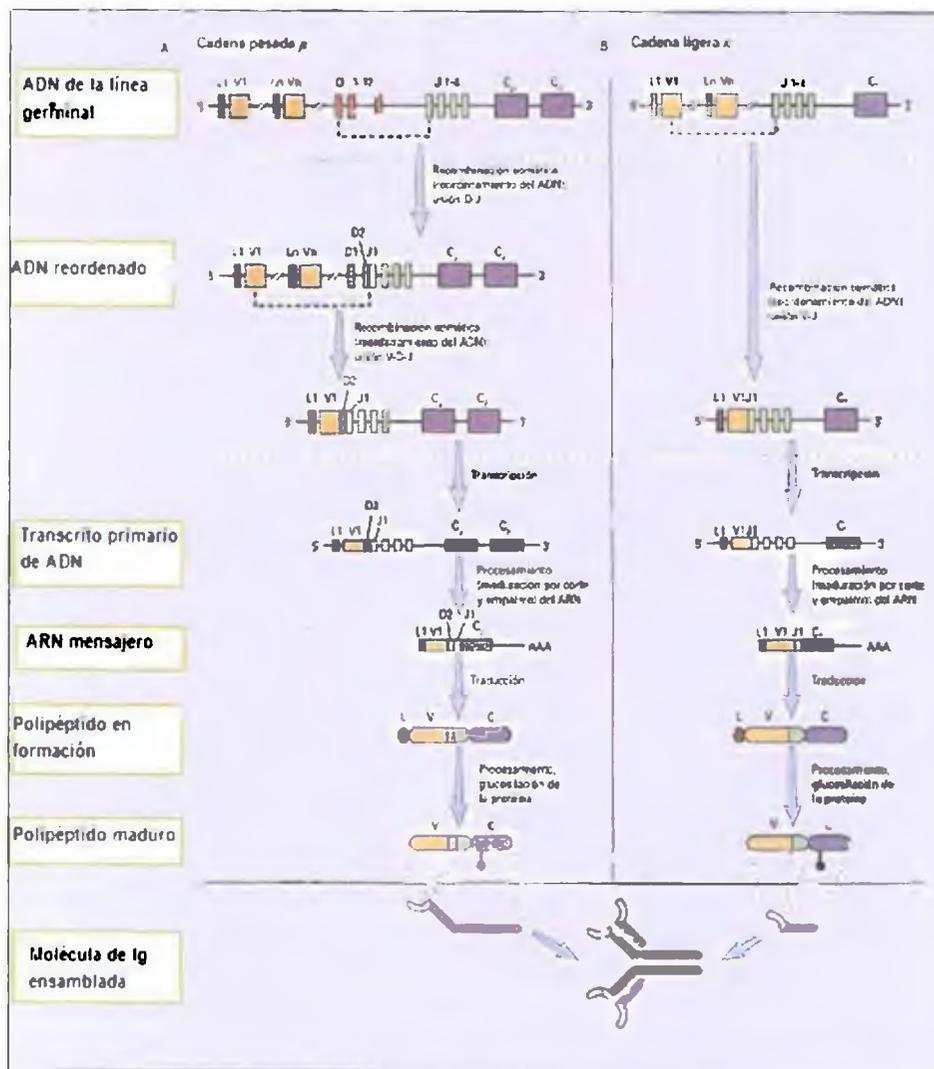
5.3.2 Cadenas Ligeras Kappa y Lambda:

Como ya se mencionó la síntesis de inmunoglobulinas intratecales es comúnmente observada en desordenes inflamatorios del SNC y otras enfermedades de origen autoinmune, y ha sido demostrado a través del tiempo su alto valor diagnóstico. Pequeñas cantidades de inmunoglobulinas entran al LCR por difusión

cadena ligera unida al mastocito, ocasiona la liberación de los mediadores, los cuales ocasionarán finalmente la migración de células T efectoras (fig. 7). (19)

Las células T liberan interferón que activa a los mastocitos ocasionando inflamación local, similar a la que ocurre en las respuestas de hipersensibilidad retardada, en la cual se puede ocasionar un intenso daño local.

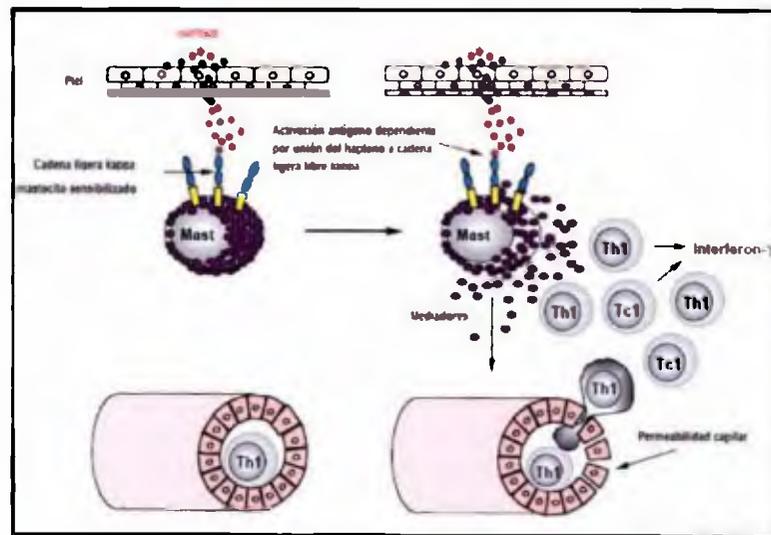
Fig.6 Recombinación y Expresión De Los Genes De Las Cadenas Pesadas y Ligeras De Las Inmunoglobulinas



Fuente: Inmunología Celular y Molecular. A. Abbas, A. Lichtman. IV Ed. Mc Graw Hill. 2000

Los nuevos datos demuestran que las cadenas ligeras κ pueden pasar al espacio intercelular y unirse a una proteína de 45 kD de la membrana de los mastocitos. Se ha comprobado la importancia de la sensibilización de los mastocitos por la cadena ligera κ unida específicamente a un antígeno para la degranulación de los mismos y para la inducción del edema. La neutralización funcional de la cadena ligera κ inhibe tanto la formación del edema temprano, como la respuesta de hipersensibilidad retardada.

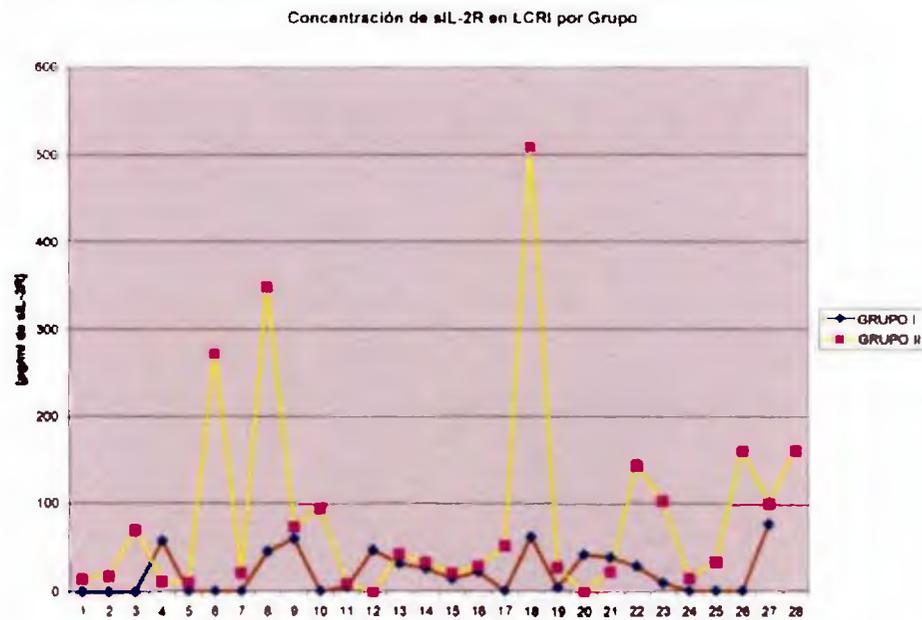
Fig. 7. Inducción De Enema Causada Por Las Cadenas Ligeras Kappa libres Tras La Degranulación De Los Mastocitos



Fuente: Röcken M, Hültner L. Heavy function for light chain. Nature Medicine 2002.

Se estableció una diferencia significativa para el sIL-2R entre los grupos I y II establecida por la prueba de Kruskal Wallis encontrando para la misma un valor $p=0.0028$.

Gráfica 1: Concentración del sIL-2R en pg/ml del LCR por Grupo



Fuente: Datos primarios obtenidos ELISA para detectar sIL-2R

Intervalos de Referencia calculados:

$$\text{Límite superior} = X + 2SD = 9.10 + 49.6 = 58.7 \text{ pg/ml}$$

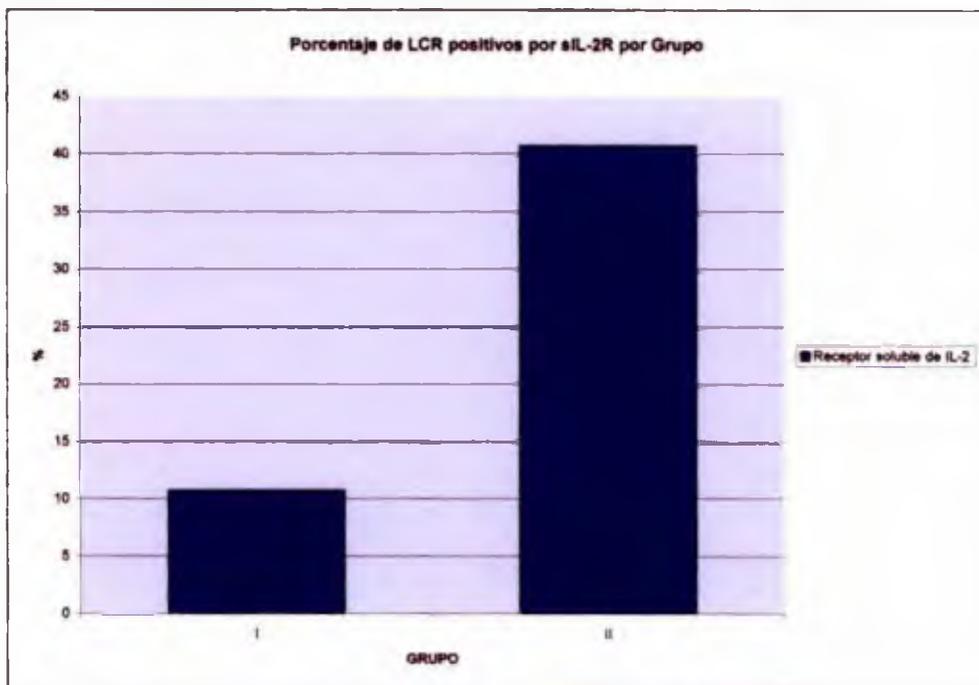
$$\text{Límite inferior} = x - 2SD = 9.10 - 49.6 = 0.0 \text{ pg/ml}$$

*****Intervalos de referencia= 0.0-58.7pg/ml**

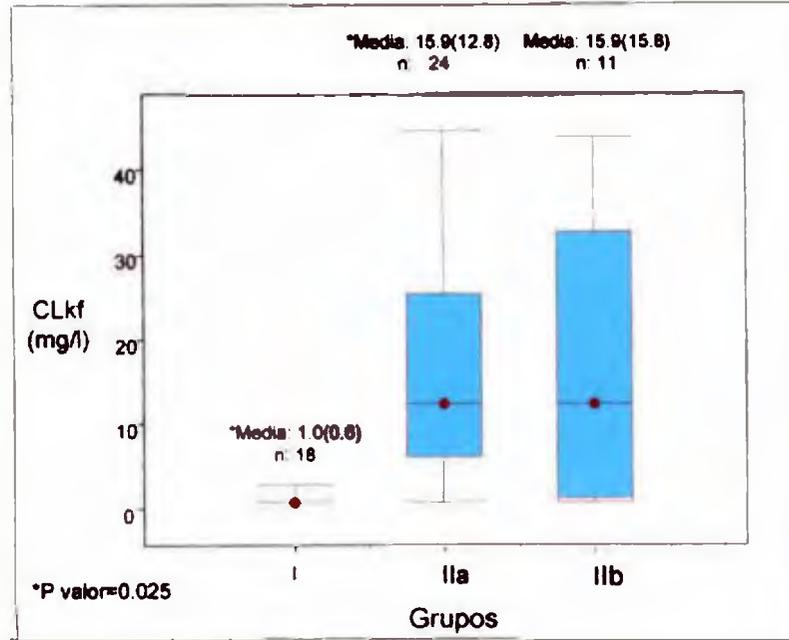
Encontrando un 10.7% de las muestras (3 muestras) del grupo I por encima de esta valor, mientras que para el grupo II fueron el 41% de las mismas (11 muestras) gráfica N°2

*** Para establecer los valores de referencia de un analito es necesario trabajar un mínimo de 120 muestras normales. Ver discusión .

Gráfica N°2. Porcentaje de LCR con valores Positivos para el sIL-2R por Grupo

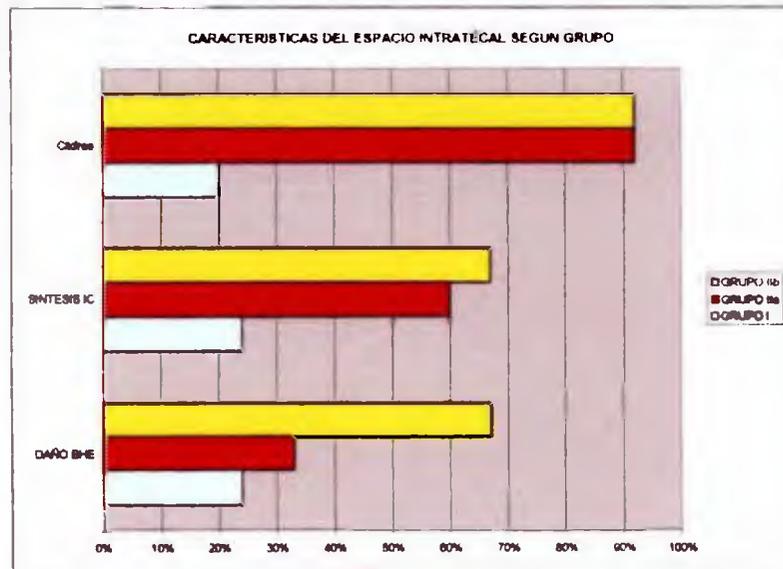


Gráfica 3. Boxplot de Concentraciones de CLk libre en LCR por Grupo



Fuente: datos primarios obtenidos por nefelometría

Gráfica 4. Características del espacio intratecal según grupo

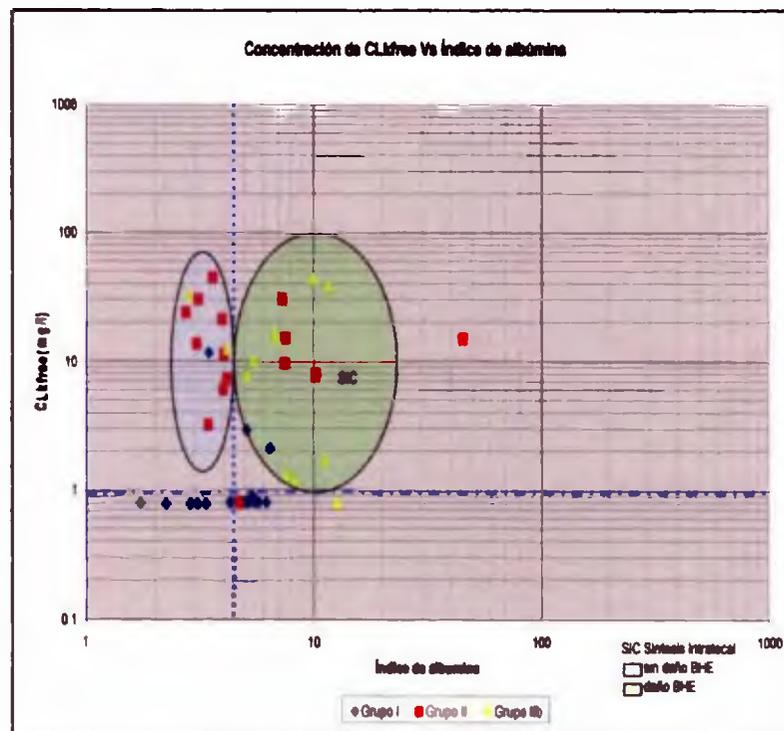


Fuente: Datos primarios obtenidos en el presente estudio

1.2.1 Relación entre la presencia de CLk libre en LCR y el Índice de Albúmina:

Si comparamos los tres subgrupos de pacientes en relación a la presencia de cadenas libres y el estado de la barrera hematoencefalica podemos diferenciar según sus características estos grupos en una gráfica doble log. Gráfica N°6.

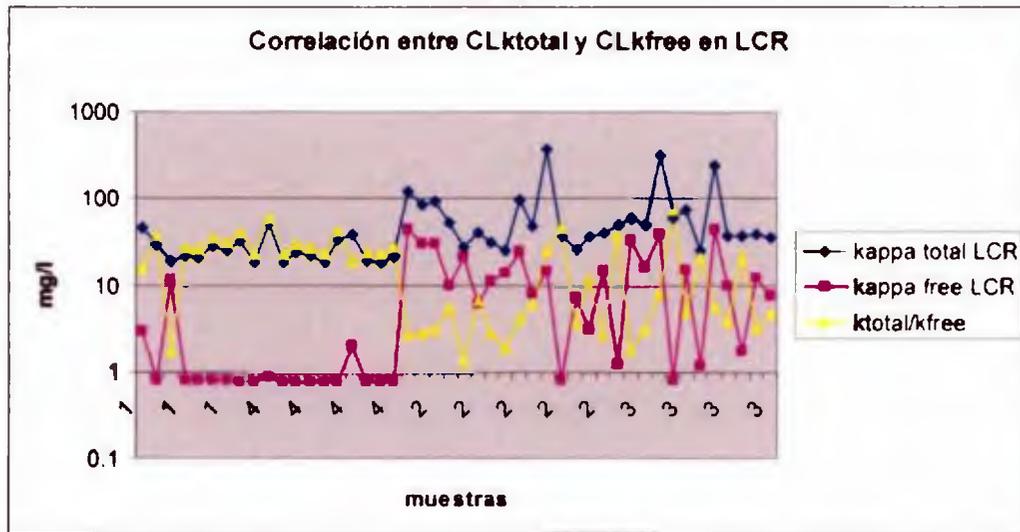
Gráfica 5. Concentración de CLk libre en LCR Vs el Índice de Albúmina



1.2.2 Evaluación de la presencia de CLk libre en LCR como valor diagnóstico:

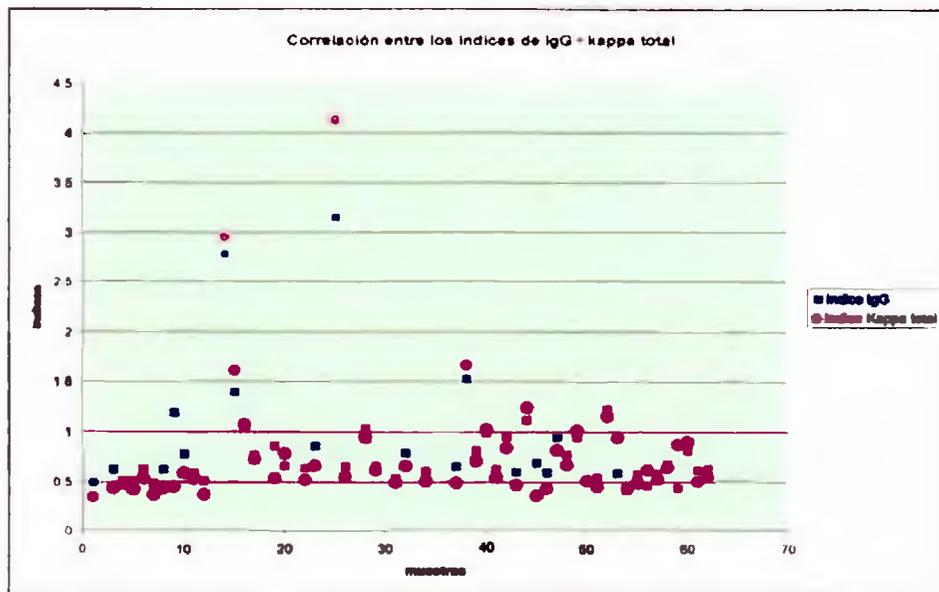
Se comparó el valor diagnóstico de la presencia de CLkfree en LCR versus el resultado de Bandas oligoclonales por IEE (método de referencia).

Gráfico 6. Correlación entre los valores de CLk total y CLk libre en LCR según grupos.



Fuente: Datos primarios obtenidos por nefelometría.

Gráfico 7. Correlación entre los Cocientes de IgG y CLk total



Fuente: Datos primarios obtenidos en este estudio

ANEXO I**Tamaño de la muestra para el estudio según
el nivel de confianza**

Nivel de Confianza (%)	Número de muestra
80.00	6
90.00	9
95.00	13
99.00	32
99.90	32
99.99	41

Fuente: Cálculos realizados por STAT cal para obtener el número de muestras al azar en estudios descriptivos.

ANEXO 2
ILUSTRACIONES

Nefelómetro Image-Beckman Coulter CHMAAM-Sección de Inmunología

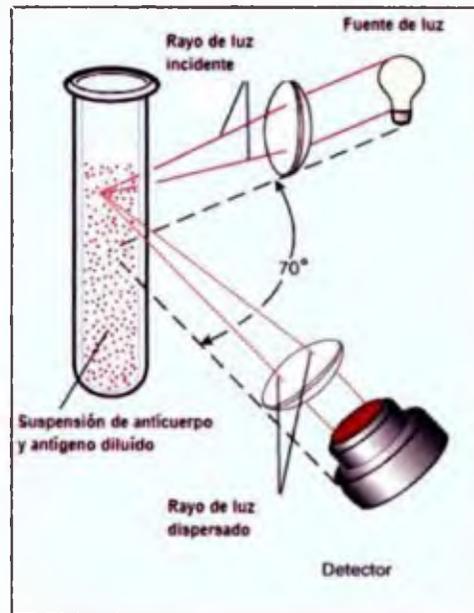


Imagen 1. Principio del Nefelómetro



Imagen 2. Vista frontal del Nefelómetro Image/Beckman Coulter

Nefelómetro Image-Beckman Coulter CHMAAM-Sección de Inmunología



Imagen 3. Pantalla de programación de muestras/selección de tipo de muestra



Imagen 4. Reactivos de Inmunoglobulinas y Albúmina

**Nefelómetro Image-Beckman Coulter
CHMAAM-Sección de Inmunología**



Imagen 5. Carrusel de muestra.



Imagen 5.1 Gradilla de muestra



Imagen 5.2 Posillos de dilución

Nefelómetro Hitachi 912
Hospital de Especialidades Pediátricas



Imagen 6. Hitachi 912. Roche



Imagen 7. Reactivo para medir Cadena Ligera Kappa Libre de binding site.

Medición de Concentración de Citoquinas por ELISA

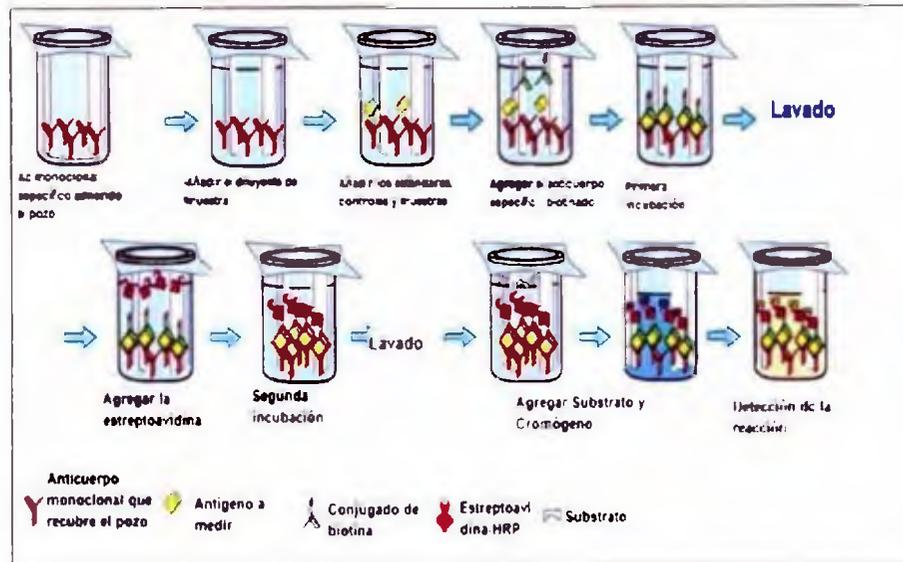


Imagen 8. Principio de la técnica de ELISA empleada



Imagen 9. Kits de ELISA para la determinación de citoquinas

Medición de Concentración de Citoquinas por ELISA

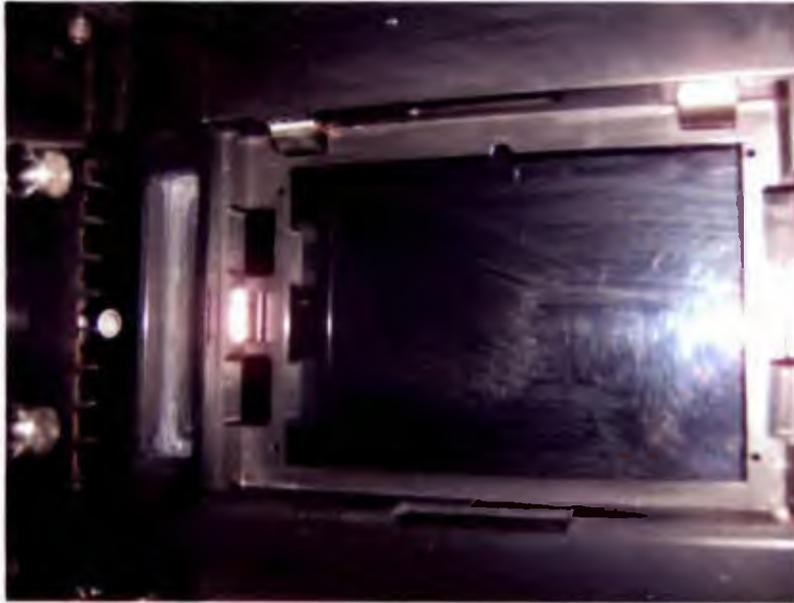


Imagen 10. Lavador de placa de ELISA

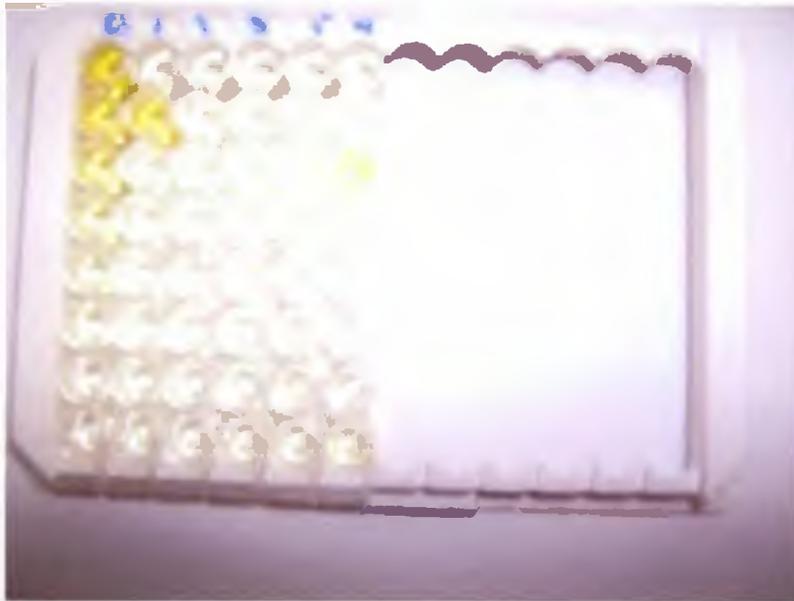


Imagen 11. Placa de ELISA con los resultados del sIL-2R lista para ser leída en el espectrofotómetro