



RESUMEN

Con este trabajo se pretende realizar la cuantificación de Inmunoglobulina A en suero sanguíneo de niños en edad escolar, comparando dos métodos de análisis: la Inmunodifusión Radial (IDR) y Elisa Cuantitativo Indirecto. Para esta valoración se recurre a niños de la escuela Nicolás Sójos, con un estado de salud aparentemente bueno, en edades comprendidas entre los 6 y 12 años y cuya condición socio-económica es media baja.

Para la cuantificación de IgA se procedió a tomar 40 muestras de suero sanguíneo de esos niños, obtenidas asépticamente en tubos al vacío con agujas vacutainer, para luego ser centrifugadas y congeladas a -20°C máximo 2 horas después de su recolección hasta su análisis.

Luego de obtenidas las muestras de suero se procedió a realizar la cuantificación de IgA por ambos métodos de análisis, comenzando por la Inmunodifusión Radial y luego mediante el Elisa Cuantitativo Indirecto, siguiendo todas las condiciones y protocolos de trabajo indicados para cada técnica.



Con las concentraciones de Inmunoglobulina A obtenidas de todas las muestras por ambos métodos de ensayo, se procedió a realizar un análisis estadístico T para muestras emparejadas, y según el resultado obtenido de prueba se procederá a aceptar o rechazar la hipótesis planteada.

Así, los resultados finales obtenidos en este trabajo demuestran que, “no existen diferencias estadísticamente significativas entre un método y otro” por lo tanto se podrá aplicar cualquiera de los dos métodos de análisis para la cuantificación de inmunoglobulina A en suero sanguíneo, sin que haya duda de que ambos nos den resultados seguros y confiables.

Palabras clave: Inmunidad, Inmunoglobulina A, Inmunodifusión Radial, Elisa Cuantitativo Indirecto, Suero Sanguíneo, Prueba T student.

ÍNDICE

	Pág.
Introducción	10
CAPÍTULO I: GENERALIDADES SOBRE LA INMUNIDAD	
1- Inmunidad.....	11



2- Respuesta inmune.....	12
3- Sistema inmune y enfermedad.....	12
4- Clases de inmunidad.....	13
4.1- Inmunidad natural.....	14
4.2- Inmunidad adquirida o específica.....	18
5- Anticuerpos o Inmunoglobulinas.....	24
5.1- Definición.....	24
5.2- Estructura de las inmunoglobulinas.....	25
5.3- Expresión de los genes y formación de las inmunoglobulinas.....	29
5.4- Función de las inmunoglobulinas.....	33
5.5- Distribución de las inmunoglobulinas.....	34
5.6- Clases de inmunoglobulinas (Igs).....	35

CAPÍTULO II: INMUNOGLOBULINA A

6- Características.....	41
6.1- Estructura.....	42
6.2- Funciones.....	43
6.3- Localización.....	45
6.4- Transporte.....	45
6.5- Clases de Inmunoglobulina A.....	46
6.6- Propiedades efectivas de la inmunoglobulina A.....	47



6.7- Inmunidad mucosa mediada por inmunoglobulina	
A.....	47
6.8- Inducción de las respuestas inmunitarias en las mucosas.....	48
6.9- Producción de Inmunoglobulina	
A.....	49
6.10- Patologías más comunes relacionadas con alteración de la concentración de IgA.....	51
6.11- Enfermedades más frecuentes relacionadas con alteración en la concentración de Inmunoglobulina A en niños.....	59
6.12- Otras patologías relacionadas con el aumento o disminución de IgA.....	60
6.13- Valores referenciales de inmunoglobulina A en suero y otros fluidos corporales en g/dl.....	61

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

7- Muestra.....	64
8- Tamaño de la muestra.....	64
9- Métodos de ensayo.....	64
9.1- Inmunodifusión Radial.....	65
9.2- Elisa Cuantitativo Indirecto.....	71



CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10- Análisis de los resultados de las concentraciones de IgA obtenidas en suero sanguíneo mediante Inmunodifusión Radial y Elisa cuantitativo Indirecto.....	84
10.1- Resultados de las concentraciones de IgA obtenidas por los dos métodos.....	84
11.- Análisis estadístico.....	92
11.1- Análisis estadístico de los resultados de las concentraciones de IgA obtenidas mediante Inmunodifusión Radial y Elisa Cuantitativo Indirecto.....	93

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

12.- Conclusiones.....	98
13.- Recomendaciones.....	101
ANEXOS.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	113



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

“DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA A EN SUERO SANGUÍNEO POR LOS MÉTODOS DE
INMUNODIFUSIÓN RADIAL Y ELISA CUANTITATIVO INDIRECTO EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR”



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA A EN SUERO
SANGUÍNEO POR LOS MÉTODOS DE INMUNODIFUSIÓN
RADIAL Y ELISA CUANTITATIVO INDIRECTO EN NIÑOS
DE EDAD ESCOLAR”**

**Tesis previa a la obtención del título de
BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

AUTOR:

DIEGO BENEANULA BERMEO

DIRECTORA:

Dra. DIANA ASTUDILLO NEIRA

CUENCA – ECUADOR

2010



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi Directora de Tesis la Dra. Diana Astudillo Neira, por haberme apoyado en la realización de esta tesis, brindándome todos sus conocimientos desinteresadamente, importantes para sacar adelante la misma.

Agradezco a la Dra. Normita Cedillo por haberme acompañado durante toda la realización de la práctica y por brindarme los recursos necesarios y sus valiosos conocimientos.

También quiero hacer un agradecimiento especial al Bioquímico- Farmacéutico Boris Cuesta, mi gran amigo, por haberme ayudado en la parte estadística de esta tesis.

Por último quiero agradecer a todos mis profesores, que me supieron dar todos sus conocimientos y consejos en las aulas, que han servido para mi formación íntegra como profesional.



DEDICATORIA

En primer lugar quiero dedicar esta tesis a Dios, por darme la vida y la sabiduría, imprescindibles para haber podido cursar y culminar con éxitos mis estudios universitarios.

También la quiero dedicar a mis padres que han sido mis guías y mi fuente de inspiración, que con su amor incondicional supieron apoyarme de todas las maneras posibles, para hacer de mí un hombre de bien y por haberme enseñado que todo en la vida se logra con esfuerzo y sacrificio.

Una dedicatoria a una persona muy especial en mi vida, por darme su apoyo incondicional y compañía, Valeria

Por último dedico esta tesis a todos y cada uno de mis compañeros y amigos universitarios, quienes compartieron junto a mí estos seis años, por brindarme su amistad sincera, y por compartir buenos y malos momentos dentro y fuera de las aulas de mi querida Universidad de Cuenca



INTRODUCCIÓN

Gracias a los avances en los últimos años de la ciencia y tecnología, sobre todo en el campo de la Inmunología, se ha permitido el descubrimiento de novedosos procesos involucrados en la respuesta inmune, a la vez la aplicación de estos conocimientos en la detección de nuevas enfermedades y en el avance de técnicas para su diagnóstico. Es importante destacar la determinación de la concentración de inmunoglobulinas, sobre todo la cuantificación de IgA motivo de este estudio, que es útil en la investigación de infecciones recurrentes de Tracto Respiratorio Superior, en niños y en otro tipo de patologías. Así mismo es importante su valoración en niños que sufren desnutriciones severas, que se traduce en una disminución de la respuesta inmunológica, aumentando el riesgo de sufrir enfermedades recurrentes. Se estima que uno de cada 750 individuos es deficiente de inmunoglobulina A, aunque la mayoría son asintomáticos.

Así, hoy en día para la cuantificación de anticuerpos se cuenta con numerosas técnicas, tales como la Inmunodifusión Radial y el Elisa Cuantitativo, los cuales han sido ampliamente estudiados y son utilizados por muchos



laboratorios en diferentes países. Sin embargo estos métodos utilizan principios diferentes, también no comparten el mismo patrón de complejidad en cuanto a condiciones de trabajo, protocolos usados, tiempo que demora el análisis, cantidad de materiales, equipos a ser utilizados y también algo muy importante el acceso económico.

De esta manera se ha realizado la valoración de IgA en suero sanguíneo de niños en edad escolar en condiciones aparentes de buena salud, lo cual podrá dar una idea de las concentraciones de IgA en estos niños, y relacionarlos con las condiciones socio-económicas en las que se encuentran. Además se permitirá hacer una comparación entre estos dos métodos y tener como alternativa para su determinación en los laboratorios clínicos convencionales, sin que haya duda de que ambas nos den resultados seguros y confiables, permitiéndonos escoger cual de estos métodos podrían estar a nuestro alcance y en un período de tiempo adecuado.



CAPÍTULO 1

GENERALIDADES SOBRE LA INMUNIDAD

1- INMUNIDAD

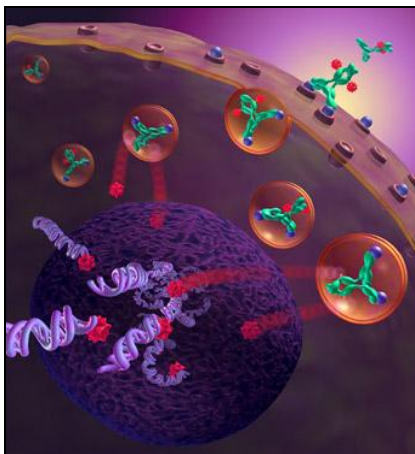


Figura 1: respuesta inmune mediada por anticuerpos (20)

Históricamente inmunidad deriva de la palabra griega *inmunitas*, que se refiere a la exención de diferentes deberes cívicos y procesos legales que se ofrecía a los senadores romanos mientras permanecían en el cargo.

Inmunidad significaba protección frente a la enfermedad, y más específicamente a las enfermedades infecciosas. (1)



2- RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune es un mecanismo de defensa que protege al organismo contra la agresión de diversos microorganismos como: virus, bacterias, hongos y parásitos o cualquier sustancia extraña que ingrese a nuestro organismo. Sin embargo la respuesta inmune no solo se aplica a estos, sino también a que pueden generarse respuestas contra nuestras propias células debido a una alteración en el reconocimiento de las mismas, lo cual lleva a producir enfermedades autoinmunes.(4)(6)

3- SISTEMA INMUNE Y ENFERMEDAD

La comprensión de los mecanismos básicos de la inmunidad han permitido: avanzar en el conocimiento de una serie de enfermedades cuya fisiopatología era hasta hace pocos años oscura, como alergias y las enfermedades autoinmunes; desarrollar nuevos procedimientos y técnicas de diagnóstico; iniciar procedimientos de inmunoterapia para el control de muchas enfermedades; facilitar los trasplantes de órganos, y entender como inmunodeficiencias congénitas o adquiridas dificultan una defensa adecuada contra agentes patógenos.



En la alergia y en las enfermedades autoinmunes la reacción inmunológica se inicia contra agentes no patógenos, o contra tejidos propios del organismo y da lugar a diferentes procesos inflamatorios nocivos.

Así, cuando se produce un desequilibrio o desorden de estos mecanismos que protegen al organismo, da lugar a reacciones múltiples que concluyen en enfermedad. (6)

4- CLASES DE INMUNIDAD

Varias células del sistema inmune y de moléculas producidas por ellas, mantienen una permanente vigilancia para detectar lo extraño, atacarlo, y tratar de destruirlo.

Por medio de un conjunto de mecanismos conocidos como **inmunidad innata** o **natural**, que es inespecífica, es decir se ejerce contra todos los microorganismos patógenos empieza la respuesta inmune. Si no logra controlar al agresor inicia una serie de procesos adicionales conocidos como inmunidad **adquirida** o **específica**, en la cual se produce anticuerpos (inmunidad humoral) o células (inmunidad celular), con capacidad de destruir un agente patógeno



específico aisladamente o con la célula dentro de la cual se ha ocultado. (1)(6)

4.1- INMUNIDAD NATURAL

Cada especie animal es naturalmente resistente a muchos patógenos que encuentra en su medio ambiente sin necesidad que se de un proceso previo de entrenamiento de las células que integran el sistema inmune.

Los individuos sanos se protegen a sí mismos contra los microorganismos por medio de diferentes mecanismos muy diversos, estos incluyen:

- Factores genéticos
- Las barreras naturales
- Fagocitosis
- Sistema del complemento
- Inflamación
- Las células asesinas naturales conocidas como NK (natural killer en ingles).

Todos estos mecanismos están presentes antes de la exposición a microorganismos infecciosos u otras



macromoléculas extrañas, no aumentan por tales exposiciones y no discriminan entre la mayor parte de las sustancias extrañas. Así una de las respuestas de la inmunidad natural, se da a nivel de las mucosas a través de diferentes mecanismos con el fin de destruir al agente agresor. (1)(6)

4.1.1- Principales mucosas del organismo e inmunidad

4.1.1.1- Del árbol respiratorio: Esta cubierta respiratoria es una barrera mecánica similar a la piel, pero carece de estrato córneo; en su lugar tiene una capa bilípida de secreción serosa y mucosa, cuyo componente principal es la mucina, una glucoproteína, que atrapan entre ellas gran cantidad de agua. Otro componente en este tejido son las células ciliadas, que presentan cilios o prolongaciones de entre 3 a 6 micras, que cuando se presentan efectos irritativos aumentan su secreción produciendo la tos, acelera la expulsión de agentes extraños con el esputo.

También posee sustancias con acción bactericida, como la lisozima, enzima que es capaz de destruir la membrana celular de muchos gérmenes gram positivos; también algunos macrófagos penetran la pared de los alvéolos y



fagocitan gérmenes o partículas extrañas que entran a la vía aérea.

Otro mecanismo de defensa a este nivel es la presencia de la IgA secretora, anticuerpo que empieza a ejercer la respuesta específica contra los patógenos (especialmente virus) que han logrado sobrepasar las barreras antes mencionadas.

4.1.1.2- Del tracto gastrointestinal: el pH del estómago, que es ácido destruye a la mayoría de gérmenes que entran con la alimentación. También algunas enzimas pancreáticas e intestinales, como la bilis, tienen importante acción bactericida.

El peristaltismo intestinal ayuda a la expulsión de gérmenes. Los anticuerpos (IgA) que se vierten a la luz intestinal cumplen también una función de defensa importante. Por último, la flora normal del intestino nos protege contra los agentes patógenos, ya que compiten por los alimentos y por receptores de membrana, impidiendo su colonización. También esta mucosa contiene grandes cantidades de IgA secretora que ejerce una función neutralizadora, destruyendo gran variedad de microorganismos a este nivel.



4.1.1.3- Del tracto genito urinario: está protegido por el epitelio plano y por mucus rico en anticuerpos principalmente la IgA y enzimas que protegen a este epitelio de la invasión por parte de microorganismos patógenos. También el pH ácido de la orina; como la hipertonicidad de la parte medular del riñón tienen efecto bactericida.

4.1.1.4- Las lágrimas y saliva: es una secreción por la que son eliminados gérmenes que entran en contacto con el ojo. También la lisozima, de potente actividad microbica, está presente en esta secreción. (6)

En las glándulas salivales, las moléculas de IgA son secretadas por las células plasmáticas, en tanto que otra proteína conocida como el componente secretor es producida en las células epiteliales del recubrimiento de los conductos, que le da la propiedad a IgA secretora de no ser degradada por las enzimas proteolíticas de las secreciones exocrinas.

La IgA secretora es la predominante en la saliva humana, los anticuerpos de esta clase de inmunoglobulinas son los que



mas probablemente proporcionan protección contra los microorganismos cariogénicos. (10)

4.2- INMUNIDAD ADQUIRIDA O ESPECÍFICA

Estas respuestas específicas se estimulan cuando el individuo se expone a un antígeno extraño. Este proceso de inmunización se llama **inmunidad activa**, ya que el individuo inmunizado desempeña un papel activo en la respuesta al antígeno. Esta inmunidad puede adquirirse transfiriendo al individuo células o suero a partir de otro individuo inmunizado de forma específica. Por lo tanto este tipo de inmunidad se **denomina pasiva**. La inmunización pasiva es un método para transferir resistencia con rapidez, sin tener que esperar hasta que se desarrolle la respuesta inmunitaria activa. Así, hacen parte de la inmunidad adquirida:

- **Los linfocitos T** que se originan en la médula ósea, maduran en el timo y producen moléculas citotóxicas y moléculas estimuladoras llamadas citoquinas.
- **Los linfocitos B** que se originan en el hígado embrionario y en la médula ósea las cuales producirán anticuerpos.



- **Las células de memoria** que brindan una respuesta más rápida contra una agresión futura de gérmenes causantes de respuestas anteriores.

Gracias a esta inmunidad, la respuesta inmune contra el agente agresor se perfecciona por un proceso de “**aprendizaje**” en el momento del primer contacto del individuo con el agente patógeno; así los linfocitos son “**programados**” para empezar una respuesta, rápida y eficaz cuando el mismo agente agresor trate de ingresar por segunda vez. (1)(6)

4.2.1- Clases de inmunidad específica

4.2.1.1- INMUNIDAD CELULAR

La respuesta celular es mediada por los linfocitos T o timodependientes o por células efectoras activadas por ellas. Los linfocitos T se producen en la médula ósea por acción de la timopoyetina, hormona producida por el timo. Durante su proceso de maduración, los linfocitos T adquieren antígenos de membrana, que permiten distinguirlos y hacer su subsecuente clasificación.

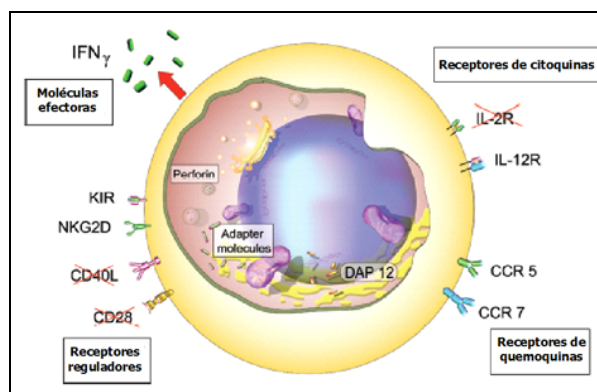


Figura 2: linfocito T (21)

Actúa como mecanismo de ataque en contra de los microorganismos intracelulares, tales como virus y algunas bacterias, capaces de sobrevivir y proliferar en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular, que induce la destrucción del microorganismo residente en los fagocitos o de las células infectadas. (1)(6)

4.2.1.1.1- Mecanismos de acción de la inmunidad celular

Los macrófagos con microorganismos ingeridos producen antígenos desde sus vesículas intracelulares y las presentan en su membrana sobre moléculas de MHC (complejo mayor de histocompatibilidad). Las del MHC-I reaccionan con linfocitos T citotóxicos (CD8+) mientras que los antígenos en el MHC-II lo hacen con linfocitos T CD4+ efectoras (T_H1). Los



CD8+ liberan citocinas mediadores de la inflamación y las citocinas de los CD4+ activan a macrófagos para la destrucción de los microorganismos ingeridos.

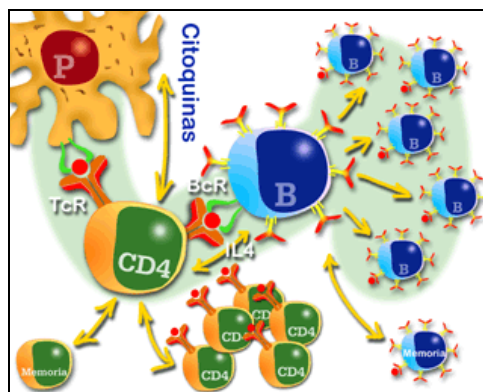


Figura 3: respuesta inmune mediada por linfocitos T (22)

Si los fagocitos son infectados con microorganismos en el citoplasma y no en sus vesículas, activan directamente a los CD8+ para la destrucción de la célula infectada. (11)

4.2.1.2- INMUNIDAD HUMORAL



Figura 4: célula plasmática (23)

La inmunidad humoral es un mecanismo específico de defensa que cumplen los linfocitos B gracias a sus productos de secreción que son los anticuerpos o inmunoglobulinas. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas, en el cual, los componentes del sistema inmune que atacan a los antígenos no son las células directamente sino los anticuerpos secretados por activación antigénica.(1)(6)

4.2.1.2.1- Mecanismo de acción de la inmunidad humoral

La primera fase de la inmunidad celular es el reconocimiento de antígenos extraños dentro del organismo por células B a través de su receptor de membrana (BcR). Sin embargo, a pesar de la interacción con el antígeno, la célula B no se



activa hasta ser estimulada por una línea de linfocitos T llamados linfocitos T cooperadores (LTh o helper). Esa unión, célula B-linfocito T cooperador, estimula la expansión clonal y diferenciación de los linfocitos B.

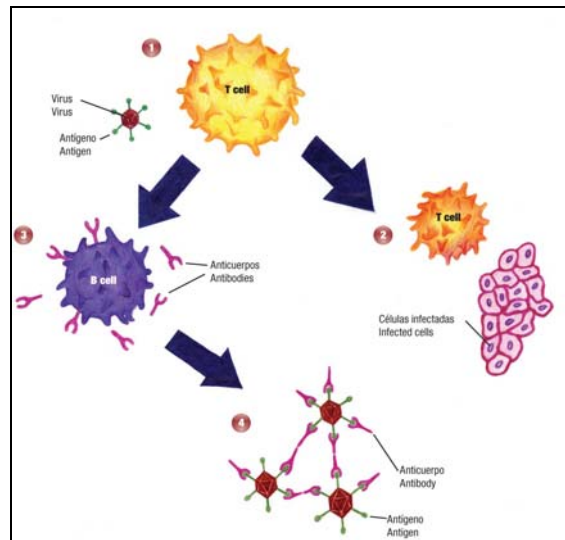


Figura 5: respuesta inmune mediada por anticuerpos (24)

La respuesta de anticuerpos en contra de los antígenos no proteicos (lípidos, polisacáridos) no requieren la participación de linfocitos T cooperadores, por lo que son llamados Antígenos T-independientes.

Las células que producen los anticuerpos son células plasmáticas, un tipo especial de linfocito B que se especializa en la producción de un anticuerpo particular y específico.
(12)



5- ANTICUERPOS o INMUNOGLOBULINAS

5.1- Definición: son moléculas de glucoproteínas especializadas (tetrapéptidos), llamadas también inmunoglobulinas, que son producidas por células plasmáticas que tienen la capacidad de reaccionar específicamente con el antígeno. (6)

Las inmunoglobulinas poseen dos regiones funcionales diferentes, una que reconoce al antígeno, que es muy variable, y la otra que tiene una función efectora, que es constante, tiene la capacidad de fijar el complemento, obrar como opsonina, facilitar el paso de anticuerpo a través de membranas.(1)

Los anticuerpos representan entre un 10 y 20% de las proteínas totales del plasma. (6)



5.2- Estructura de las inmunoglobulinas

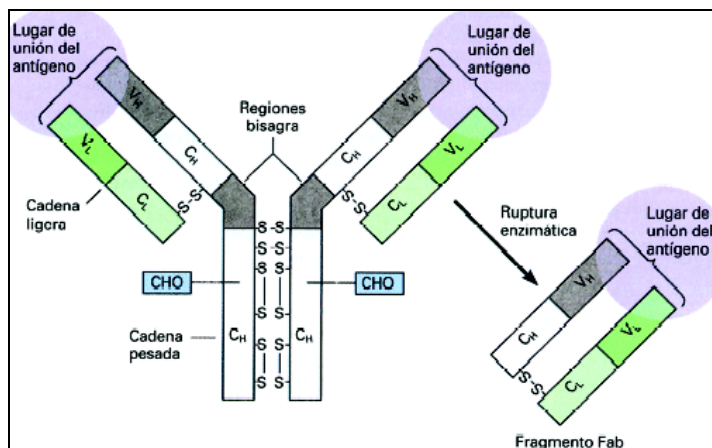


Figura 6: estructura de una inmunoglobulina (25)

Están unidas por dos cadenas pesadas de 440 aminoácidos cada una, a su vez, unidas a dos cadenas livianas de 220 aminoácidos cada una. La unión de las cadenas livianas a las pesadas forma una especie de pinza, encargada de atrapar al antígeno. Así su unión forma un monómero que se puede encontrar en el plasma o membranas. (1)(6)

5.2.1- Cadenas Ligeras.

Hay dos tipos de cadenas ligeras: cadenas ligeras tipo kappa (κ) y cadenas ligeras tipo lambda (λ). La familia de genes que codifica para la cadena ligera κ se localiza en el cromosoma 2



y los loci de los genes homólogos que codifican para la cadena λ , en el cromosoma 22. En cada molécula de inmunoglobulina las dos cadenas ligeras son del mismo tipo, κ o bien λ , pero nunca existe una combinación de cada tipo de cadena en la misma inmunoglobulina.

Las cadenas ligeras están formadas por unos 200 aminoácidos con la particularidad de que existen dos puentes bisulfuro que unen grupos de unos 50 aminoácidos. (1)(6)

5.2.2- Cadenas pesadas.

Estas cadenas poseen unos 400 aminoácidos, estableciéndose entre algunos de ellos puentes bisulfuro (intracatenarios), que asocian unos 60 aminoácidos y que condicionan la estructura secundaria del polipéptido. Estas dos cadenas pesadas están unidas la una a la otra por puentes bisulfuro intercatenarios, ya indicados anteriormente, y que pueden ser de uno a cinco dependiendo del tipo de inmunoglobulina.

En estas cadenas pesadas, y a nivel de los puentes bisulfuro intercatenarios, hay una zona de unos 15 aminoácidos, de gran flexibilidad debido a su estructura y constituye lo que se



denomina zona bisagra por donde se deforma la molécula de inmunoglobulina cuando se produce la unión con el antígeno, facilitándose así el acoplamiento con éste. (1)(6)

5.2.3- Parte variable y constante de las cadenas ligeras y pesadas.

Estructuralmente, las cadenas ligeras poseen dos partes: una corresponde al extremo carboxílico que diferencia las cadenas ligeras en dos tipos κ y λ , y constituye la parte constante de las cadenas ligeras (C_L). La otra corresponde al extremo amínico, constituye la parte variable de las cadenas ligeras (V_L) y corresponde a la zona de interacción con el antígeno. Las partes constante y variable son prácticamente de igual tamaño en las cadenas ligeras.

También las cadenas pesadas poseen una parte variable y otra constante. Aproximadamente el tercio del extremo amínico de estas cadenas se caracteriza por ser estructuralmente muy variable, por lo que se conoce como parte variable de las cadenas pesadas (V_H). La estructura de este dominio, al igual que en las cadenas ligeras, depende del tipo de antígeno que reconoce, dado que este extremo participa en la unión de la inmunoglobulina con el antígeno.



Por el contrario, aproximadamente los dos tercios del extremo carboxílico de todas las cadenas pesadas de un mismo tipo de inmunoglobulina posee una estructura idéntica. Esta parte constante es diferente según la clase de inmunoglobulina que consideremos, determinando la existencia de cinco tipos de cadenas pesadas: γ , α , μ , δ y ϵ que definen a su vez las cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE respectivamente. (1)(6)

5.2.4- Regiones hipervariables

Las zonas variables, tanto de la cadena L como H, poseen a su vez unas regiones en donde se concentra fundamentalmente la variabilidad. Son tres pequeños segmentos que constituyen las denominadas regiones o segmentos hipervariables o región determinante de complementariedad, pues determinan la forma del centro activo que permite el reconocimiento y unión al antígeno. Cada una de estas regiones hipervariables se componen de 17 a 20 aminoácidos y cambios en muy pocos aminoácidos de estas zonas suponen una enorme diversidad de posibilidades de unión al antígeno sin variar el resto de la molécula.



5.2.5- Gozne: es una zona de transición en la cadena de aminoácidos, compuesta por una cadena de ocho a quince aminoácidos. Su función es la de dar movilidad a la estructura de la cadena pesada y liviana. (1)(6)

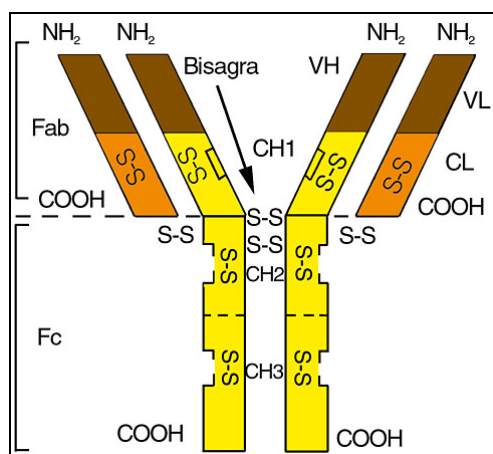


Figura 7: fragmentos Fab y Fc de las inmunoglobulinas (26)

5.3- Expresión de los genes y formación de las inmunoglobulinas

Los linfocitos B, al reconocer un determinado antígeno mediante las inmunoglobulinas de superficie, se activan, proliferan y diferencian hasta células plasmáticas que poseen la propiedad de sintetizar y secretar inmunoglobulinas en grandes cantidades. La síntesis de inmunoglobulinas, se efectúa en los ribosomas de las células plasmáticas, donde tiene lugar la traducción de RNA mensajero correspondiente a las cuatro cadenas peptídicas. Posteriormente se producirá



el proceso de la glicosilación de dichas cadenas y la secreción de las mismas. (1)

5.3.1- Genes implicados en la síntesis de inmunoglobulinas.

A partir de los estudios de Tonegawa en 1976, aparece un acúmulo de conocimientos por lo que se sabe que la síntesis de las cadenas ligeras y pesadas se regula por genes que se encuentran en ***cromosomas distintos***.

Otra característica importante de la formación de inmunoglobulinas es que, en la síntesis de cada una de las cadenas de inmunoglobulinas participan varios segmentos de genes de cuyas combinaciones resultan los diversos genes funcionales, responsables directos de la codificación de cada una de las cadenas de inmunoglobulinas. Esto explica las múltiples posibilidades de formación del gran número de inmunoglobulinas partiendo de un limitado material genético. (1)

5.3.2- Tipos de segmentos génicos

Estos segmentos codifican por separado la parte variable, la parte constante y las partes por las que ambas regiones se unen, esto es, las regiones bisagra. Los segmentos que



codifican la parte variable son de dos tipos, segmentos V y segmentos D, responsables de la variabilidad y diversidad de las inmunoglobulinas respectivamente. Le siguen los segmentos J o de unión, responsables de unir los fragmentos anteriores con los segmentos C que codifican para la parte constante. El número de segmentos responsables de la codificación de la parte constante es muy limitado en relación con el número de segmentos que codifican la parte variable de las inmunoglobulinas.

En consecuencia se puede concluir que: La síntesis de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas está regulada por cromosomas distintos. En esta síntesis participan varios segmentos de genes que combinados dan lugar a los genes funcionales responsables de la codificación de las cadenas de las inmunoglobulinas. (1)

5.3.3- Reordenamiento de los segmentos génicos de las inmunoglobulinas.

A lo largo del proceso madurativo de los linfocitos B, se produce un reagrupamiento de segmentos de genes para la iniciación de la síntesis de las cadenas ligeras y pesadas. A este fenómeno se denomina **recombinación intracromosómica**.



A medida que se produce el proceso madurativo de los linfocitos B, los segmentos V, D y J cambian de sitio en el cromosoma de tal manera que se colocan juntos. Posteriormente este conjunto V/D/J se reagrupa con el segmento C correspondiente quedando constituido en consecuencia un gen con toda la información de la cadena. Cuando el linfocito B es maduro posee ya reagrupados los genes correspondientes a sus cadenas ligeras y pesadas y sólo podrá producir un determinado tipo de anticuerpo. (1)

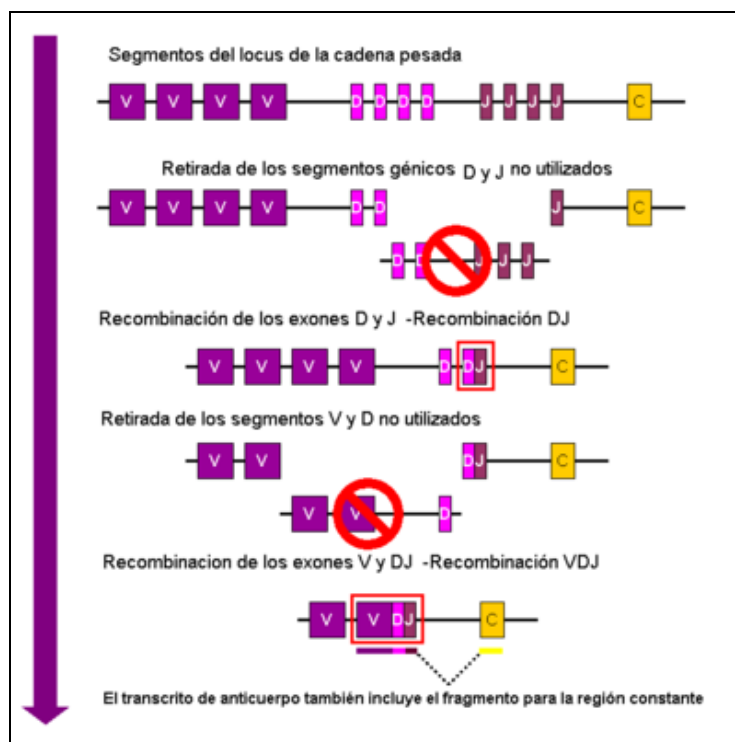


Figura 8: reordenamiento genético en la síntesis de inmunoglobulinas (27)



5.4- Función de las inmunoglobulinas

1. Inmovilización: pueden unir flagelos y de esta forma inmovilizar gérmenes y disminuir su capacidad invasora.
2. Neutralización: los anticuerpos reaccionan con toxinas o partículas virales, impidiendo su fijación a membranas celulares.
3. Activación de los fagocitos por la unión de anticuerpos de clase IgG a los receptores especiales que para su fracción Fc existen en células como macrófagos, granulocitos, linfocitos y células del sistema retículo endotelial.
4. La activación del complemento, activando así la inflamación y fagocitosis.
5. Protección del feto y el niño lactante gracias al traspaso de la IgG a través de la placenta y calostro.
6. Incremento de la quimiotaxis por activación del complemento con la liberación de las partículas C5a del complemento.
7. Degranulación de mastocitos. Acción importante dentro del proceso de inflamación y con lo cual se produce la liberación de los mediadores primarios de la inflamación. Esta acción está a cargo principalmente de la IgE.



8. Facilitar que ciertas células puedan ejercer funciones citotóxicas. (1)(6)

5.5- Distribución de las inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas se encuentran distribuidas en todos los fluidos orgánicos de los vertebrados y en las membranas de los linfocitos B y células plasmáticas. Las cantidades relativas de cada una de las clases de inmunoglobulinas en los diferentes compartimentos del organismo son muy diferentes.

En el torrente sanguíneo predomina la IgG mientras que en las secreciones (saliva, lágrimas, secreción bronquial, así como en el líquido cefalorraquídeo y mucosas) la IgA es la predominante. Los niveles de inmunoglobulinas séricas fluctúan ampliamente en función de diversos aspectos, tales como el estado nutricional, la edad, etc. (1)



5.6- Clases de inmunoglobulinas (Igs):

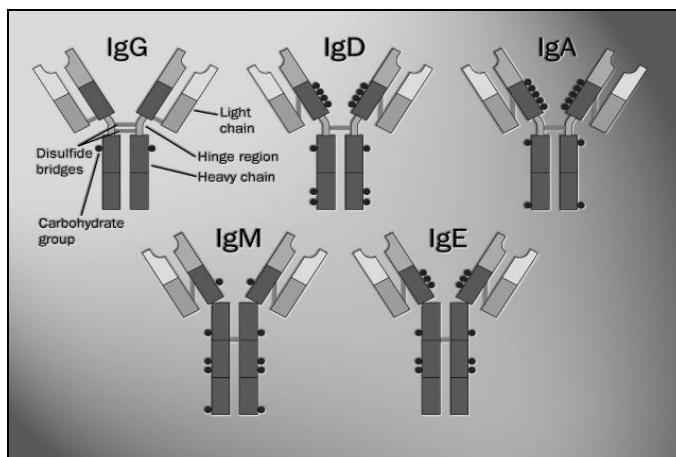


Figura 9: *clases de inmunoglobulinas (28)*

Existen 5 clases de inmunoglobulinas. Su producción esta determinada unas veces por el tipo de antígeno, otras por efecto de las citoquinas. Los lipopolisacáridos generan IgM, en tanto que los alergenosen inducen la producción de IgE. La IL-4 ayuda a producir IgG1 e IgE, la IL-5 estimula la producción de IgM e IgA, y el Interferón y la IgG2.

Cada clase (isotipo) de inmunoglobulina tiene su propia clase de cadena pesada:

y para la IgG

α para la IgA

μ para la IgM

δ para la IgD

ϵ para la IgE (1)(6)



5.6.1- Subclases de inmunoglobulinas:

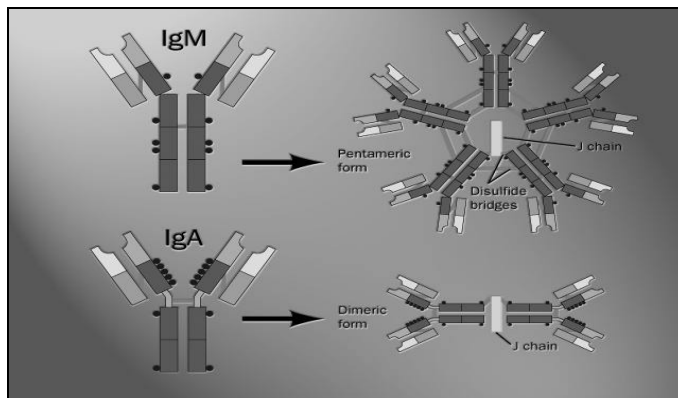


Figura 10: subclases de inmunoglobulinas (28)

Cada clase de anticuerpo puede tener varias subclases de acuerdo con el número y localización de los puentes disulfuros. Se reconocen 4 subclases para la IgG: la IgG1, IgG2, IgG3, y la IgG4, donde cada una de ellas tiene una acción específica en relación con el complemento.

La IgA tiene dos subclases, que se diferencian por la rapidez con la que son catabolizadas, estas son la IgA1 y la IgA2. Hay de la misma manera dos clases de IgM: la IgM1 e IgM2.
(1)(6)



5.6.2- Inmunoglobulina M

Todo estímulo antigénico estimula su producción inicial, y solo mas tarde en las respuestas secundarias, se producirá la IgG o las otras clases. El recién nacido tiene pequeñas cantidades de IgM, menor a 25mg/100ml, pero inicia su producción después del nacimiento, por estímulos del medio ambiente. La concentración en el adulto es de 250mg/100ml. Su peso molecular es de 900.000 daltons.

Posee una estructura pentamérica, con capacidad de reaccionar con diez terminaciones antigénicas. La IgM es un potente anticuerpo contra antígenos que se presentan repetidamente a lo largo de la molécula o germen, como polisacáridos de los gram positivos, y otros antígenos de neumococos, flagelos bacterianos y algunos virus.

La IgM es la más activa en la activación del complemento por vía clásica. Su poder de opsonización es mayor a la IgG. Su vida media es de cinco a seis días. No atraviesa la placenta.

(6)



5.6.3- Inmunoglobulina G

Esta constituye el 85% del total de las inmunoglobulinas en el plasma. Su producción es inducida principalmente por bacterias gram positivas, virus, y antitoxinas. Su concentración plasmática oscila entre 700 a 1800 mg/100ml. Tiene una vida media de quince a treinta y cinco días. No es sintetizada por el feto y es la única capaz de atravesar la placenta durante el embarazo.

Es capaz de fijar el complemento por la vía clásica. Su peso molecular es de 150.000, que permite fácilmente el paso a los tejidos, por lo tanto, una de las mas importantes en la defensa contra las infecciones.

Existen cuatro subclases, que tienen actividad diferente para fijar el complemento; la IgG3 es la más potente biológicamente en este aspecto, seguida por la IgG1 y la IgG2, en tanto que la IgG4 no fija el complemento por vía clásica.

La deficiencia congénita de la producción de IgG2 aumenta la susceptibilidad a infecciones por gérmenes encapsulados, como el neumococo. Por el contrario la deficiencia de IgG3,



no produce ninguna alteración clínica conocida. La IgG1 constituye el 70% del total de las IgGs del adulto, en tanto que la IgG2, 3 y 4 el 20, 6 y 4% respectivamente. (6)

5.6.4- Inmunoglobulina D

Su concentración plasmática es baja, de solo 3mg/100ml. Se han detectado anticuerpos IgD contra la insulina, leche, penicilina, aunque su importancia biológica no es clara.

Los linfocitos B inmaduros no poseen IgD en su membrana y este hecho parece asociarse con el desarrollo de tolerancia a los antígenos propios del organismo durante la vida intrauterina. (6)

5.6.5- Inmunoglobulina E

Su concentración plasmática es baja, menos de 0,01mg/100ml. Una vez secretada por las células plasmáticas, la IgE entra en la circulación rápidamente y se fija a los receptores especiales.

Su producción se realiza principalmente a nivel local en la submucosa del tracto respiratorio y digestivo, así como en ganglios de drenaje de estos sistemas. Su producción es



inducida generalmente por helmintos: nematodos y trematodos pero no por protozoos.

En personas genéticamente predispuestas que desarrollan alergias por sustancias consideradas como inofensivas tales como polen, pelos de animales y algunos alimentos pueden desencadenar su producción. Los antígenos bacterianos y virales no inducen la producción de IgE.

Su función en procesos inflamatorios tanto como en los alérgicos o anafilácticos es muy importante ya que induce la degranulación de los mastocitos liberando histamina, sustancia tóxica que produce efectos nocivos en el organismo. (6)



CAPITULO 2

INMUNOGLOBULINA A

6- Características:

La Inmunoglobulina A (IgA) es un anticuerpo que desempeña un papel crítico en la inmunidad mucosal. Se encuentra en el organismo en dos formas: la secretoria (mucosas) y la sérica (suero). En su forma secretora, se encuentra en secreciones mucosas, incluyendo: saliva, calostro, jugo intestinal, líquido vaginal y secreciones de la próstata y epitelio respiratorio. También se encuentra en cantidades pequeñas en sangre. Es resistente a la degradación por las enzimas, y así puede sobrevivir en ambientes ásperos tales como las zonas digestivas y respiratorias, proporcionando una protección contra microbios que se multiplican en secreciones del cuerpo. Constituye el 10% del total de las inmunoglobulinas, o sea de 150 a 200mg por 100ml. La producción diaria de IgA es de 66 mg/kg/día, lo cual supera a las demás inmunoglobulinas juntas. Su vida media es de 7 días y se degrada en el sistema retículoendotelial. Tiene un peso molecular de 160.000 daltons en su forma monomérica y 320.000 daltons en su forma dimérica. (6)(2)



6.1- Estructura

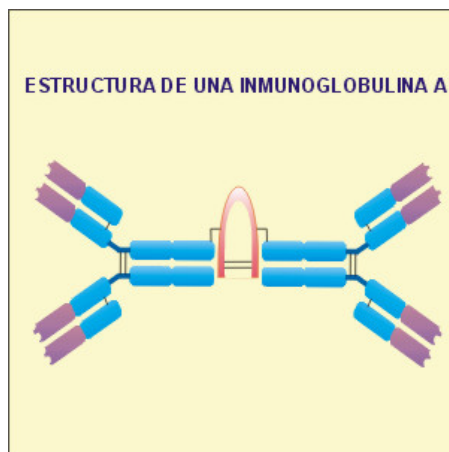


Figura 11: estructura de la inmunoglobulina A (29)

La IgA es una inmunoglobulina formada por dos cadenas livianas y dos pesadas, la forma mas común es la forma dimérica, constituido por dos moléculas de IgA unidas por la pieza secretora o de transporte, que constituye una cadena glucoproteica con un peso molecular de 60.000 daltons, que une dos moléculas de IgA a través de sus cadenas pesadas. Esta pieza secretora se origina a nivel de los epitelios de las mucosas y une a la IgA en el instante en que es excretada luego de ser sintetizada por las células plasmáticas de la submucosa. (6)



6.2- Funciones

La IgA a nivel de las mucosas actúa por dos mecanismos diferentes: uno por “exclusión inmune” por el cual evita que los microorganismos entren al organismo, y el otro por “eliminación inmune” por el cual destruye los patógenos que han logrado atravesar las barreras naturales.

Su función principal es la de inactivar virus en el citoplasma de las células epiteliales mas que gérmenes, ya que para ser un buen bactericida requiere de la capacidad de poder activar el complemento por vía clásica, característica que no posee.

También contribuye indirectamente a la defensa contra bacterias ya que facilita la opsonización, haciendo más fácil su proceso de fagocitosis cuando atraviesan la barrera de la mucosa.

Otra función de la IgA de importancia es en la prevención de las enfermedades alérgicas, debido a que se unen a los antígenos que normalmente se ingieren en los alimentos, o entran por vía respiratoria, como polen, polvo y otros. De esta manera al unirse a estos antígenos, bloquean su paso al



torrente circulatorio. En personas con deficiencia de IgA se encuentran en la sangre elevadas concentraciones de anticuerpos contra la leche, posiblemente debido a que algunos antígenos de esta ingresan al organismo en ausencia de la IgA en la mucosa intestinal. La deficiencia de IgA puede ser un factor desencadenante de enfermedades autoinmunes. (6)

En el niño la IgA llega por la leche y lo protege de infecciones intestinales por *E. coli*, *salmonella* y *shigella*. También tiene la capacidad de unirse a moléculas de alimentos e impedir que en la primera etapa de la vida del niño, cuando la permeabilidad de la mucosa intestinal del niño es elevada, estas pasen al torrente circulatorio.

Los linfocitos B que van a secretar IgA, una vez programados en el intestino ante el contacto con el anticuerpo, pasan a la sangre y pueden migrar a los bronquios, glándulas salivales, glándulas lacrimales, tracto genitourinario y glándulas mamarias en donde inician la producción de anticuerpos contra la molécula que indujo su producción. La bilis es una vía especial de excreción de IgA, es 10 veces más rica que el suero.



La IgA al unirse a los antígenos en la luz intestinal impide que estos se unan a la IgG impidiendo la activación del complemento, por lo que a ese nivel actúa como antiinflamatoria. (6)

6.3- Localización

En la sangre se encuentra como monómero, mientras que como dímero se encuentra en las mucosas como la intestinal, aparato genito urinario, boca, nasofaríngeo, secreciones como saliva, lágrimas, calostro, secreción nasal, bronquial, y del aparato digestivo. (6)(2)

6.4-Transporte

La IgA se produce cerca de las células del plasma, en el propio epitelio adyacente a la superficie mucosal. Se une a un receptor polimérico de inmunoglobulina en la superficie basolateral de las células epiteliales y se introduce en la célula vía endocitosis. El complejo receptor-IgA pasa a través de los compartimientos celulares antes de ser secretada en la superficie luminal de las células epiteliales, todavía unido al receptor. Luego ocurre una proteólisis del receptor y la molécula dimérica de IgA, junto con una porción del receptor



conocido como componente secretor, se libera y se difunde a través del lumen.

En el intestino, puede unirse a la capa del moco en la superficie de las células epiteliales para formar una barrera capaz de neutralizar amenazas antes de que alcancen las células. (6)

6.5- Clases de inmunoglobulina A

Hay dos clases de IgA, la IgA1 y la IgA2 en función de la estructura antigénica y la variación en la disposición de los puentes disulfuros intracatenarios.

La IgA1 fija el complemento por vía alterna, no tiene funciones opsónicas y no es citolítica para los macrófagos, pero si para los granulocitos, es producida por linfocitos B de la médula.

La IgA2 tiene sus cadenas ligeras y pesadas no ligadas con puentes bisulfuro pero si mediante enlaces no covalentes, es secretada por los linfocitos B que se encuentran en las mucosas. El 90% de la IgA que circula en la sangre es monomérica. (6)(2)



6.6- Propiedades efectoras de la inmunoglobulina A

- 1.- Activa el complemento por vía alterna; a través de un receptor específico de Fc presente en macrófagos, obrando como opsonina para la fagocitosis.
- 2.- Induce la degranulación de eosinófilos mediante un receptor específico, que ha implicado a la IgA en respuestas antiparasitarias. (6)

6.7- Inmunidad mucosa mediada por Inmunoglobulina A

La IgA a pesar de ser un componente poco importante de la inmunidad humoral sistémica, cumple un papel clave en la inmunidad de las mucosas. Esto se debe a que solo la IgA puede ser transportada selectivamente a través de las barreras mucosas a la luz de órganos revestidos por ellas.

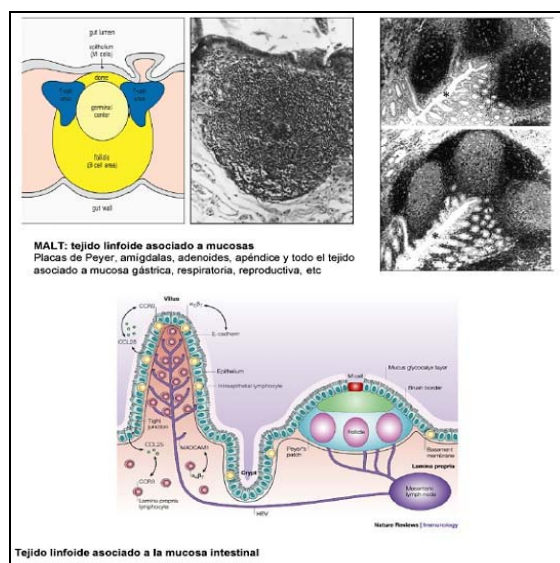


Figura 12: tejido linfoide asociado a mucosas (30)

Una persona normal secreta más IgA que cualquier otro isotipo, pero debido a que la síntesis tiene lugar en los tejidos linfoides mucosos y su transporte a la luz de las mucosas es tan eficaz, la IgA constituye menos de la cuarta parte del total de las inmunoglobulinas del plasma. Existe una concentración alta de IgA en las secreciones orgánicas como la saliva, calostro, lágrimas, secreción nasal y bronquial y secreciones del tracto digestivo. (1)

6.8- Inducción de las respuestas inmunitarias en las mucosas

La mayor parte de los antígenos que entran por vía oral, entran desde la luz intestinal a los vasos linfáticos, donde



inician las respuestas inmunitarias. Algunos antígenos proteicos pueden pasar a través de las células mesentéricas a las placas de Peyer, donde son capaces de estimular a los linfocitos T y B. Los linfocitos estimulados en las placas de Peyer pueden migrar a la lámina propia o a los ganglios linfáticos mesentéricos y finalmente pasar a la sangre.

De este modo, todos los compartimentos del sistema inmunitario mucoso se conectan entre si y con el resto del sistema inmunitario. (1)

6.9- Producción de inmunoglobulina A

La IgA es la principal clase de inmunoglobulina que puede secretarse de forma activa y eficaz a través del epitelio, por lo que juega un papel fundamental en la defensa ante patógenos intestinales y respiratorios, y en la transferencia de inmunidad pasiva en la leche y el calostro de madres a hijos. El tamaño de la superficie intestinal es responsable de la gran cantidad de IgA que se produce.

En el sistema gastrointestinal, la producción de IgA se inicia con la entrada de los antígenos a las placas de Peyer, donde se estimulan a los linfocitos T y B de los folículos. Algunos de



los linfocitos B se diferencian a células productoras de IgA y migran a la lámina propia. Las dos citoquinas responsables de este cambio son el TGF- α y la interleuquina-5. Después de ser generadas, las células plasmáticas productoras de IgA pueden permanecer en la lámina propia o migrar a otros tejidos mucosos u órganos linfoides.

Existen algunas razones por las que las cantidades de IgA producidas en el sistema inmunitario de las mucosas son mayores a las producidas en otros tejidos:

- 1) Las células B que expresan IgA tienden de forma selectiva a migrar a las placas de Peyer y a la lámina propia del intestino.
- 2) Los linfocitos T ayudadores productoras de IL-5 son más numerosas en las placas de Peyer que en otros tejidos linfoides.

La IgA secretora forma un dímero que se mantiene unido por una cadena J, que se secreta y sintetiza de manera coordinada con ella, mientras que la IgA sérica es un monómero que carece de cadena J. Esta IgA dimérica, secretada, se une a un componente receptor asociado a la membrana y forma complejos covalentes sobre las células



epiteliales de las mucosas. Este complejo se introduce a la célula epitelial por endocitosis y es transportado en vesículas a la superficie luminal. Luego este complejo sufre una proteólisis dejando en libertad la molécula de IgA en la luz intestinal. Este componente secretor también es responsable de la secreción de IgA a la bilis, leche, el esputo y la saliva.
(1)(6)

6.10- Patologías más comunes relacionadas con la alteración de la concentración de inmunoglobulina A

6.10.1- Deficiencia selectiva de IgA

La Deficiencia Selectiva de IgA es la deficiencia severa o ausencia total de la clase IgA de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo y secreciones.

Los individuos con Deficiencia Selectiva de IgA no producen IgA, sin embargo, producen todas las otras clases de inmunoglobulinas. Además, la función de los linfocitos T, células fagocíticas y sistema del complemento son normales o casi normales. Por lo tanto, esta afección es conocida como Deficiencia “Selectiva” de IgA. (7)



6.10.1.1- Causas de deficiencia selectiva de IgA

Las causas de la Deficiencia Selectiva de IgA son desconocidas. Probablemente existan varias causas de la Deficiencia Selectiva de IgA y que aquellas puedan diferir de un paciente a otro. Los individuos con Deficiencia Selectiva de IgA tienen linfocitos B aparentemente normales, pero que no maduran a células plasmáticas y por lo tanto no producen IgA. (13)

6.10.1.2- Datos clínicos de la deficiencia de IgA

La Deficiencia Selectiva de IgA es la más común de las enfermedades de inmunodeficiencia primaria. Los estudios han indicado que tantas personas como una de cada quinientos tiene Deficiencia Selectiva de IgA. Muchos de estos individuos presentan enfermedades relativamente ligeras y generalmente no se encuentran lo suficientemente enfermos para ser revisados por un médico. Por lo tanto, nunca se les descubre la deficiencia de IgA. De hecho, la mayoría de los individuos con Deficiencia Selectiva de IgA son relativamente sanos y no presentan síntomas. En contraste, también existen individuos con Deficiencia Selectiva de IgA que tienen enfermedades significativas. Los



estudios han sugerido que a algunos pacientes con deficiencia de IgA les falta una fracción de IgG (la subclase IgG2) y esa puede ser una explicación de la razón por la cual algunos pacientes con deficiencia de IgA son más susceptibles a infecciones que otros.

Un problema común en la deficiencia de IgA es la susceptibilidad a infecciones, tales como, infecciones recurrentes del oído, sinusitis, bronquitis y neumonía, son las más comúnmente observadas en pacientes con esta deficiencia.

El segundo problema más importante en la deficiencia de IgA es la ocurrencia de enfermedades autoinmunes. Algunas de las enfermedades autoinmunes más frecuentes asociadas con la deficiencia de IgA son: Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico y Púrpura Trombocitopénica Inmune. Otros tipos de enfermedades autoinmunes pueden afectar el sistema endocrino y/o sistema gastrointestinal.

Las alergias pueden ser también más comunes entre los individuos con Deficiencia Selectiva de IgA de entre la población general. Los tipos de alergias varían. El asma es una de las enfermedades alérgicas que ocurren comúnmente



con la Deficiencia Selectiva de IgA. Otro tipo de alergia asociada con la deficiencia de IgA es la alergia a alimentos, en la cual los pacientes tienen reacciones ante ciertos alimentos. (13)(14)

6.10.1.3- Diagnóstico

El diagnóstico de la Deficiencia Selectiva de IgA se sospecha comúnmente por la existencia, ya sea recurrente o crónica, de infecciones, alergias, enfermedades autoinmunes o diarrea crónica. El diagnóstico se establece cuando los análisis del suero sanguíneo del paciente demuestran una marcada reducción o casi ausencia de IgA con niveles normales de otras clases principales de inmunoglobulinas (IgG e IgM). La mayoría de los pacientes producen anticuerpos normalmente.

Algunas otras pruebas importantes incluyen un conteo sanguíneo completo, medición de la función pulmonar, y análisis de orina. Otras pruebas que pueden ser obtenidas en pacientes específicos incluyen la medición de la función tiroidea, medición de la función del riñón, medidas de absorción de nutrientes por el tracto gastrointestinal, y la



prueba para anticuerpos dirigidos contra los tejidos propios del cuerpo (autoanticuerpos). (13)(14)

6.10.2- Nefropatía por inmunoglobulina A

La nefropatía crónica es una enfermedad crónica del riñón, que se puede originar en la niñez y avanzar en un período de 10 a 20 años, terminando en una enfermedad renal grave. Es causada por depósitos de inmunoglobulina A en los glomérulos renales. Esto impide que el riñón pueda excretar normalmente sustancias de desecho. (15)

6.10.2.1- Causas de la nefropatía por IgA

Aún no se sabe cual es la causa de esta enfermedad, sin embargo, en más de la mitad de los casos la nefropatía por IgA se hereda por medio de un gen autosómico dominante. La herencia autosómica dominante significa que el gen está localizado en uno de los autosomas (pares de cromosomas del 1 al 22). Por lo que tanto hombres como mujeres están igualmente afectados.

La nefropatía por IgA es una condición bastante heterogénea, lo cual significa que la presentación varía



considerablemente entre individuos y familias. De hecho, es posible que algunas personas posean el gen y no manifiesten síntoma alguno de la enfermedad, pero si podrían transmitirle el gen a la siguiente generación. (15)(16)

6.10.2.2- Datos clínicos de la nefropatía por IgA

Esta patología es una enfermedad silenciosa que puede pasar desapercibida por algunos años, pero generalmente comienza antes de los 30 años de edad. El síntoma mas común es la presencia de sangre en la orina. Le toma muchos años avanzar a la etapa que causa complicaciones detectables como edema, infecciones recurrentes de las vías respiratorias superiores o enfermedad intestinal. (15)(16)

6.10.2.3- Diagnóstico

Además del examen físico y la historia médica completa, se pueden incluir los siguientes procedimientos para su diagnóstico:

- Medida de la presión sanguínea
- Medida de niveles de colesterol en la sangre
- Medida de los niveles de proteína en la orina



- Biopsia de riñón para identificar los depósitos de IgA
(15)(16)

6.10.3- Mieloma múltiple IgA

El mieloma múltiple es una enfermedad caracterizada por una proliferación de células neoplásicas plasmáticas en la médula ósea y la producción de una inmunoglobulina A monoclonal. (17)

6.10.3.1- Clínica del mieloma múltiple IgA

El dolor óseo es el síntoma más frecuente, es de carácter mecánico y se localiza más frecuentemente en columna y parrilla costal. Puede haber osteoporosis y fracturas patológicas. En ocasiones se producen compresiones medulares o radiculares, tanto por la afectación mielomatosa como por aplastamientos vertebrales, que cursan con dolor y en los casos más severos pueden llegar a dar una paraparesia espástica. Un tercio de los pacientes presentan anemia y también se aprecia pérdida de peso en el 27% de los casos. El 10% de los pacientes debutan con clínica infecciosa, fundamentalmente neumonía neumocócica e infecciones urinarias por bacilos gram negativos. La



hepatomegalia y la esplenomegalia son infrecuentes. En aproximadamente el 50% de los pacientes hay afectación renal en algún momento de la evolución, con deterioro de la función renal, secundario a la excreción de cadenas ligeras por orina o a la hipercalcemia. Esta última puede cursar con desorientación, confusión, estreñimiento, náuseas, poliuria. (17)(18)

6.10.3.2- Diagnóstico

En la analítica de sangre podemos encontrar anemia (60-70%) con el resto de series conservadas, acompañada de un aumento marcado de la VSG (normalmente superior a 100 mm). El 25% de los pacientes tienen cifras de creatinina superior a 2 mg/dl y la hipercalcemia aparece en el 20% de los pacientes.

El dato fundamental que suele constituir el inicio del estudio de un mieloma es la aparición en el proteinograma electroforético de sangre u orina de una banda monoclonal en las regiones gamma o beta, aunque hay que recordar que existen casos en los que puede ser normal.

Según el tipo de inmunoglobulina que produce el mieloma se puede clasificar en varios tipos: IgG (50-60%), IgA (20-30%),



cadenas ligeras o Bence-Jones puro (10-20%; el componente M está formado sólo por cadenas ligeras), IgD (2%), no secretor (1%), siendo muy infrecuentes los tipos IgE e IgM1). (17)(18)

6.11- Enfermedades más frecuentes relacionadas con la alteración de la concentración de Inmunoglobulina A en niños

La inmunoglobulina A secretora es la mayor clase de inmunoglobulina presente en secreciones y membranas mucosas del organismo. Muchas causas han sido involucradas en la etiopatogénesis de las enfermedades respiratorias de niños, uno de ellos es la posible deficiencia de IgA secretora. Muchos autores han realizado estudios de niños con enfermedades del tracto respiratorio superior secundarias a infecciones o alergias, encontrando que estos poseen niveles de IgA superiores con respecto a niños que no presentan este tipo de enfermedades y también valores que superan a los valores normales correspondientes a sus edades. Por lo tanto estos hallazgos no se relacionan con la teoría de que los niños que presentan enfermedades respiratorias, presenten déficit de IgA.



También se han realizado estudios que relacionan la caries dental y los niveles de IgA en suero de niños, así como la incidencia de *Streptococcus mutans* como causante de esta alteración. También se han realizado otros estudios como la relación entre los niveles de IgA y la dieta, concentración de flúor en el agua y diferente frecuencia de lavado dental.

Así *Streptococcus mutans* se encuentra en la mitad de niños con caries dental. Se han encontrado niveles séricos promedio de IgA muy disminuidos en estos niños. Por lo tanto en estos estudios se concluyó que la disminución de IgA en los niños podría ser un factor para que se desarrolle la caries dental. Finalmente se observó que factores tales como la dieta, concentración de flúor en el agua y diferente frecuencia de lavado dental no tienen ningún efecto en la aparición de caries dental en los niños. (19)

6.12- Otras patologías relacionadas con el aumento o disminución de IgA

6.12.1- Aumento: Artritis reumatoide, carcinoma, cirrosis, disproteinemia, enfermedad de Berger, enfermedades autoinmunitarias, infecciones crónicas, mieloma múltiple, síndrome de Wiskot Aldrich y sinusitis.



6.12.2- Disminución: Ataxia telangiectasia hereditaria, deficiencia de IgA, deficiencia humoral inmunitaria, enfermedad de Burton, enteropatías perdedoras de proteínas, hipogamaglobulinemia, quemaduras y síndrome nefrótico.

Medicamentos como ácido valproico, anticonceptivos orales, carbamacepina, dextrán, estrógenos, fenitoína, metilprednisolona, oro y penicilamina también la disminuyen.
(7)

6.13- Valores referenciales de inmunoglobulina A en suero y otros fluidos corporales en mg/dl.

Tabla 1: valores de referencia de IgA en suero sanguíneo y otros fluidos corporales. (7) (5)



Suero:

Edad	mg/dl
Recién nacidos	Hasta 8
1-3 meses	3-60
3-6 meses	4-82
6-12 meses	12-85
1-2 años	12-105
2-3 años	20-122
3-6 años	30-190
6-9 años	25-230
9-12 años	55-265
12-16 años	70-230
Adultos	70-400

Lágrimas	3-30
Saliva	2-20

Nota: estos valores fueron obtenidos por nefelometría.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

La aparición de nuevos métodos y técnicas para la cuantificación de la concentración de inmunoglobulinas en los últimos años, han hecho que otros se vayan quedando atrás y sean utilizados cada vez menos. Estos nuevos procedimientos han logrado incrementar su sensibilidad y especificidad, lo que ha permitido obtener resultados cada vez más precisos.

Este trabajo lo que buscó es hacer una comparación entre dos métodos para la cuantificación de IgA en suero sanguíneo humano, mediante la Inmunodifusión Radial y el Elisa Cuantitativo; el primer método ha sido utilizado durante varios años por muchos laboratorios convencionales gracias a la facilidad de adquisición y sencillez de su protocolo de trabajo, mientras que el Elisa Cuantitativo es un método novedoso pero que ha diferencia del otro utiliza protocolos mas complejos y su adquisición se restringe a laboratorios especializados debido al costo del mismo y a que requiere de equipos especiales para su realización.



7- Muestra:

Para obtener una muestra lo más homogénea posible, se visitó la escuela Nicolás Sójos a la que acuden niños de condiciones socio-económicas media-bajas. Se recolectó un total de 40 muestras de sueros sanguíneos en ayunas, que se obtuvieron de niños y niñas entre 6 y 12 años, tomados aleatoriamente y que presentaban un estado de salud aparentemente normal. Las muestras se recogieron en tubos al vacío con agujas vacutainer, centrifugadas máximo dos horas después de su recolección, y congeladas inmediatamente a -20°C hasta su análisis.

8- Tamaño de la muestra:

El número de muestras de suero sanguíneo fue de 40 de niños y niñas en edad comprendida entre 6 y 12 años. Se realizará cada prueba por duplicado. (No se realiza con más muestras debido al costo de los reactivos).

9- Métodos de ensayo

Inmunodifusión Radial y Elisa Cuantitativo Indirecto. (8)(9)



Método 1

9.1- INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR) (8)

9.1.1- Principio de la técnica:

Consiste en una inmunoprecipitación en agarosa entre un antígeno a cuantificar y su anticuerpo específico. Se realiza incorporando uno de los dos reactivos inmunes (generalmente el anticuerpo) uniformemente en una capa de agarosa y luego introduciendo el otro reactivo en los pocillos cavados en el gel. El antígeno difunde radialmente en la mezcla gel-anticuerpo y se forma un disco o anillo de precipitado visible en un punto que depende de la relación estequiométrica antígeno-anticuerpo.

Al completarse la reacción a las 24-48 Horas, se realiza la medida del diámetro del anillo de precipitación en mm² y se compara con una curva de calibración que se construye con los diámetros al cuadrado de una serie de patrones vs. la concentración de los mismos, siendo esta relación lineal.



9.1.2- Condiciones de la prueba:

Temperatura de incubación: 23°C (temperatura ambiente en nuestro medio)

Tiempo de incubación: 48 horas

Rango de la placa del fabricante: 44,5 a 620 mg/dl

9.1.3- Materiales

- 1- Placa IDR para 12 determinaciones. (**Anexo 4:4.1**)
- 2- Micropipetas para medir 5ul con precisión. (**Anexo 6:6.1**)
- 3- Suero testigo de concentración conocida.
- 4- Regla de lectura que permita leer con una precisión de 0.1 mm (**Anexo 4:3.3**)
- 5- Tabla de conversión diámetro vs. Concentración. (**Anexo 1**)
- 6- Cámara húmeda de incubación. (**Anexo 4:4.2**)



9.1.4- Preparación de muestras, placas y patrones:

Las placas deberán cumplir con las especificaciones ya mencionadas anteriormente, donde cada una sirve para doce determinaciones.

Se utilizará suero sanguíneo humano de niños tomado correctamente en condiciones asépticas, los cuales deberán ser conservados en congelación, que al momento de la prueba deberán ser temperadas a temperatura ambiente antes de cargar en la placa.

a)- Muestra: En esta prueba se utilizó suero sanguíneo humano, la que se cargó 5 ul directamente en cada pocillo.

b)- Patrones: Se usó 5 patrones de diferentes concentraciones, utilizando una muestra de suero de referencia (279mg/dl) IgA), de los cuales también se cargaron 5 ul en cada pocillo:

- Preparación de los patrones

Patrón 1: Dilución 1:6: diluir 5ul de suero de referencia con 30 ul de agua destilada.



Patrón 2: Dilución 1:4: diluir 5ul de suero de referencia con 20 ul de agua destilada.

Patrón 3: Dilución 1:2: diluir 5ul de suero de referencia con 10 ul de agua destilada.

Patrón 4: x1: cargar 5 ul de suero de referencia directamente en la placa sin hacer dilución alguna.

Patrón 5: x2: cargar 10 ul de suero de referencia en la placa, primero se carga 5 ul, esperamos entre 15 a 20 minutos y luego volvemos a cargar 5 ul más en el mismo pocillo.

- Curva de calibración para Inmunodifusión Radial

Tabla 2: Preparación de patrones y curva de calibración obtenida mediante IDR (Anexo 1)

Patrón	Dilución	Diámetro al cuadrado del halo (mm ²)	Concentración en mg/dl
Patrón 1	1:6	20,25	46,5
Patrón 2	1:4	25	69,75
Patrón 3	1:2	30,25	139,5
Patrón 4	X1	49	279
Patrón 5	X2	82,8	558



9.1.5- Procedimiento:

- 1- Abrir la placa para permitir que se evapore el exceso de humedad.
- 2- Sembrar 5 ul de suero sanguíneo (patrones y muestras), usando micropipetas de precisión. Colocar en el centro de la placa un algodón o gasa humedecida para mantener la humedad del agar. Cerrar firmemente la tapa.
- 3- Incubar en posición invertida en cámara húmeda por 24 - 48 horas a temperatura ambiente.

9.1.6- Cálculo de los resultados:

El cálculo de los resultados se realizará por el siguiente método:

- Determinación de alta precisión trazando curva de calibración:

- a) Las cinco primeras posiciones de cada placa se utilizaron para sembrar los diferentes sueros controles de la curva de calibración.
- b) Medir los halos con una precisión de 0.1 mm con una regla especial de lectura.



- c) Graficar las concentraciones de los sueros patrones contra el diámetro al cuadrado de los halos de precipitación en mm².
- d) Trazar la recta que mejor una los puntos. **Anexo 1**
- e) Interpolar el valor del diámetro de la muestra desconocida en la curva y establecer la concentración.

Ejemplo:

Tabla 3: *Ejemplo de lectura de la concentración de IgA (mg/dl) en suero sanguíneo mediante IDR*

Muestra	Diámetro del halo de precipitación medido (mm ²)	Concentración en la curva de calibración (mg/dl)
1	31.925	150
2	35.4	182

9.1.7- Posibles errores de la prueba:

- 1) Es posible que por un mal manejo de la pipeta, se cargue los pocillos de manera inadecuada, derramando la muestra fuera del pocillo, romper los bordes de la



placa o por la formación de burbujas de aire, por lo que se deberá tener cuidado en la realización de este paso.

- 2) En cuanto a la conservación de las placas de IDR, deberán ser guardadas en refrigeración entre 2-8 °C, no se debe congelar, y se deberá colocar la placa en forma invertida si es posible en su sobre y caja original para evitar la condensación de la humedad. De la misma manera cualquier indicio de deshidratación de la placa deberá ser descartada.
- 3) Las placas que presenten humedad dentro de los pocillos deberán ser descartados.
- 4) Se deberá respetar tanto el tiempo como la temperatura de incubación, ya que de no ser así se podrían presentar variaciones de los resultados, ya que se afecta la velocidad de difusión y por lo tanto los diámetros de difusión.

Método 2

9.2- ELISA CUANTITATIVO INDIRECTO (9)

9.2.1- Principio de la técnica:



El Elisa Cuantitativo se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

El Elisa indirecto emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. (3)

9.2.2- Condiciones de la prueba:

Temperatura: 25°C (Temperatura ambiente en nuestro medio)

Rango de detección: 500-7,8ng/ml



9.2.3- Materiales:

- Lavador de micropocillos Elisa (**Anexo 5:5.1**)
- Espectrofotómetro Elisa (**Anexo 5:5.2**)
- Pipetas automáticas fijas, variables y de ocho canales (**Anexo 6:6.1- 6:6.2**)
- Kit de reactivos
- Micropocillos (**Anexo 5:5.2**)
- Soportes para micropocillos

9.2.4- Reactivos contenidos en el kit:

a)- Micro pocillos (Microtiter Wells)

b)- Tampón de recubrimiento (Coating Buffer)

Contiene cápsulas buffer de carbonato-bicarbonato.

c)- Solución de lavado (Wash Solution)

Tris buffer salino 50 mM, pH 8.0, y Tween 20 al 0.05 %.

d)- Solución de Post-recubrimiento (Postcoat Solution)

Tris buffer salino 50 mM, pH 8.0, y BSA al 1%.



**e)- Diluyente de muestras y conjugados
(Sample/Conjugate Diluent)**

Adicionar 0,5 ml de solución Tween 20 al 10% a 100 ml de Solucion Postcoat.

f)- Enzima Substrato (Enzyme Substrate)

Contiene TMB peroxidasa substrato y peroxidasa solución B en cantidades iguales.

g)- Calibrador

Contiene suero de humano de referencia, con una concentración por cada 0.1ml de 1.2 mg/ml. Rango de trabajo 500 – 7.8 ng/ml.

h)- Anticuerpo de recubrimiento (Coating Antibody)

Contiene anti-IgA humano purificado, con una concentración de 1mg/ml. Dilución de trabajo 1/100.

i)- HRP Anticuerpo de Detección (HRP-Antibody)

Contiene anti-IgA humano-HRP conjugado, con una concentración de 1mg/ml. Dilución de trabajo 1/50.000.



9.2.5- Preparación de los reactivos

Tampón de recubrimiento:

Disolver el contenido de una cápsula en 1.200ml de agua destilada que equivale a 0.05 M de carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Conservar el preparado coating buffer a temperatura ambiente por un año.

Solución de lavado:

Disolver cada paquete en un litro de agua destilada. Conservar entre 2-30 °C por un año.

Solución de Post-recubrimiento:

Disolver el paquete en un litro de agua destilada. Conservar entre 2-8°C por un año.

Diluyente de Muestra y Conjugado:

Adicionar 0.5ml del Tween 20 al 10% en 100ml de la solución de post-recubrimiento. Para usar tanto como en diluciones de muestra y conjugado. Conservar entre 2-8°C por un año.

Enzima Substrato:



Mezcle volúmenes iguales de cada reactivo. Haga solamente la cantidad que requiere para cada ensayo. Conservar entre 2-8°C por un año.

Solución de Parada:

Contiene H₂SO₄ 2M (no esta incluido en el kit).

9.2.6- Protocolo para la cuantificación de IgA por Elisa Cuantitativo Indirecto

Procedimiento:

1: Tampón de recubrimiento con antígeno de captura

- Determinar el número de pocillos que se necesitará. Los estándares, muestras, blancos y/o controles deberán ser analizados por duplicado.
- Diluir 1µl del anticuerpo de captura a 100 µl del tampón de recubrimiento por cada muestra a ser analizada (ej. para 32 muestras diluir 34 µl a 3.4ml).
- Colocar 100 µl del antígeno de captura preparado en todos los pocillos e incubar por 60 minutos a temperatura ambiente.



- Realizar el lavado con la solución de lavado, 350 ml para cada pocillo por 3 veces.

2: Blocking (Post-recubrimiento)

- Adicionar 200 μ l de la solución Blocking Post-recubrimiento en cada pocillo e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar el lavado con la solución de lavado como se describió en el paso anterior.

3: Estándares y Muestras

- Diluir los estándares en el diluyente de muestra como se indica en el siguiente cuadro:



Tabla 4: *Preparación de patrones y curva de calibración para Elisa*

Nº de pocillo	Concentración del patrón en (ng/ml)	Calibrador RS10-110-3	Diluyente de muestra
1	500	4ul	9.6ml
2	250	1ml del pocillo 1	1ml
3	125	1ml del pocillo 2	1ml
4	62.5	1ml del pocillo 3	1ml
5	31.25	1ml del pocillo 4	1ml
6	15.625	1ml del pocillo 5	1ml
7	7.8	1ml del pocillo 6	1ml

- Diluir las muestras, basado en la concentración esperada del análisis, para que entre dentro del rango de concentración de los estándares. Las diluciones que se realizaron fue de 1:2500, 1:5000 y 1:10.000 para diferentes muestras.



- Colocar 100 μ l de los estándares y muestras en cada pocillo de acuerdo al mapa de trabajo e incubar por 60 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar 5 veces como se indica en el paso 1.

4: Detección del anticuerpo HRP

- Para este trabajo se diluyó 1:50.000 de HRP- conjugado en el diluyente de conjugado.
- Colocar 100 μ l en cada pocillo e incubar por 60 minutos a temperatura ambiente
- Lavar 5 veces como se indica en el paso 1.

5: Reacción con la Enzima Substrato

- Preparar la solución de substrato de acuerdo a la recomendación. **(9.2.4 lit. e)**
- Colocar 100 μ l de la solución substrato en cada pocillo e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Para detener la reacción enzimática, adicionar 100 μ l de H_2SO_4 2M en cada pocillo.
- Leer todas las muestras y estándares en el lector Elisa a una longitud de onda de 450nm para el TMB. **(9.2.3 lit. f)**



9.2.7- Cálculo de resultados

- Se estableció el promedio de las lecturas duplicadas de cada estándar, muestra y control.
- Se elaboró una curva de calibración con los promedios de los estándares. **(Anexo 2)**
- Se determinó la concentración de cada muestra utilizando la ecuación de la curva de calibración obtenida de la siguiente manera:

Obtenida la densidad óptica D.O., esta se reemplazará en la ecuación de la curva de calibración, la que tendrá que ser despejada para obtener la concentración en ng/ml directamente, y luego deberá pasarse a mg/dl haciendo los cálculos correspondientes para compararlos con los resultados obtenidos por la IDR también expresados en mg/dl.

- Para los cálculos deberá también tomarse en cuenta la dilución que se realizó en las muestras.

Ejemplo:

Tabla 5: *Ejemplo de la lectura de la concentración de IgA (mg/dl) mediante Elisa*



Muestra	Absorbancia (D.O.)	Concentración ng/ml mediante ecuación *	Concentración mg/dl
19	1.767	255.7	127.8
20	1.984	454	227

9.2.8- Lectura de patrones y curva de calibración obtenida mediante Elisa Cuantitativo.

Tabla 6: *Curva de calibración obtenida mediante Elisa (Anexo 2)*

Patrón	Absorbancia (D.O.)	Concentración (ng/ml)
1	2.103	492.893
2	1.723	254.741
3	1.124	123.523
4	0.607	62.025
5	0.312	32.361
6	0.171	16.829

9.2.9- Ecuación de la curva de calibración utilizada en el cálculo de resultados mediante Elisa Cuantitativo Indirecto. (Anexo 2)



***Ecuación de la curva:** $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

Coefficientes: **A** = 2,406 **B** = -1,648 **C** = 183,952 **D** = 0,299

y = Absorbancia (D.O.) **x** =
Concentración de IgA (ng/dl)

R-squar: 0,9968

Despejando (**x**) de la fórmula anterior y reemplazando los coeficientes tenemos la siguiente ecuación:

$$x = \frac{143,824}{\sqrt{\frac{2,562}{1,467} - 1}} \quad y = 0,074$$

Nota: Para obtener las concentraciones de IgA en suero mediante Elisa, se reemplazará la absorbancia = (**y**) en la ecuación anterior.

Ejemplo: Muestra # 19

Absorbancia (D.O.) leída: **y** = 1.726

$$x = \frac{143,824}{1,467}$$



$$\sqrt{\underline{2,562}} - 1$$

$$1.726 - 0,074$$

$$x = 255,75 \text{ ng/ml}$$

Tomando en cuenta la dilución y pasando la concentración de ng/ml a mg/dl tenemos:

$$\begin{array}{l} 6 \\ 10 \text{ ng} \\ \times \\ 255,75 \text{ ng/ml} \\ \text{muestra)} \end{array} \quad \begin{array}{l} 1 \text{ mg} \\ x = 0,000256 \text{ mg/ml} * 100 = 0,0256 \text{ mg/dl} * 5.000 (\text{dilución}) \end{array}$$

$$x = 127,8 \text{ mg/dl}$$



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados de las concentraciones de IgA en suero sanguíneo de los 40 niños de la escuela Nicolás Sójos de la ciudad de Cuenca, con un estado de salud aparentemente bueno, obtenidos mediante IDR y Elisa Cuantitativo Indirecto. Los nombres de todos estos niños han sido omitidos por razones éticas, por lo que se les atribuye un número entero del 1 al 40.

10 - ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LAS CONCENTRACIONES DE IgA OBTENIDAS EN SUERO SANGUÍNEO MEDIANTE INMUNODIFUSIÓN RADIAL Y ELISA CUANTITATIVO INDIRECTO.

10.1- Resultados de las concentraciones de IgA obtenidas por los dos métodos.

***Tabla 7:** Resultados de las concentraciones de IgA en suero sanguíneo obtenidas mediante Inmunodifusión Radial y Elisa Cuantitativo Indirecto expresadas en mg/dl.*



Número de muestra	Concentración de IgA en suero mediante IDR en mg/dl	Concentración de IgA en suero mediante Elisa en mg/dl
1	150	239,7
2	232	118
3	150	204,5
4	182	131,6
5	186	204,6
6	123	121
7	310	287
8	182.5	192
9	-	5,9
10	160.5	157
11	250.5	288,7
12	190	192
13	132	158
14	175.5	185,4
15	285	272,9
16	183	145,4
17	176	171
18	225	141,1
19	91.5	128



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

“DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA A EN SUERO SANGUÍNEO POR LOS MÉTODOS DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL Y ELISA CUANTITATIVO INDIRECTO EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR”

20	300	227
21	325	151
22	192	333,8
23	181	124,7
24	150	81
25	160.7	167
26	95	107,7
27	182	151
28	210	126
29	154.4	232
30	203.4	138
31	95	131,2
32	107	91
33	225	161,8
34	205	170
35	182	170
36	145	155,7
37	309	152
38	195	235,6
39	179	319
40	205	337,2
Concentración promedio	189,3589744	182,1458974



Según los resultados obtenidos se encuentra un valor mínimo de 91.5 mg/dl y un valor máximo de 325 mg/dl por Inmunodifusión Radial, mientras que por Elisa Cuantitativo Indirecto se encuentra un valor mínimo de 5.92 mg/dl y un valor máximo de 337.2 mg/dl.

De acuerdo a los rangos de detección de los dos métodos:
IDR (44.5-620 mg/dl)

-4

y Elisa (500-7.8 ng/ml) ó (0.05-7.8x10 mg/dl), se observa claramente que mediante Elisa todos los sueros arrojan un resultado, en cambio por la IDR la muestra #9 no da valor alguno. La explicación de este hecho es que la concentración de IgA en ese suero fue tan baja como para entrar dentro del rango de detección de la placa de IDR, lo cual nos indica que el Elisa Cuantitativo Indirecto que sí nos da un valor de dicha muestra, presenta un mayor grado de sensibilidad y especificidad, debido a que este método utiliza rangos de detección mucho mas bajos si lo comparamos con el del otro método. También se observa que los promedios de las concentraciones de IgA en suero obtenidos por ambas técnicas muestran cierta cercanía, 189,3589744 por IDR y 182,1458974 mediante Elisa, lo cual nos da un primer indicio de los resultados finales, es decir que no presentarían diferencias significativas entre uno y otro.



La mayoría de los resultados obtenidos por ambas técnicas se encuentran dentro de los valores referenciales de IgA en suero de niños entre 6-12 años, comprendido entre **25 a 265 mg/dl** (5)(6); una pequeña parte se encuentran con valores superiores y otra con valores inferiores a los rangos normales de IgA en suero sanguíneo.

Es importante recalcar que se ha realizado la comparación de las concentraciones de IgA en suero sanguíneo analizadas por ambos métodos, con valores referenciales obtenidos por nefelometría (25-265 mg/dl), ya que la técnica de IDR si nos muestra valores referenciales de IgA suero para niños (30-300 mg/dl), mientras que el Elisa Cuantitativo Indirecto no nos trae en su técnica valores referenciales algunos.

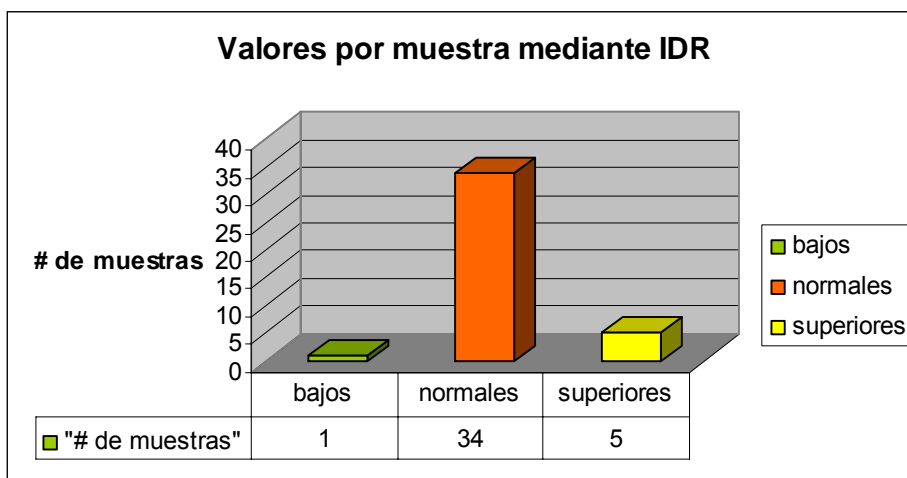


Gráfico 1: Número de muestras que se encuentran dentro de valores normales, por debajo y superiores a los referenciales de IgA en suero encontrados mediante IDR.

En el gráfico 1 se observa que del total de las 40 muestras sujetas a análisis por el método de IDR, 33 se encuentran dentro de los rangos normales, 5 en valores superiores y por último 1 sola muestra se encuentra por debajo de los valores normales, la cual corresponde a aquella que no entró dentro del rango de detección de la placa.

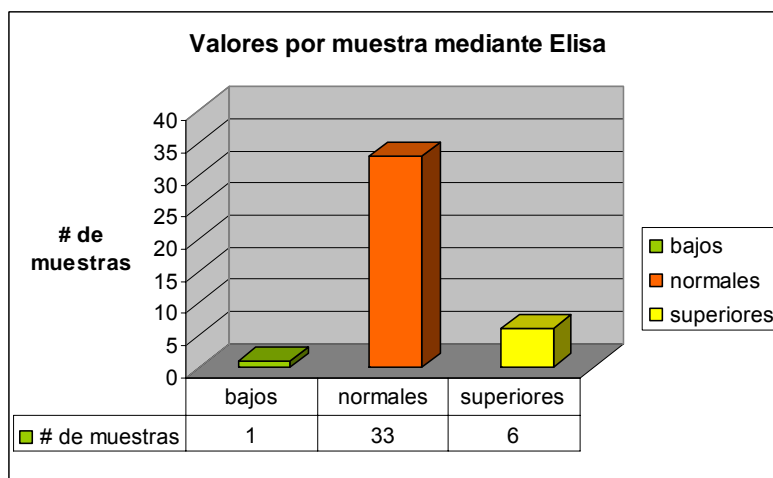


Gráfico 2: Número de muestras que se encuentran dentro de valores normales, por debajo y superiores a los referenciales de IgA en suero encontrados mediante Elisa.



En el gráfico 2 se observa que del total de las 40 muestras sujetas a análisis por el método de Elisa Cuantitativo Indirecto, 33 se encuentran dentro de los rangos normales, 6 en valores superiores, y 1 sola muestra se encuentra por debajo de los valores normales, que corresponde a la que no pudo ser detectada mediante IDR.

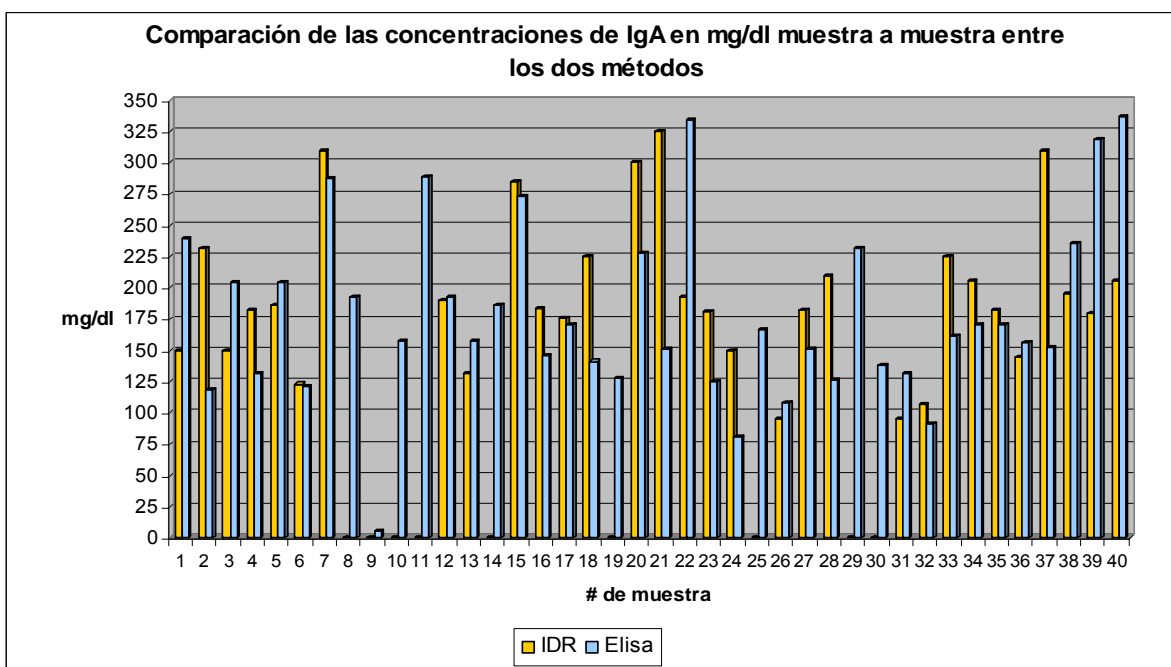


Gráfico 3: Comparación de la concentración individual de IgA de cada muestra obtenidas por IDR y Elisa

En el gráfico 3 se observa como varía la concentración individual de IgA en suero de cada muestra obtenida por los dos métodos de análisis.

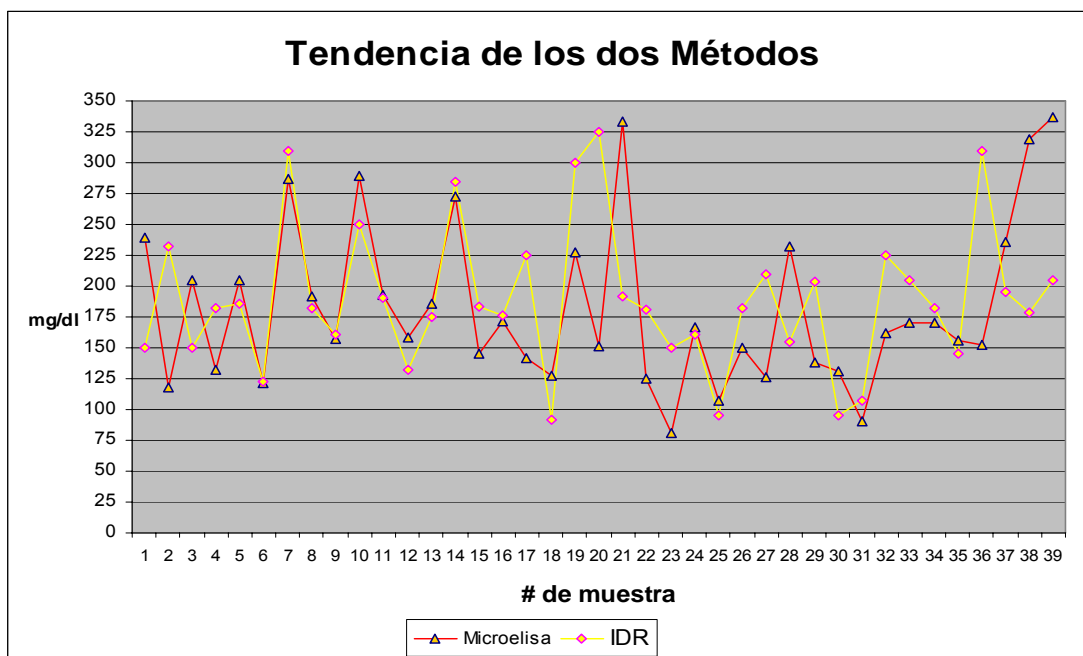


Gráfico 4: *Tendencia muestral de los dos métodos*

En el gráfico 4 se observa la tendencia entre los dos métodos de análisis, la cual muestra que las concentraciones de IgA analizadas por los dos métodos presentan semejanza en los resultados obtenidos, que se aprecia a simple vista en el trazado de las diferentes líneas del gráfico las cuales presentan cierta aproximación.



11- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico, se utilizó el programa de Microsoft Office Excel 2003, con la herramienta de Análisis de datos.

Específicamente se procedió a realizar el análisis T student para medias de dos muestras emparejadas; con esta prueba se comparan las medias y las desviaciones estándar de un grupo de datos (concentración de IgA por los dos métodos) y se determina si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o si sólo son diferencias aleatorias.

Se aplica cuando la población se asume ser normal pero el tamaño muestral es demasiado pequeño como para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación típica en lugar del valor real, por lo tanto esta nos conducirá a resultados más precisos, ya que en ésta investigación el número de muestras utilizado es pequeño (40 muestras).

Para realizar el análisis estadístico se eliminó la muestra #9 por razones anteriormente expuestas.



11.1- Análisis estadístico de los resultados de las concentraciones de IgA obtenidas mediante Inmunodifusión Radial y Elisa Cuantitativo Indirecto.

11.1.1- Estadística descriptiva

Tabla 8: Estadística Descriptiva de los resultados de las concentraciones de IgA en suero sanguíneo obtenidas en los análisis mediante IDR y Elisa.

Elisa Cuantitativo Indirecto	
Media	182,1458974
Error típico	10,56912964
Mediana	161,83
Moda	170,305
Desviación estándar	66,00419346
Varianza de la muestra	4356,553554
Curtosis	0,155232089
Coefficiente de asimetría	0,931730556
Rango	255,905
Mínimo	81,295
Máximo	337,2
Suma	7103,69
Cuenta	39
IDR	
Media	189,3589744
Error típico	9,36818612



Mediana	182
Moda	150
Desviación estándar	58,50430357
Varianza de la muestra	3422,753536
Curtosis	0,299584692
Coefficiente de asimetría	0,634876085
Rango	233,5
Mínimo	91,5
Máximo	325
Suma	7385
Cuenta	39

Los resultados obtenidos en la estadística descriptiva muestran que las medias de las concentraciones de IgA obtenidas por los dos métodos de análisis son: 182,1458974 por Elisa y 189,3589744 mediante IDR; los valores de la desviación estándar fueron de 66,00419346 mediante Elisa y 58,50430357 por IDR. Finalmente la varianza fué de 4356,553554 por Elisa y de 3422,753536 mediante IDR. Se observa que la desviación estándar y la varianza presentan valores no muy cercanos entre sí; esto se debe a que al tomar las muestras aleatoriamente se escogieron niños de edades comprendidas entre 6 y 12 años y además de sexos diferentes, por lo tanto la variación en cada una de las



muestras es relativamente elevada ya que la concentración de IgA en suero sanguíneo varía considerablemente con la edad y el sexo.

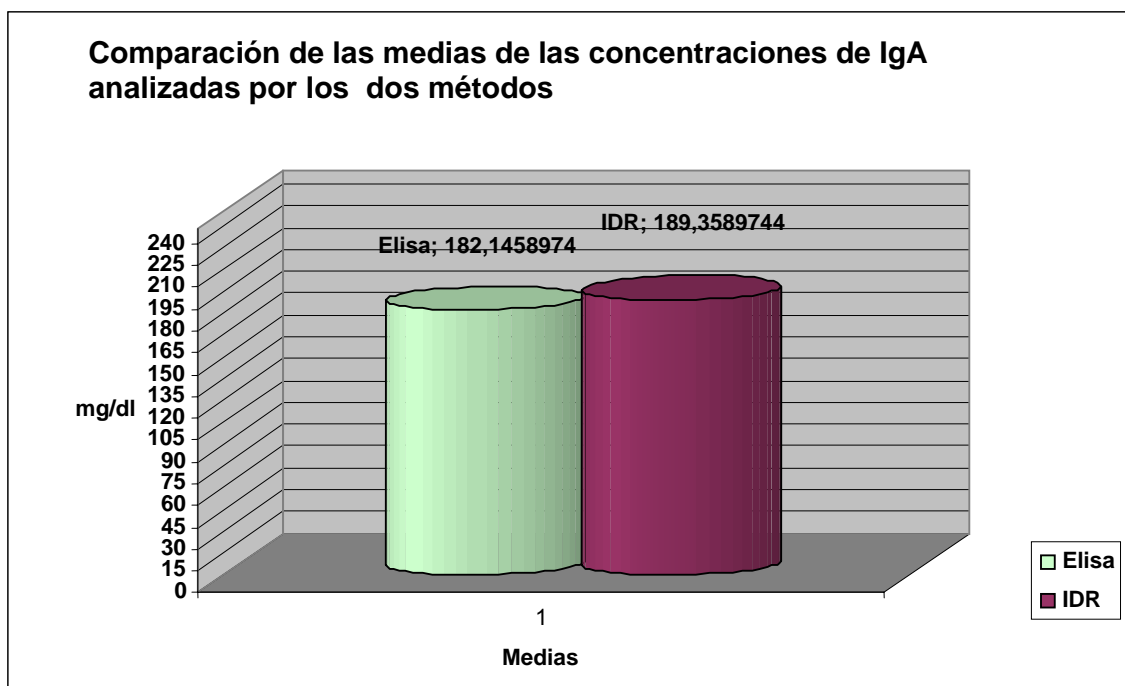


Gráfico 5: Medias de las concentraciones de IgA obtenidas mediante IDR y Elisa

Como se observa en el gráfico 5, vemos claramente que las medias de las concentraciones de IgA obtenidas por los dos métodos presentan valores relativamente cercanos entre sí.

11.1.2- Prueba T Student para muestras emparejadas

Tabla 9: Resultados de la prueba T student para muestras emparejadas



	Elisa	IDR
Media	182,1458974	189,3589744
Varianza	4356,553554	3422,753536
Observaciones	39	39
Coeficiente de correlación de Pearson	0,359393029	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	38	
Estadístico t	-0,63680654	
P(T<=t) una cola	0,264034368	
Valor crítico de t (una cola)	1,685954461	
P(T<=t) dos colas	0,528068737	
Valor crítico de t (dos colas)	2,024394147	

Interpretación del análisis T para muestras emparejadas

H₀= hipótesis nula= $\mu_1=\mu_2$

H₀= no hay diferencias estadísticamente significativas entre un método y otro.

H₁= hipótesis alternativa= $\mu_1\neq\mu_2$

H₁= Si hay diferencias estadísticamente significativas entre un método y otro.

Si el **T estadístico** es menor al **t crítico** no se rechaza la hipótesis nula.

Si el **T estadístico** es mayor al **t crítico** se rechaza la hipótesis nula y se considera la hipótesis alternativa.



T estadístico < t crítico
- 0,63680654 <
2,024394147

Resultado final: Por lo tanto, **no se rechaza la hipótesis nula**. Lo que quiere decir que **no hay diferencias estadísticamente significativas** entre la Inmunodifusión Radial y el Elisa Cuantitativo Indirecto.



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

12- CONCLUSIONES:

En base a los resultados encontrados al comparar las concentraciones de IgA en suero sanguíneo de un total de 40 niños y niñas de edades entre 6 a 12 años con un estado de salud aparentemente normal, obtenidos por dos métodos de análisis, Inmunodifusión Radial y Elisa Cuantitativo Indirecto podemos concluir lo siguiente:

1. Las concentraciones promedios de IgA en suero sanguíneo obtenidas por los dos métodos, IDR (189,358mg/dl) y Elisa Cuantitativo (182,145mg/dl) Indirecto presentaron valores relativamente cercanos entre sí.
2. Durante el análisis, se observó que la concentración de IgA de la muestra # 9 no pudo ser detectada por la IDR, y no así por el Elisa, que muestra un valor de 5,92 mg/dl, lo cual nos confirma el mayor grado de



sensibilidad de este último método por su menor rango de detección.

3. De acuerdo a los resultados finales obtenidos mediante el análisis estadístico, se comprobó la hipótesis, que “no existen diferencias estadísticamente significativas” entre los dos métodos de análisis.
4. Los dos métodos si bien se basan en el mismo principio, tienen diferencias en su grado de complejidad y condiciones que deben cumplir, así la IDR tiene un protocolo de trabajo relativamente sencillo si lo comparamos con el del Elisa. Otro aspecto es el tiempo que tarda el análisis, ya que mediante Elisa se obtienen los resultados en un solo día, mientras que por la Inmunodifusión Radial se deberá esperar como mínimo 48 horas para la entrega de resultados.
5. En cuanto al grupo de niños aparentemente en condiciones de buena salud objeto de nuestro estudio, vemos que a pesar de que las escuelas y de que condiciones socio-económicas en que se encuentran son medias bajas, la mayoría de ellos presentan valores normales de IgA en suero sanguíneo y que estarían



dentro de los rangos de referencia para ambos métodos
de ensayo.



13- RECOMENDACIONES:

1. En niños que presentan afecciones respiratorias y gastrointestinales recurrentes y otro tipo de patologías relacionadas, se recomienda realizar la valoración de IgA para descartar una deficiencia de la misma.
2. Se recomienda a los laboratorios clínicos el uso o aplicación de cualquiera de los dos métodos de análisis para la cuantificación de IgA en suero sanguíneo, ya sea Inmunodifusión Radial o por Elisa Cuantitativo.
3. Antes de empezar el análisis por uno u otro método, se recomienda que se realice un ensayo preliminar para verificar el buen funcionamiento de los reactivos, placas y equipos utilizados. Así también este ensayo nos permitirá conocer las diluciones de muestras, patrones y conjugados adecuadas y necesarias para la realización de las pruebas.
4. Poner mucha atención y orden en el seguimiento de cada uno de los pasos descritos en los protocolos de trabajo, así como también en las condiciones que deberá cumplir cada prueba, ya que de estos



parámetros dependerá la máxima especificidad y sensibilidad de cada una de ellas, permitiéndonos obtener resultados más precisos y confiables.

5. En este estudio se aplicó una técnica llamada “pipeteo reverso”, la cual se recomienda cuando se trabaja con volúmenes muy pequeños de muestra, de tal manera que disminuya la pérdida de esta durante el pipeteo normal, lo que se traduce en un resultado más exacto.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

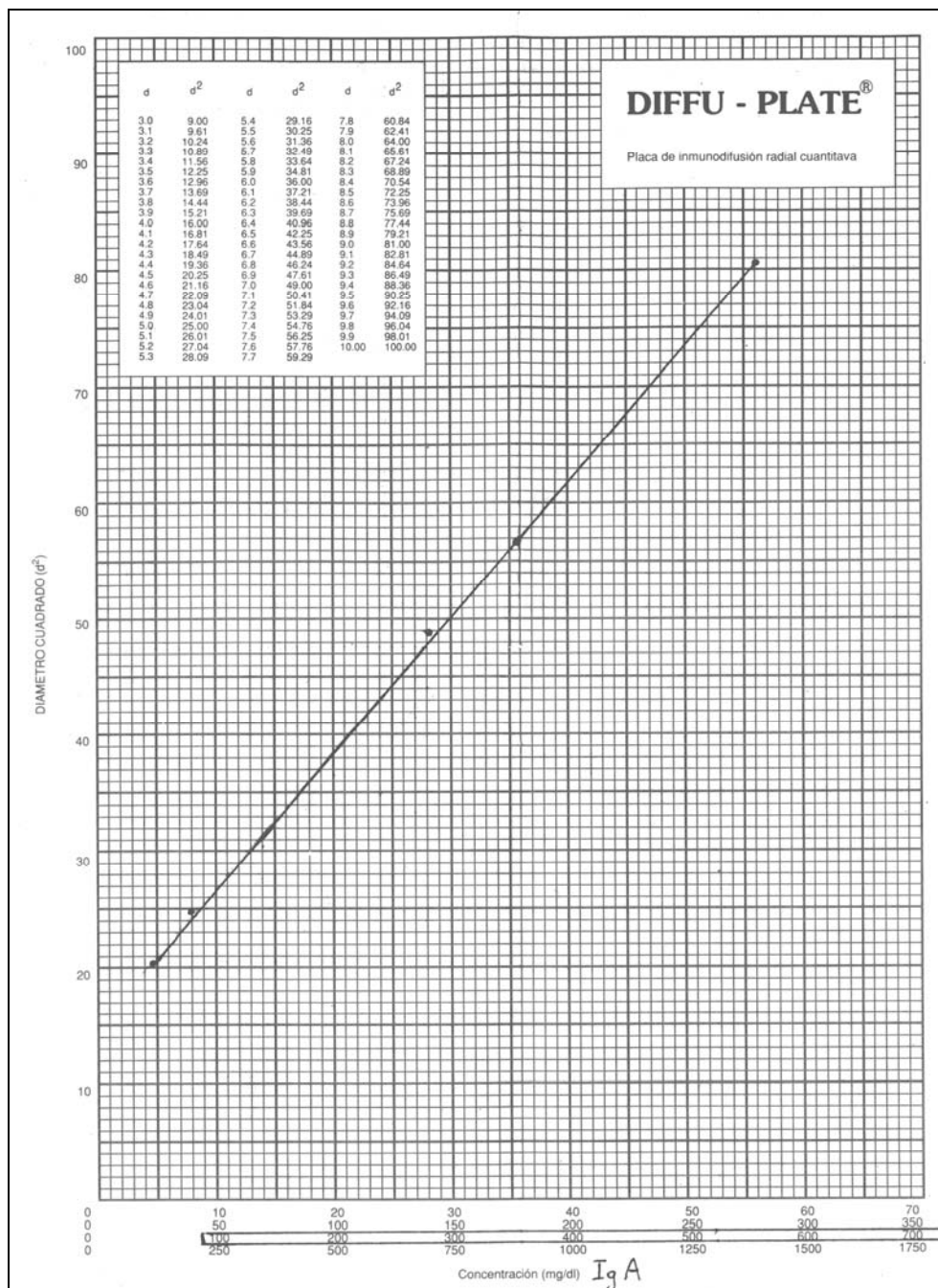
“DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA A EN SUERO SANGUÍNEO POR LOS MÉTODOS DE
INMUNODIFUSIÓN RADIAL Y ELISA CUANTITATIVO INDIRECTO EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR”

ANEXOS



ANEXO 1

Curva de calibración utilizada en la lectura de las concentraciones de IgA mediante Inmunodifusión Radial

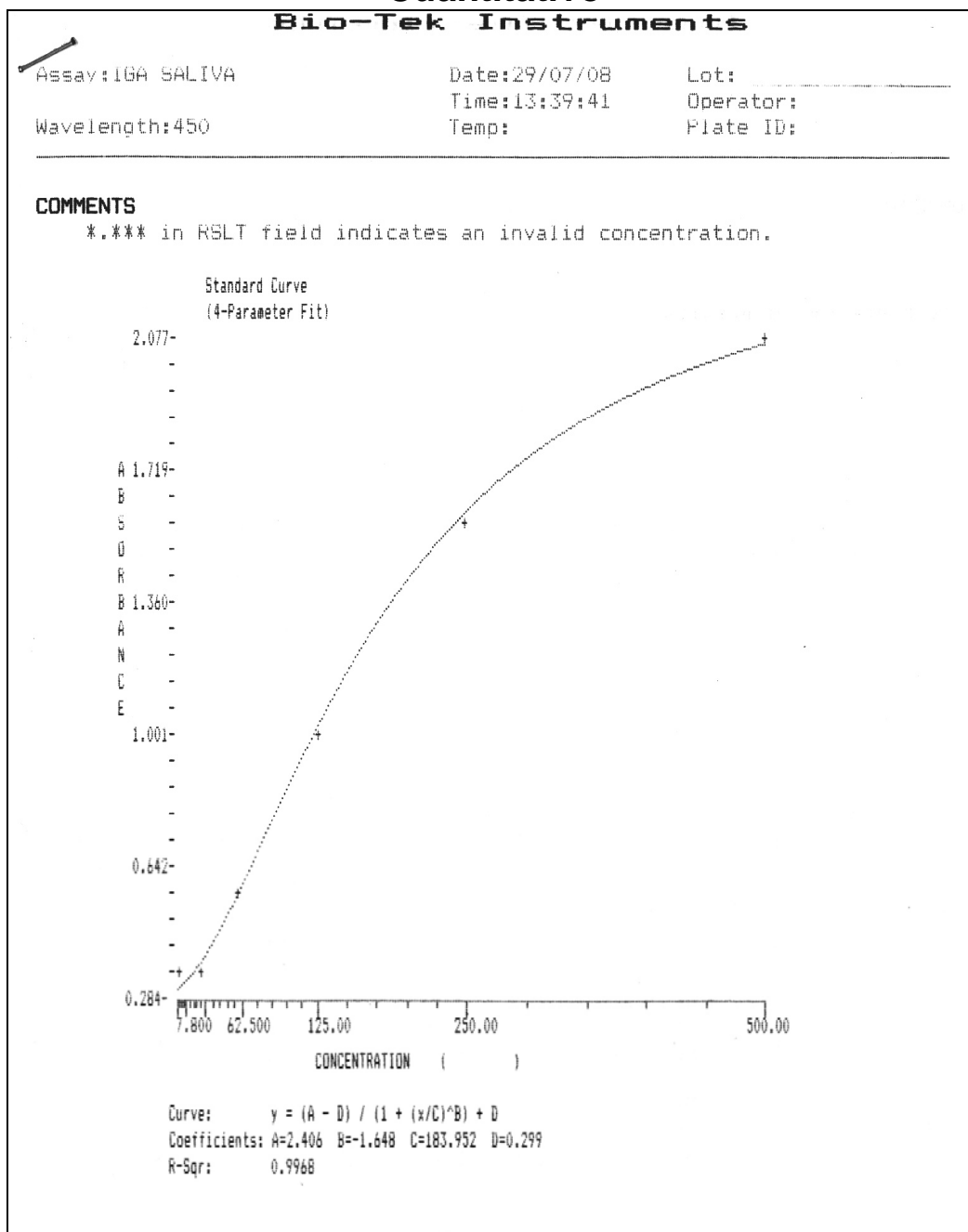


Nota: Los datos para obtener esta curva de calibración corresponden a los de la tabla 2 pág 35.



ANEXO 2

Curva de calibración y ecuación utilizada en la lectura de las concentraciones de IgA mediante Elisa Cuantitativo



Nota: Los datos para obtener esta curva de calibración corresponden a los de la tabla 6 pág 42.



ANEXO 3

Promedios de los diámetros de los halos de precipitación obtenidos mediante Inmunodifusión Radial y absorbancias leídas por Elisa Cuantitativo Indirecto.

Muestras	Diámetro de los halos de precipitación mediante IDR (mm²)	Absorbancias leídas mediante Elisa (Densidad Óptica)
1	32,5	2.150
2	40,9	1.663
3	31,9	1.950
4	35,4	1.747
5	36,6	2.012
6	28,1	1.574
7	51,8	2.071
8	36	1.984
9	-	0,23
10	34,2	1.868
11	44,9	2.164
12	36,6	1.985
13	29,7	1.871
14	34,8	1.965
15	48,3	2.208
16	36	1.816
17	34,8	1.919
18	40,9	1.796
19	24,5	1.726
20	50,4	2.069
21	53,3	1.840
22	37,2	2,228
23	35,4	1.708
24	32,5	1.361



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

“DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA A EN SUERO SANGUÍNEO POR LOS MÉTODOS DE
INMUNODIFUSIÓN RADIAL Y ELISA CUANTITATIVO INDIRECTO EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR”

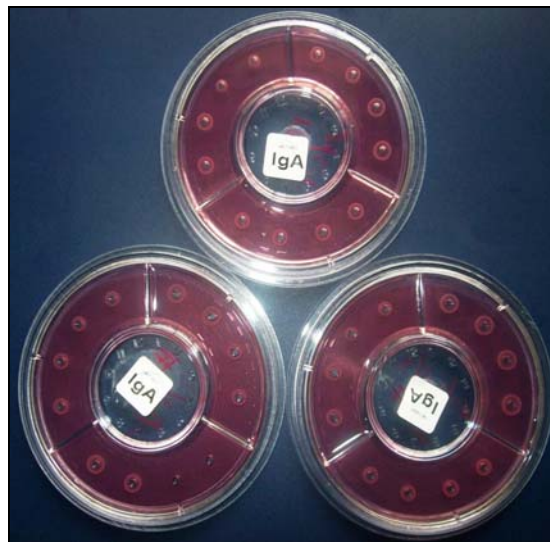
25	33,2	1.903
26	24,5	1.595
27	36	1.839
28	39,7	1.717
29	30,2	2.077
30	38,4	1.780
31	25	1.745
32	26	1.453
33	40,9	1.885
34	39,8	1.916
35	36	1.916
36	31,3	1.861
37	51,8	1.847
38	37,2	1.665
39	36	1.876
40	38,4	1.910



ANEXO 4

Materiales utilizados en el análisis mediante Inmunodifusión Radial

4.1. Placas de Inmunodifusión Radial



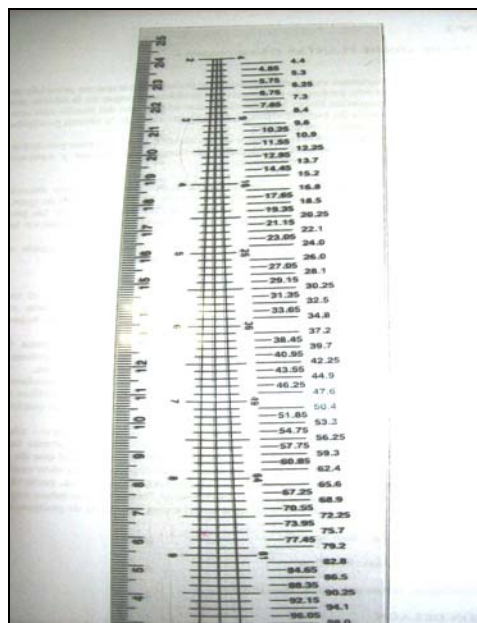
4.2. Cámara Húmeda de incubación medición de halos

4.3. Regla para



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

“DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA A EN SUERO SANGUÍNEO POR LOS MÉTODOS DE
INMUNODIFUSIÓN RADIAL Y ELISA CUANTITATIVO INDIRECTO EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR”





ANEXO 5

Equipos utilizados en el análisis mediante Elisa Cuantitativo

5.1. Lavador de micropocillos Elisa



5.2. Espectrofotómetro y micropocillos Elisa





ANEXO 6

Pipetas automáticas utilizadas en ambos análisis

6.1. Pipetas automáticas fijas y variables





6.2. Pipeta automática de ocho canales y porta reactivos





BIBLIOGRAFIA:

- (1) ABBAS, Abul K., LITCHMAN, Andrew H., POBER, Jordan S., **Inmunología Celular y Molecular**, 2ª edición, Madrid-España, 1995, págs. 4-88.
- (2) ÁNGEL, Gilberto, **Interpretación Clínica del Laboratorio**, 4ª edición, Bogotá-Colombia, 1993, pág. 353.
- (3) CROWTHER, John R, **Methods in Molecular Biology, Elisa Theory and Practice**, vol. 42, New Jersey-EEUU, pág. 36.
- (4) HENRY, John Bernard, M.D, **El laboratorio en el Diagnóstico Clínico**, edición en homenaje a Todd-Stanford & Davidsohn, Madrid-España, 2007, pág. 817.
- (5) MASSEGÚ, J. Valilla, **Pruebas Analíticas en Medicina**, 1ª edición Barcelona-España, 2007, pág. 605.



- (6) ROJAS M, William, **Inmunología**, 14^a edición, Corporación de Investigaciones Biológicas, Medellín-Colombia, 2007, págs. 1-3, 58-63, 134-162.
- (7) TALASKA FISCHBACH, Frances, M.D.P., **Manual de pruebas Diagnósticas**, Tomo II, (Cáp. 8 Pruebas Inmunodiagnósticas), 5^a edición, México, 1997, pág. 589.
- (8) Manual para técnica de determinación de IgA por Inmunodifusión Radial de la casa comercial Biocientífica SA.
- (9) Manual para técnica de determinación de IgA por Elisa Cuantitativo de la casa comercial Bethyl Laboratorios.

INTERNET

- (10) <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/odontologia/2005197/capitulos/cap2/231.html>

Disponible: 19/10/09 Hora: 11:30



(11) http://es.wikipedia.org/wiki/Inmunidad_celular

Disponible: 19/10/09 Hora: 11:33

(12) http://es.wikipedia.org/wiki/Inmunidad_humoral

Disponible: 19/10/09 Hora: 11:35

(13) http://es.diagnosispro.com/diagn%C3%B3stico_diferencial_para_deficiencia-de-iga-selectiva-causas/14300-154.html

Disponible: 13/11/09 Hora: 16.15

(14) http://www.primaryimmune.org/publications/book_pats/esp_ch04.pdf

Disponible: 13/11/09 Hora: 16:30

(15) <http://www.rmu.org.uy/revista/1991v1/art2.pdf>

Disponible: 13/11/09 Hora: 17:00



(16) http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult_urology_sp/iganeph.cfm

Disponible: 13/11/09 Hora: 17:20

(17) <http://scielo.isciii.es/pdf/medif/v12n2/notacli1.pdf>

Disponible: 13/11/09 Hora: 18:10

(18) http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1131,57682002000200008&script=sci_arttext

Disponible: 13/11/09 Hora: 18:15

(19) <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001055.htm>

Disponible: 13/11/09 Hora: 19:00

(20) <http://www.medwave.cl/medios/perspectivas/ACTASgrupoESCLEROSIS/CarcamoFigura7.jpg>

Disponible: 27/09/09 Hora: 21.00



(21) <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/imagenes/3esquema5b.gif>

Disponible: 27/09/09 Hora: 21:10

(22) http://4.bp.blogspot.com/_aTA09RJnDk/R1WI4SeTKI/AAAAAAAAAFI/FvUdRoRIZoE/s200/limfocito.jpg

Disponible: 27/09/09 Hora: 21:15

(23) http://www.progressivedairyhay.com/features/full_photos/2007/09/0907_thayer_1_full.jpg

Disponible: 27/09/09 Hora: 21:30

(24) <http://www2.uah.es/jcdiez/b-fbbma/tema6/inmunoglobulina.gif>

Disponible: 27/09/09 Hora: 21:35

(25) <http://www.aeped.es/vacunas/pav/Mod3/Images/01030136.jpg>

Disponible: 27/09/09 Hora: 22:10



(26) http://mural.uv.es/chouna/index_archivos/3.png

Disponible: 29/09/09 Hora: 09:40

(27) http://www2.uah.es/genetica_juangonzalez/GeneticaHumana/Temario/Tema13/Imagenes-13/GenescadenaH.jpg&imgrefurl

Disponible: 29/09/09 Hora: 10:00

(28) <http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/inmune/imagenes/dibujos/ainmunoa.jpg>

Disponible: 29/09/09 Hora: 10:35

(29) <http://www.oldearth.wordpress.com/2008/09/26/los-mecanismos-de-la-evolucion-en-la-diversidad-de-anticuerpos/&usg>

Disponible: 29/09/09 Hora: 11:00

(30) <http://budacuantico.blogspot.com/2009/05/el-sistema-inmunitario-1parte.html&usg>

Disponible: 29/09/09 Hora: 11:05