

Cuantificación de la inmunoglobulina G y la albúmina en el líquido cefalorraquídeo mediante las modificaciones de las técnicas para otros fluidos biológicos

Mélany Betancourt Loza¹, Anay Cordero Eiriz², Marisol Peña Sánchez³, Sergio González García⁴, Lourdes Lorigados Pedres⁵, Alina González-Quevedo⁶

¹Licenciada en Biología. Reserva Científica. Instituto de Neurología y Neurocirugía. La Habana, Cuba

²Licenciada en Farmacia. Master en Neurociencias del Comportamiento. Investigador Auxiliar. Instituto de Neurología y Neurocirugía. La Habana, Cuba

³Licenciada en Farmacia. Master en Neurociencias del Comportamiento. Investigador Auxiliar. Instituto de Neurología y Neurocirugía. La Habana, Cuba

⁴Doctor en Ciencias de la Salud. Profesor e Investigador Titular. Instituto de Neurología y Neurocirugía. La Habana, Cuba

⁵Doctor en Ciencias de la Salud. Profesor e Investigador Titular. Centro Internacional de Restauración Neurológica. La Habana, Cuba

⁶Doctor en Ciencias Médicas. Profesor e Investigador Titular. Instituto de Neurología y Neurocirugía. La Habana, Cuba

Recibido: 22.1.2016. Aceptado: 29.09.2016. Publicado: 01.10.2016.

Correspondencia: Dra.C. Alina González-Quevedo. Laboratorio de Neurobiología. Instituto de Neurología y Neurocirugía. Calle 29 # 112, esquina D, Vedado. La Habana 10400, Cuba. Correo electrónico: aglez@infomed.sld.cu

Cómo citar este artículo (Estilo NLM): Betancourt Loza M, Cordero Eiriz A, Peña Sánchez M, González García S, Lorigados Pedres L, González-Quevedo A. Cuantificación de la inmunoglobulina G y la albúmina en el líquido cefalorraquídeo mediante las modificaciones de las técnicas para otros fluidos biológicos. Rev Cubana Neurol Neurocir. [Internet] 2016 [citado día, mes y año];6(1):9-16. Disponible en: <http://www.revneuro.sld.cu>

© 2016 Sociedad Cubana de Neurología y Neurocirugía – Revista Cubana de Neurología y Neurocirugía

www.sld.cu/sitios/neurocuba – www.revneuro.sld.cu

Editor: Dr. P. L. Rodríguez García

RESUMEN

Objetivo: Evaluar los resultados de la estimación del estado funcional de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR) y la síntesis intratecal de inmunoglobulina G (IgG) por el sistema nervioso central mediante las modificaciones de las técnicas comerciales diseñadas para otros fluidos biológicos.

Métodos: A muestras de LCR y suero de 61 pacientes se les realizaron electroforesis de disco en geles de poliacrilamida y cuantificación de proteínas totales (PT) en el Instituto de Neurología y Neurocirugía, Habana, Cuba (INN), entre los meses de abril y diciembre de 2014. Se determinaron las concentraciones de albúmina e IgG empleando paralelamente técnicas comerciales modificadas en el laboratorio y métodos validados para estos estudios. Se calculó el cociente albúmina (Qalb) y el índice IgG, como indicadores del estado funcional de la barrera sangre-LCR (BS-LCR) y de la síntesis intratecal (SIT), respectivamente.

Resultados: Las PT y los patrones de electroforesis se correlacionaron con el Qalb y albúmina, realizado por las técnicas modificadas. No se encontraron diferencias significativas entre las cuantificaciones de las técnicas validadas y modificadas para los valores de albúmina en LCR ($Z=0,41$; $p=0,6791$), albúmina en suero ($Z=0,08$; $p=0,9382$), el Qalb ($Z=0,21$; $p=0,8361$), IgG en LCR ($Z=1,65$; $p=0,0995$) e índice IgG ($Z=1,10$; $p=0,2721$).

Conclusiones: Se demuestra que estas modificaciones en técnicas comerciales diseñadas para otros fluidos biológicos resultan útiles para estimar la funcionalidad de la BS-LCR y calcular la SIT de inmunoglobulinas. Las modificaciones introducidas a la técnica turbidimétrica y al UMEELISA pueden ser estandarizadas para su validación en el diagnóstico de daño de la BS-LCR y de síntesis intratecal de IgG por el sistema nervioso.

Palabras clave. Albúmina. Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo. Electroforesis. Inmunoglobulina G. Líquido cefalorraquídeo. Síntesis intratecal de inmunoglobulinas.

Immunoglobulin G and albumin quantification in the cerebrospinal fluid by modifications in techniques for other biological fluids

ABSTRACT

Objective: To evaluate the results of estimating the functional status of blood-cerebrospinal fluid barrier (B-CSFB) and intrathecal immunoglobulin synthesis (ITS) of IgG for central nervous system by modified commercial techniques designed for other biological fluids.

Methods: Disc polyacrylamide gel electrophoresis and quantification of CSF total protein in CSF and serum of 61 patients were conducted at the Institute of Neurology and Neurosurgery (INN) between April and September 2014. The concentration of albumin and IgG was determined by commercial standardized techniques and by modifications of commercial techniques. Albumin ratio and IgG index were calculated and employed to evaluate B-CSFB permeability and ITS, respectively.

Results: Total protein and protein electrophoresis patterns were correlated with the quantifications performed by modified commercial techniques. There was no significant difference between validated commercial techniques and modified techniques for quantifications of CSF albumin ($Z=0,41$; $p=0,6791$), serum albumin ($Z=0,08$; $p=0,9382$), Qalb ($Z=0,21$; $p=0,8361$), CSF IgG ($Z=1,65$; $p=0,0995$) and IgG index ($Z=1,10$; $p=0,2721$).

Conclusions: The immunological studies in CSF obtained from modifying commercial techniques designed for other biological fluids are

useful to estimate the functionality of B-CSFB and intrathecal immunoglobulin synthesis. The modifications carried out for the turbidimetric technique and for the UMELISA kit should be standardized for the validation of BCSF-B permeability and IgG ITS by the nervous system.

Key words. Albumin. Blood-cerebrospinal fluid barrier. Cerebrospinal fluid. Electrophoresis. Immunoglobulin G. Intrathecal immunoglobulin synthesis.

INTRODUCCIÓN

El líquido cefalorraquídeo (LCR) asiste las necesidades metabólicas del cerebro sirviendo como medio para el intercambio de nutrientes y productos de desechos entre el tejido nervioso y la sangre, a través de la barrera sangre-LCR (BS-LCR) (1). Las alteraciones en su composición proteica pueden definir ciertas enfermedades y ser usadas para evaluar el beneficio de las intervenciones terapéuticas (1,2). El análisis proteico del LCR a través de la electroforesis de las proteínas del LCR en gel de poliacrilamida brinda información importante acerca del estado funcional de la BS-LCR y la síntesis intratecal (SIT) de las inmunoglobulinas, ofreciendo ventajas significativas por su simplicidad, reproducibilidad y alta resolución en el diagnóstico de un posible trastorno en el SNC (3). Sin embargo, es una técnica cualitativa, por lo que el empleo de métodos cuantitativos, simples y accesibles, ayuda a complementar estos estudios.

Entre los métodos cuantitativos ampliamente utilizados se encuentran el cociente albúmina (Qalb) y el índice de IgG (1). Ambos son aceptados en los estudios clínicos y de investigación en humanos: el primero como marcador del estado de la BS-LCR (4), y el índice como reflejo de un proceso de SIT de dicha inmunoglobulina en el SNC (1,5). Para el cálculo de estos dos parámetros se necesita de la cuantificación de albúmina e IgG en muestras de sangre y LCR, lo que requiere de la compra de equipamiento y reactivos comerciales que son de alto valor en el mercado. El aprovechamiento de la posibilidad de modificar los estuches reactivos de circulación en Cuba empleados para cuantificar albúmina e IgG en otros fluidos biológicos supone una nueva prestación para los mismos y un ahorro importante en la estimación del estado funcional de la BS-LCR y la SIT.

El análisis de las proteínas de LCR tiene un papel importante para excluir o confirmar algunos trastornos neurológicos, así como para el seguimiento clínico de los pacientes y/o su tratamiento (1,4). La disponibilidad de las técnicas cuantitativas que permitan realizar los estudios señalados se hace necesaria para una mejor interpretación de resultados, así como para definir los criterios acerca del método más útil para la confirmación diagnóstica.

Con esta investigación se pretende evaluar los resultados de la estimación del estado funcional de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR) y la síntesis intratecal de inmunoglobulina G (IgG) por el sistema nervioso central mediante las modificaciones de las técnicas comerciales diseñadas para otros fluidos biológicos.

MÉTODOS

Pacientes y obtención de muestras biológicas

Se estudiaron 61 pacientes (31 varones y 30 mujeres) con edades entre 14 y 85 años (media de 44,2 años), ingresados en el Instituto de Neurología y Neurocirugía (INN) de la Habana (Cuba), entre los meses de abril y diciembre de 2014, con sospecha de alguna enfermedad neurológica. Se obtuvieron 2 mL de LCR por punción lumbar no traumática, siguiendo las normas éticas reglamentadas, y con previo consentimiento informado del paciente.

Se descartaron las muestras turbias, pigmentadas o con presencia de hematíes después de centrifugadas a 1 000 rpm durante 10 minutos. Se extrajeron 5 mL de sangre por punción venosa para obtener suero, la cual fue centrifugada a 2 500 rpm durante 10 minutos. Estas muestras de LCR y suero se conservaron a -20°C hasta el montaje de las técnicas.

Procedimientos

Cuantificación de las proteínas totales de LCR

La cuantificación se realizó por el método descrito por Lowry (6), el cual se basa en la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los valores de referencia de las proteínas totales (PT) son de 22,30 a 50,20 mg/dL (3).

Electroforesis de disco en poliacrilamida en condiciones nativas

El fraccionamiento de las proteínas del LCR se llevó a cabo en gel de poliacrilamida al 7,5 %, según la técnica descrita en detalle con anterioridad (3). Los patrones electroforéticos del LCR se clasificaron de acuerdo a lo propuesto por González-Quevedo et al (1) en:

- Patrón electroforético de aspecto normal (PEAN).
- Patrón de disfunción de la BS-LCR (DBSL).
- Patrón gammaglobulínico con o sin bandas oligoclonales (BO).
- Combinación del patrón de disfunción de la BS-LCR y el patrón gammaglobulínico.
- Patrón degenerativo.

Determinación de las concentraciones de IgG en suero y LCR a partir de modificaciones a una técnica comercial

La IgG se cuantificó en muestras de suero y LCR a través de un estuche proveniente de la firma italiana CPM Scientifica Technologie Biomediche (Roma, Italia). Se basa en un

método turbidimétrico concebido para la cuantificación de IgG en suero con lectura en un espectrofotómetro.

En la cuantificación de IgG en suero se realizó una modificación a los volúmenes de reacción manteniendo la proporcionalidad entre ellos, con el objetivo de ser leídos en un equipo de ELISA PR-521 para placas de 96 pocillos. Las muestras de suero, los calibradores y controles se diluyeron 1:10 en solución salina y se aplicaron 9 µL por duplicado en una placa ELISA con capacidad total de 300 µL por pocillo.

Posteriormente se adicionaron 280 µL de la solución tampón y se leyó la primera densidad óptica (DO) a la longitud de onda (λ) de 340 nm. Un volumen de 33 µL del anticuerpo fue adicionado y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. La lectura final de DO se realizó a 340 nm. Para la realización de la curva de calibración se empleó un multicalibrador de proteínas específicas (CPM Científica) con las siguientes concentraciones: 1,65 g/L; 3,29 g/L; 6,58 g/L; 13,16 g/L y 26,32 g/L. El control multiparamétrico de proteínas específicas de la firma utilizado tenía una concentración de 8,77 g/L (7,02–10,50).

Para la determinación de IgG en LCR se realizó una adaptación en las proporciones de los volúmenes de reacción y las condiciones de incubación de la técnica descrita por la firma CPM Científica para IgG en suero. El control IMT de la firma CPM Científica de concentración 9 g/L se diluyó 1:100 con solución salina fisiológica, para una concentración final de 9 mg/dL. Mediante la dilución 1:3 de esta solución se obtuvo el control de la técnica de concentración 3 mg/dL.

Para la curva de calibración se empleó el OneTrol de CPM Científica (5 g/L). Los puntos preparados fueron: 25,00 mg/dL; 10,00 mg/dL; 5,00 mg/dL; 2,50 mg/dL; 1,25 mg/dL. En cada pocillo se aplicó 50 µL de calibradores, controles y muestras sin diluir, todos por duplicado. Posteriormente se adicionaron 150 µL de la solución tampón y se leyó una primera DO ($\lambda=340$ nm). Se adicionaron 100 µL del anticuerpo diluido 1:5 en PBS, se incubó la mezcla por 30 minutos a 37 °C en una incubadora y se realizó una lectura final a 340 nm.

Se calculó la diferencia de las DO iniciales y finales ($\Delta DO = DO_{\text{final}} - DO_{\text{inicial}}$) para cada muestra, control y calibrador. Se realizó un ajuste de regresión lineal simple para el cálculo de las concentraciones de las muestras a partir de la curva estándar. Los valores de referencia para la IgG en LCR son menores que 3 mg/dL y para las muestras de suero de 6,80 a 14,40 g/L en adultos y niños mayores de diez años, según los valores de referencia de la firma CPM Científica.

Determinación de las concentraciones de albúmina en LCR y suero a partir de modificaciones a una técnica comercial

El procedimiento empleado en el INN para la cuantificación de la albúmina en LCR y suero se realizó mediante una adaptación de la técnica de UMELISA Microalbuminuria (TECNOSUMA, Cuba) para la cuantificación de albúmina humana en muestras de orina. Esta determinación se basa en un ensayo inmunoenzimático heterogéneo tipo "sándwich" que utiliza como fase sólida tiras de ultramicroELISA (10 µL por pocillo), revestidas con anticuerpos monoclonales contra la albúmina humana, obtenidos en ratones de la línea Balb/c.

Para las determinaciones de albúmina, las muestras de suero se diluyeron previamente 1:200 en solución salina fisiológica. Posteriormente las muestras de suero y LCR se diluyeron 1:40 y 1:50 sucesivamente con la solución de trabajo R2, para una dilución final de 1:2000. Los pasos

sucesivos para la cuantificación de albúmina en las muestras de LCR y suero se realizaron según la técnica descrita en el UMELISA Microalbuminuria. Se aplicaron 10 µL de control, muestras y calibradores, dejándolos reaccionar durante 30 minutos, luego se adicionó el conjugado y posteriormente la enzima peroxidasa, cada uno incubado durante 30 minutos. Se hicieron lavados de 30 segundos intercalados entre estos pasos. Las lecturas de la intensidad de la fluorescencia emitida se realizaron en un lector de ELISA PR521 de la serie SUMA.

Las concentraciones de albúmina en las muestras de LCR y suero se calcularon mediante la interpolación de sus respectivas fluorescencias en una curva estándar, por un ajuste de regresión lineal simple. Los puntos de la curva fueron: 0 mg/dL; 2,50 mg/dL; 5,00 mg/dL; 10,00 mg/dL; 20,00 mg/dL y 40,00 mg/dL. Las concentraciones de albúmina en las muestras de LCR se expresaron en mg/dL y solo para las muestras de suero se multiplicaron por el factor de dilución para ser expresadas en g/L. Los valores de referencia para las concentraciones de albúmina en LCR reportados como normales son aquellos que se encuentran entre 10,00 y 30,00 mg/dL (4) y para suero entre 38,00 y 54,00 g/L (7).

Determinación de las concentraciones de albúmina e IgG en suero y LCR por técnicas comerciales validadas para estos estudios

Se seleccionaron 16 muestras del total de casos, a las cuales se cuantificó la albúmina e IgG en suero y LCR empleando técnicas nefelométricas comerciales validadas internacionalmente para estos estudios. Para la determinación de albúmina en suero y LCR se empleó el estuche Reactif albumin Kit IMMAGE (Beckman Coulter Inc., Irlanda) y para IgG en suero y LCR se empleó el estuche IgG Reagent Kit IMMAGE (Beckman Coulter Inc., Irlanda). Las lecturas se realizaron en un equipo automatizado Image® 800 Beckman Coulter. Estas técnicas se basan en la reacción que ocurre entre el antígeno (albúmina o IgG) presente en la muestra con el anticuerpo específico proporcionado por el estuche, la cual forma un complejo que produce una desviación del haz de luz que se hace incidir sobre la cubeta de reacción. Se utilizan los controles comerciales establecidos para estas técnicas (Vigil control).

Cálculo del Índice IgG y el Qalbúmina

El estado funcional de la BS-LCR se determinó mediante el Qalb ($Q_{\text{alb}} = [\text{Alb}]_{\text{LCR}} / [\text{Alb}]_{\text{suero}}$), teniendo en cuenta su relación con la edad del paciente (8):

- 17–30 años: 1,70–5,70
- 31–40 años: 1,80–6,20
- 41–50 años: 2,00–7,20
- 51–60 años: 2,10–8,90
- 61–77 años: 2,20–9,00

A partir de los valores de concentración de IgG y albúmina en las muestras de LCR y suero determinadas por las técnicas modificadas y por las validadas, se calculó el índice IgG mediante la fórmula propuesta por Delpech y Lichtblau en 1972 (1,9):

$$\text{Índice IgG} = \frac{([\text{IgG}]_{\text{LCR}} / [\text{IgG}]_{\text{suero}})}{([\text{Alb}]_{\text{LCR}} / [\text{Alb}]_{\text{suero}})}$$

Para este cálculo se excluyeron las muestras con un Qalb superior a 20 (cuando es marcada la disfunción de la barrera) debido a la posibilidad de falsear los valores del índice (1). El valor normal reportado para este indicador es de 0,50 y es considerado anormal cuando sobrepasa los 0,70 (9).

Análisis estadístico

Para la confección de la base de datos y el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 8.0 para Windows. Se determinó la normalidad de las variables, la cual no fue cumplida. Se empleó la mediana y el 10–90 percentil para su descripción.

En la comparación de variables de dos categorías se empleó la prueba de Mann–Whitney; las variables continuas se correlacionaron mediante el coeficiente de Spearman, y las categóricas mediante la prueba de χ^2 . Se aplicó la prueba de Wilcoxon para comparar variables dependientes. El nivel de significación fue de $p < 0,05$.

Aspectos éticos

La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Investigación del INN y se realizó de acuerdo con lo establecido en la última versión de la Declaración de Helsinki (10). Los estudios se realizaron con el consentimiento informado de los pacientes y la confidencialidad de sus resultados.

RESULTADOS

Los resultados de los estudios de proteínas totales, IgG y albúmina en LCR y suero medidos a partir de las modificaciones realizadas a técnicas comerciales muestran una correlación altamente significativa entre las PT y las concentraciones de IgG en LCR ($r=0,8141$; $p=0,0000$). Igualmente, las correlaciones entre las PT y la albúmina en LCR ($r=0,8578$; $p=0,0000$) y Qalb ($r=0,8303$; $p=0,0000$) resultaron significativas (Tabla 1).

La separación electroforética de las proteínas del

Tabla 1. Cuantificación de proteínas totales en LCR y de albúmina e IgG en LCR y suero a partir de modificaciones de las técnicas comerciales.

Variables bioquímicas (n=61)	Mediana (10–90 percentil)
Proteínas totales (mg/dL)	55,7 (36,2–109,8)
Albúmina LCR (mg/dL)	27,7 (14,7–44,8)
Suero (g/L)	37,8 (29,2–45,6)
IgG LCR (mg/dL)	3,5 (1,3–9,9)
Suero (g/L)	10,0 (6,27–14,4)

*IgG: inmunoglobulina G; LCR: líquido cefalorraquídeo.

LCR por la electroforesis de disco mostró que aproximadamente la mitad de las muestras reflejaban un patrón normal. Para el resto de los casos, el daño de BS–LCR resultó el patrón más frecuente, solo un 6,6 % de las muestras presentaba el patrón gammaglobulínico (presencia

de BO) y la combinación del patrón gammaglobulínico con el de DBSL (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de patrones de electroforesis en la muestra.

Patrones electroforéticos del LCR	Cantidad de individuos (%)
Aspecto normal	29 (47,5%)
Patrón de disfunción de la barrera sangre–líquido cefalorraquídeo (DBSL)	28 (45,9%)
Bandas oligoclonales (BO)	1 (1,7%)
DBSL+ BO	3 (4,9%)
Patrón degenerativo	0

La relación entre el informe de daño de la BS–LCR según el Qalb (teniendo en cuenta la edad) y la electroforesis de disco (agrupados en presencia o no de DBSL), resultó altamente significativa en este estudio ($p=0,0000$) (Figura 1).

Los casos informados con BO según la electroforesis tuvieron una mediana de valores del índice IgG estadísticamente superior a la mediana de los casos con ausencia de BO ($p=0,0338$). El percentil superior del índice IgG para los casos con ausencia y presencia de BO fue de 0,80, y 2,04 respectivamente.

A su vez, el 77,78 % de los casos que presentaban SIT por el índice IgG no fueron informados con BO por la electroforesis. Sin embargo, la totalidad de los casos (100 %) que no presentaban SIT según el índice tampoco se le informaba la presencia de BO por la electroforesis (Figura 2).

Comparación de la cuantificación de albúmina e IgG por técnicas modificadas respecto a las técnicas validadas

El análisis comparativo de los valores de albúmina e IgG, así como el Qalb y el índice IgG, calculado por las técnicas modificadas y validadas, se realizó por la prueba pareada de Wilcoxon. La comparación no mostró diferencias entre los valores obtenidos de albúmina en LCR ($Z=0,41$; $p=0,6791$), y el Qalb ($Z=0,21$; $p=0,8361$) (Figura 3).

Para las concentraciones de IgG en LCR y el índice IgG tampoco se encontraron diferencias (IgG: $Z=1,65$; $p=0,0995$) (índice IgG: $Z=1,10$; $p=0,2721$) (Figura 4) entre ambas técnicas. Al comparar las determinaciones de IgG en las muestras de suero, las diferencias entre ambas técnicas fueron significativa ($Z=2,69$; $p=0,0072$), no siendo así para las determinaciones de albúmina en sangre ($Z=0,08$; $p=0,9382$).

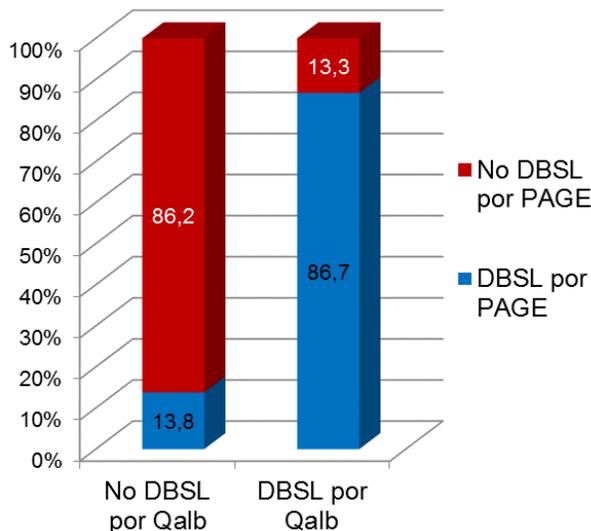


Figura 1. Comparación entre el informe de daño de barrera sangre-LCR (DBSL) por electroforesis de disco en soporte de poliacrilamida (PAGE) y el cociente albúmina (Qalb) calculado a partir de técnicas comerciales modificadas.

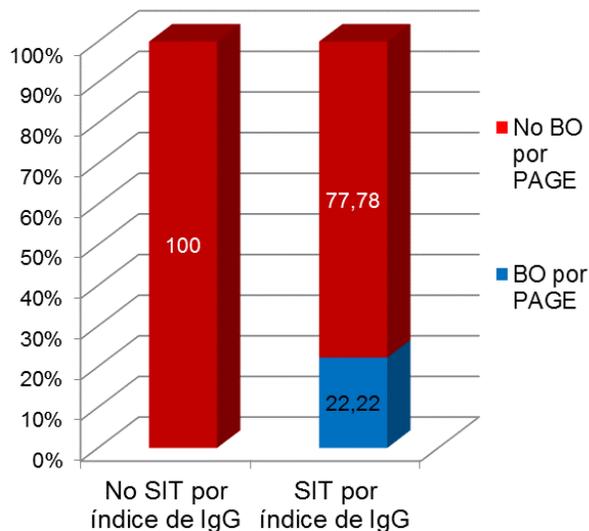


Figura 2. Comparación del porcentaje de síntesis intratecal (SIT) informados por el índice IgG y la aparición de bandas oligoclonales (BO) en la electroforesis de disco en soporte de poliacrilamida (PAGE).

DISCUSIÓN

Cuantificación de albúmina e IgG mediante técnicas modificadas

Las cifras de las variables cuantificadas en LCR resultaron ligeramente superiores a los valores reportados previamente en sujetos sanos (3,4,11). Existen informes de concentraciones de PT semejantes a los obtenidos en nuestra investigación que han sido reportados en estudios

de enfermedades desmielinizantes (12), enfermedad cerebrovascular isquémica (13) y enfermedades infecciosas (14). Estos resultados están relacionados con el hecho de que los pacientes incluidos en esta investigación ingresaron por sospecha de alguna enfermedad neurológica.

La mayoría de los valores de IgG y albúmina en suero de las muestras estudiadas se encontraron en el rango de valores normales (7), los cuales también han sido publicados previamente por nuestro grupo de trabajo (13). Estos valores normales parecen sugerir que los pacientes no presentaban enfermedades sistémicas asociadas.

La albúmina e IgG contribuyen de forma importante a las concentraciones de proteínas en el LCR (2), por lo que es esperado que exista una relación entre ellas. Esto se comprueba en la presente investigación y también ha sido reportado anteriormente (15). De igual forma, hay relación entre las concentraciones de PT y el Qalb ya que ambos son indicadores del estado funcional de la BS-LCR (4); se han descrito una serie de afecciones neurológicas en las cuales se puede producir una ruptura de esta barrera por dos mecanismos fundamentales: disminución de la velocidad de flujo del LCR y/o trasudación de proteínas plasmáticas hacia el LCR (1).

Algunas publicaciones previas también han señalado la prevalencia de los patrones PEAN y DBSL (1,3,13). La disfunción de la BS-LCR es muy frecuente en algunas enfermedades neurológicas como son el síndrome Guillain-Barré, las enfermedades desmielinizantes crónicas inflamatorias, las meningoencefalitis, los tumores cerebrales, y otras (1). Sin embargo, mediante la electroforesis de proteínas,

las anomalías en la fracción gamma globulínica solo son visibles cuando tienen un patrón de BO (13); un patrón policlonal de SIT de inmunoglobulinas es más difícil de diferenciar debido a la baja capacidad de separación de las fracciones de la zona gamma.

La alta frecuencia de casos con daño de BS-LCR pudiera indicar que, de los factores descritos por Reiber y Peter (16) para explicar los cambios en la concentración de proteínas en el LCR, la funcionalidad de la BS-LCR es el aspecto que

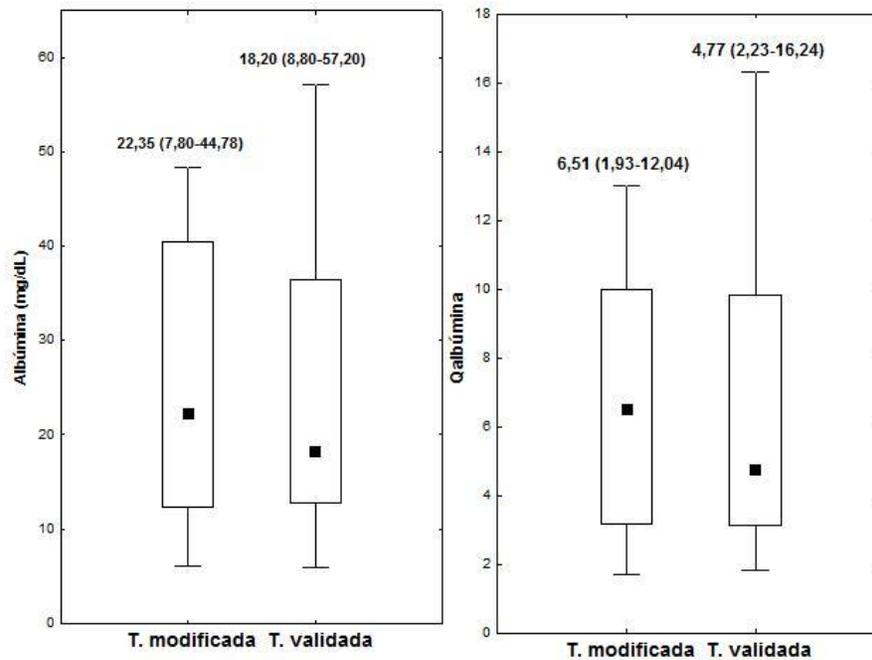


Figura 3. Comparación de los valores de albúmina en LCR y Qalb [Mediana (10-90th)] entre las técnicas modificadas y validadas.

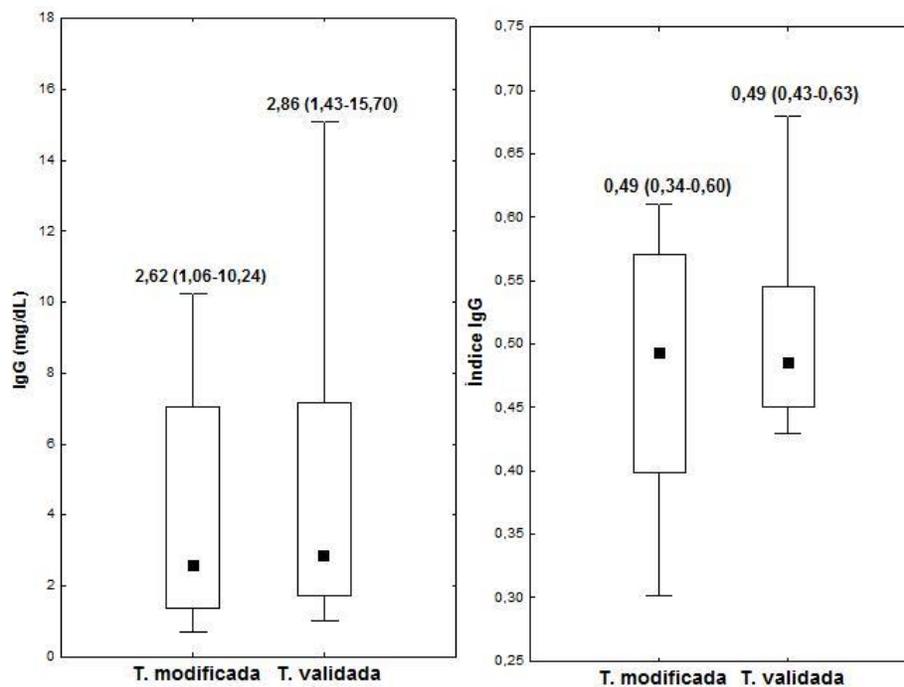


Figura 4. Comparación de los valores de IgG e índice de IgG [Mediana (10-90th)] entre las técnicas modificadas y validadas.

mejor explica los altos valores de concentraciones de albúmina e IgG en LCR. Sin embargo, las concentraciones de estas proteínas en LCR también pueden alterarse producto de un aumento en sus concentraciones séricas sin que se encuentre alterada la barrera (1,16). En algunas enfermedades del SNC la inmunoglobulina IgG puede ser sintetizada localmente (1).

La concordancia encontrada en esta investigación entre los informes de daño de barrera evaluados a partir del Qalb y de la electroforesis de disco también ha sido reportada previamente por nuestro grupo (15). A pesar de esta buena asociación, se conoce que es mejor utilizar el Qalb, como fórmula lineal, porque tiene mayor sensibilidad en la evaluación de la integridad de la BS-LCR (16). La

presencia de esta proteína en el LCR depende solamente del paso de esta desde la sangre a través de la BS-LCR, porque la albúmina no se sintetiza en el SNC (4).

La diferencia entre los informes de SIT obtenidos mediante la electroforesis en poliacrilamida y el índice ha sido reportada previamente (15). La electroforesis logra dar evidencia de la SIT si se trata de un proceso de síntesis oligoclonal de inmunoglobulinas. Por otra parte, el índice indica numéricamente cualquiera de las manifestaciones de la síntesis de inmunoglobulinas (oligoclonal o policlonal). La sensibilidad de la electroforesis en soporte de poliacrilamida para la detección de SIT en la esclerosis múltiple es de un 60 % (12), mientras que con el índice IgG se ha reportado aproximadamente un 80 % (9). Aunque el índice IgG tiene una sensibilidad y especificidad aceptable para la identificación de la SIT y el diagnóstico de enfermedades neurológicas (9), la focalización isoelectrónica seguida de inmunofijación es el método de mayor resolución para el diagnóstico de BO (17).

Comparación de la cuantificación de albúmina e IgG por técnicas modificadas respecto a las técnicas validadas

Los resultados mostrados (Figuras 3 y 4) pudieran sugerir que las modificaciones realizadas son útiles en la evaluación de la funcionalidad de la BS-LCR y la SIT de IgG. La cuantificación de albúmina en LCR y suero mediante un método ELISA, con anticuerpos monoclonales recubriendo la placa y con un límite de detección de 0,10 µg/dL (inferior al del método nefelométrico de 0,10 mg/dL) (18,19), contribuye a minimizar la fuente de error provocada por las diluciones sucesivas realizadas en el procedimiento. Para la cuantificación de la IgG en LCR se emplearon técnicas nefelométricas y turbidimétricas, donde se registra una disminución en la intensidad del haz de luz que incide sobre la cubeta de reacción, debido a la formación de un complejo antígeno-anticuerpo. Ambas son similares, la nefelometría se basa en la medición de radiación dispersa, en cambio la turbidimetría en la medición de la intensidad de un haz disminuido (20).

La diferencia encontrada para la IgG en suero fue debida a unos pocos casos cuyos valores de concentración fueron diferentes significativamente por ambas técnicas, lo que se hace mucho más evidente por el pequeño número de pacientes estudiados. Una posible explicación de este hallazgo puede deberse a que estos métodos de medición de turbidez no son ventajosos para muestras con altas concentraciones. Las grandes cantidades de sólidos disueltos en la muestra producen una dispersión múltiple que limita la

cantidad de luz que recibe el detector (20), obteniendo resultados falseados. Este error se asocia al principio de las técnicas empleadas, por lo que las modificaciones realizadas al método turbidimétrico no parecen influir en las diferencias encontradas.

Los resultados de las modificaciones sugieren que existe una correspondencia con la concentración de proteínas totales, los patrones de electroforesis de disco en poliacrilamida, y las cuantificaciones realizadas a partir de técnicas validadas para estos estudios. Este primer acercamiento predice que las modificaciones introducidas a la técnica turbidimétrica y al UMELISA pudieran ser estandarizadas para su futura validación en el diagnóstico de daño de la BS-LCR y de síntesis intratecal de IgG por el SNC.

Conclusiones

Los estudios de cuantificación de albúmina e IgG obtenidos mediante las modificaciones de las técnicas comerciales diseñadas para otros fluidos biológicos pudieran ser útiles para la estimación del estado funcional de la BS-LCR y la SIT de IgG.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos y menciones especiales

A Isabel Fernández, Mirelys Peña, Rebeca Fernández y Caridad Menéndez por todo el apoyo y ayuda en el procesamiento de las muestras y el montaje de las técnicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González-Quevedo A, Fernández R, González S, Suárez I. Evaluation of the blood-cerebrospinal fluid barrier in neurological diseases. In Montenegro PA, Juárez SM eds. *The Blood-Brain Barrier: New Research*. New York: Nova Science Publishers, 2012. pp. 173-200.
2. Sevillano MD, Cacabelos, Cacho J. Alteraciones del líquido cefalorraquídeo y de su circulación: hidrocefalia, pseudotumor cerebral y síndrome de presión baja. *Medicine*. 2011;10(71):4814-24.
3. González-Quevedo A, Fernández R, León MM, González S, Vicente I. Electroforesis de proteínas en el líquido cefalorraquídeo normal de niños y adultos. *Rev Mex Neuroci*. 2008;9(3):242-7.
4. Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci*. 2003;21:79-96.
5. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stüve O, Tumani H, Stangel M. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2013;9:267-76.
6. Lowry OH, Rosebrugh RJ, Farr AI, Randal RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
7. Escobar E. Valores de referencia del Laboratorio Clínico más empleados en Cuba. Año 2011. *Gac Méd Espirit*. 2011;13(2). Disponible en: [http://bvvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.13.\(2\)_07/p7.html](http://bvvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.13.(2)_07/p7.html)
8. Hegen H, Auer M, Zeileis A, Deisenhammer F. Upper reference limits for cerebrospinal fluid total protein and

- albumin quotient based on a large cohort of control patients: implications for increased clinical specificity. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(2):285–92. doi: 10.1515/cclm-2015-0253.
9. Luna IM. El reibergrama en el análisis del líquido cefalorraquídeo y el diagnóstico de la esclerosis múltiple. Tesis doctoral 2014. Universidad de Murcia. Disponible en: <https://digitum.um.es/jspui/bitstream/10201/.../tesis%20Ines%20Maria%20Luna.pdf>
 10. World Medical Association. Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191–4.
 11. González-Quevedo Monteagudo A1, Fernández Carriera R, Santiesteban Freixas R, Alfaro Capdegelle I, Lara Rodríguez R, Vicente Valdés I, Luis González RS. Brain barrier dysfunction in Cuban Epidemic Optic Neuropathy. *Eur J Neurol.* 2008;15:613–8. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02136.x.
 12. González-Quevedo A, Alfaro I, Gámez A, Fernández R, Lara R, Rodríguez R, Maza J. Síntesis intratecal de IgG y permeabilidad de la barrera sangre–LCR en el seguimiento de pacientes con esclerosis múltiple tratados con biomodulina T. *Rev Mex Neuroci.* 2007;8(1):18–22.
 13. Fernández-Carriera RA, González-Quevedo A, Lara-Rodríguez RF, León-Ortiz MM, González-García S, Vicente-Valdés I. Electroforesis de proteínas del líquido cefalorraquídeo en pacientes con enfermedad cerebrovascular isquémica. *Rev. Neurol.* 2002;35(10):908–12.
 14. Mora Mora LA, Arco Espinosa ME, Plumet J, Micheli F. Community acquired bacterial meningitis in patients over 60. *Medicina (B Aires).* 2015;75(6):367–72.
 15. Suarez-Luis I, Rodríguez-Rodríguez Y, González-Quevedo Monteagudo A, Fernández-Carriera R, Toledano-Heredia M, Rodríguez-Rodríguez PC, et al. Estudio inmunológico del líquido cefalorraquídeo con el empleo de un antisuero de IgG humano producido en Cuba. Evaluación preliminar. *Rev Neurol.* 2002;35(7):640–3.
 16. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci.* 2001;184:101–22.
 17. Karamehic J, Delic-Sarac M, Subasic D, Jukic T, Coric J, Panjeta M, Drace Z, Zecevic L, Mutevelic S, Dzananovic N, Grcic N, Kesmer A. Reibergram and Oligoclonal Bands in Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Med Arh.* 2012;66(4):222–5.
 18. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. pp. 547.
 19. Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius Å, Liman V, Norgren N, Blennow K, Zetterberg H. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Oct 1;54(10):1655–61. doi: 10.1515/cclm-2015-1195.
 20. Acebo-González D, Hernández-García A. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2013;44(1). Disponible en: www.redalyc.org/pdf/1812/181226886003.pdf