

# REIBERGRAMA PARA LA EVALUACIÓN DE LA SÍNTESIS INTRATECAL DE C3c

Alberto Juan Dorta-Contreras<sup>1,2</sup>, Elena Noris-García<sup>1,2</sup>,  
Bárbara Padilla-Docal<sup>1,2</sup>, Alexis Rodríguez-Rey<sup>1,2</sup>, Raisa Bu-Coifíu-Fanego<sup>3</sup>,  
María Esther Magraner-Tarrau<sup>3</sup>, Mauricio Martí-Brenes<sup>2</sup>

**RESUMEN - Introducción:** El diagrama de las razones de Reiber o reibergrama cobra cada día mayores usos para la caracterización de la síntesis intratecal de proteínas. El reibergrama fue definido para las clases mayores de inmunoglobulinas pero luego ha sido utilizado para evaluar otras proteínas basado en la teoría de la difusión molecular/velocidad de flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR). **Método:** El C3c, producto de la degradación del factor del complemento C3 y con una masa molecular de 145 KDa, se acerca a las características moleculares de la IgG para las leyes de la difusión de Fick. Se asume las constantes de la IgG en la fórmula de Reiber para evaluar la síntesis intratecal de C3c así como su correspondiente reibergrama. Se estudiaron 27 pacientes y 27 controles a los que se les dosificó albúmina y C3c en suero y LCR por inmunodifusión radial. **Resultados:** Con el reibergrama propuesto para el C3c se evaluaron estos pacientes. Se comprueba la validez de este reibergrama para distintas condiciones de barrera con o sin síntesis intratecal de C3c. **Conclusión:** El reibergrama y su fórmula correspondiente propuesto para la C3c puede ser usado para la evaluación de la síntesis intratecal de C3c.

**PALABRAS CLAVES:** C3c, albúmina, inmunodifusión, nefelometría, reibergrama, síntesis intratecal.

## Reibergram for C3c intrathecal synthesis evaluation

**ABSTRACT - Introduction:** Reiber's quotient diagram or reibergram has a growing apply for characterize the intrathecal synthesis of proteins. Firstly reibergram was used for the major classes of immunoglobulins but later it was used to evaluate other proteins based on the theory about molecular flux/cerebrospinal fluid (CSF) flow rate. **Method:** C3c is a degradation product of complement factor C3 with 145 KDa and approaches to IgG molecular characteristics according with Fick's diffusion laws. It was assumed IgG constants and graphic for IgG constants and graphic to evaluate the intrathecal synthesis of C3c. Twenty-seven patients and 27 controls were studied. Serum and CSF C3c and albumin were quantified by immunodiffusion. **Results:** The patients with the C3c proposed reibergram were evaluated. It has been proved its validity under several CSF blood barrier conditions. **Conclusion:** Reibergram for C3c can be used for the evaluation of the intrathecal synthesis of this protein.

**KEY WORDS:** C3c, albumin, immunodiffusion, intrathecal synthesis, nephelometry.

El reibergrama o gráfica de las razones de Reiber<sup>1,2</sup> es un instrumento de gran utilidad para el análisis de la biosíntesis de proteínas en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Este diagrama fue definido primero para las clases mayores de inmunoglobulinas<sup>2-4</sup> primero de forma empírica basado en el resultado de varios miles de perfiles y luego comprobado a partir de las leyes de la difusión de Fick por la teoría de la difusión molecular/velocidad de flujo del LCR<sup>3</sup>. La primera ley de Fick plantea que la difusión de una

proteína a través de una barrera o membrana depende del coeficiente de difusión de la proteína en cuestión y del gradiente de concentración de esta molécula a difundir entre los dos compartimentos a ambos lados de la barrera; coeficiente de difusión depende del peso molecular de la proteína. La segunda ley de Fick trata de la trayectoria y el tiempo de la difusión en una concentración dada de la proteína a difundir y toma en cuenta también sus características moleculares.

<sup>1</sup>Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL), Ciudad de La Habana, Cuba; <sup>2</sup>Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Miguel Enríquez", Ciudad de La Habana, Cuba; <sup>3</sup>Hospital Pediátrico Docente San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana, Cuba.

Received 29 October 2005, received in final form 22 February 2006. Accepted 17 March 2006.

Dr. Alberto Juan Dorta-Contreras - Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL) - Apartado 10049, CP11000 - Ciudad Habana - Cuba - E-mail: adorta@infomed.sld.cu

Cuadro. Características moleculares de C3c en comparación con otras proteínas.

	C3c	IgG1	IgA	IgG3	IgE
Masa molecular (KDa)	145	150	160	170	180
Carbohidratos asociados a la molécula (%)	2-3	2-3	7-11	6-10	12
Radio hidrodinámico (Å)	54	52	58	58	59

La teoría de la difusión molecular/velocidad de flujo del LCR explica que la difusión de las proteínas a través de la barrera sangre/LCR sigue una función hiperbólica y esta es capaz de explicar muchos eventos fisiológicos y fisiopatológicos en el sistema nervioso central (SNC).

Esto ha permitido usarse en otras proteínas como el antígeno carcinoembrionario<sup>5</sup>, la IgG<sup>6</sup> y recientemente la IgE<sup>7</sup>.

La fracción C3c es un producto de la degradación del factor C3 del sistema de complemento y su síntesis en el LCR es una muestra de la acción biológica del complemento frente a inmunógenos exógenos como pueden ser los distintos agentes biológicos o a auto-inmunógenos por los mecanismos de hipersensibilidad de tipo II citotóxica.

El objetivo del presente trabajo es presentar el nuevo reibergrama para evaluar la producción intratecal de C3c.

## MÉTODO

Se analizan las características moleculares de las clases de inmunoglobulinas para las cuales se definieron originalmente los reibergramas que sean más afines a la molécula de C3c de acuerdo con el Cuadro.

Se estudian 27 controles y 27 enfermos a los que se les ha tomado punción lumbar y toma de sangre para la obtención de suero de forma simultánea por sospecha de distintas enfermedades neurológicas. Los controles fueron pacientes con sospecha de meningoencefalitis pero resultaron ser convulsiones febriles sin agentes biológicos o causas auto-inmunes comprobadas y procedentes de la seroraquioteca de nuestro laboratorio. La investigación fue aprobada por el Comité de Bioética de las Investigaciones de la Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Miguel Enríquez". Para estudiar el comportamiento a niveles bajos de razón albúmina se estudiaron 20 niños con meningoencefalitis bacterianas y para el resto del rango se estudiaron 7 pacientes adultos con enfermedad demielinizante compatible con esclerosis múltiple. Todos los pacientes y personas cuyas muestras fueron utilizadas como controles y los tutores o padres en el caso de los niños dieron su consentimiento informado para realizar la punción lumbar diagnóstica en su momento. No se tomaron muestras especialmente para este estudio sino que proceden de la seroraquioteca de nuestro laboratorio. Fueron conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en pequeñas alícuotas. Se les cuantifica C3c por inmunodifusión radial

en placas NOR y LC Partigen para suero y LCR respectivamente, de la firma Dade Behring (Marburg) y albúmina por nefelometría con los reactivos de la misma casa comercial en un nefelómetro BN Prospec.

## RESULTADOS

Se utilizan las constantes para la confección de la fórmula para la detección intratecal de C3c a partir de las constantes de la IgG por ser esta proteína la que más similitud tiene con el C3c a los fines de las leyes de la difusión de Fick y se asume su correspondiente reibergrama.

La fórmula para el cálculo manual de la síntesis intratecal queda como:

$$C3c(\text{oc}) = QC3c - (0.93 \sqrt{Q_{\text{Alb}}^2 + 6 \times 10^{-4}} - 1.7 \times 10^3) C3\text{suero}$$

En la Figura 1 se muestran los pacientes estudiados con valores elevados y disminuidos de Q albúmina. Puede verse que todos los casos caen por encima de la línea hiperbólica más inferior.

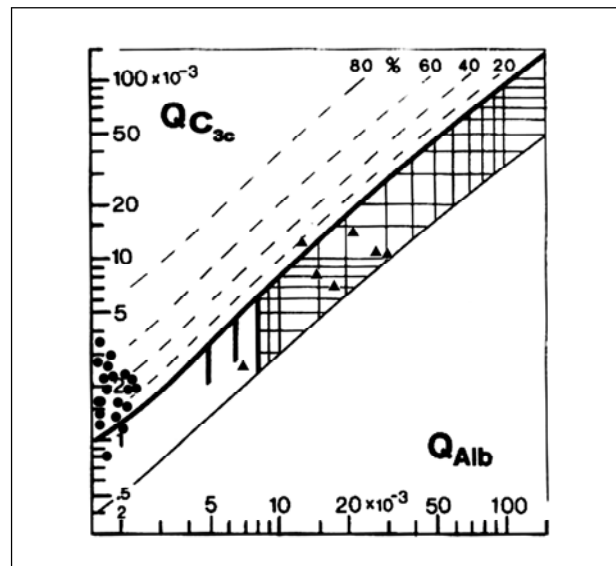


Fig 1. Reibergrama para C3c con los valores de Q albúmina límites estudiados. Nótese que en ningún caso cae en la zona por debajo de la línea hiperbólica más baja que es una zona sin valor biológico. Los círculos representan los resultados de los pacientes con meningoencefalitis bacterianas y los triángulos representan los resultados de los pacientes con enfermedad demielinizante compatible con esclerosis múltiple.

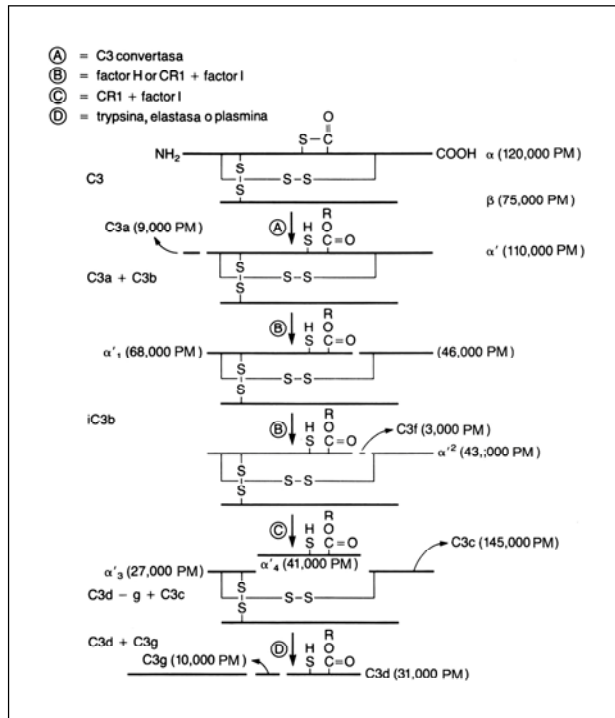


Fig 2. Esquema de los productos de degradación del C3c. Obsérvese que por cada molécula de C3 que participa en la reacción se produce una de C3c. Por eso el C3c tiene el valor biológico equivalente al C3 que ha intervenido en los procesos de fijación de complemento.

## DISCUSIÓN

El C3c es un producto de la degradación del factor C3 del sistema de complemento. La formación de C3c tiene dos aspectos biológicos importantes: uno de ellos es que por ser un producto de la degradación del C3 (Figura 2), es una medida de la concentración de este y por otro lado indica que todo el C3c que se produce en el SNC ha sido producto de la activación biológica del sistema por la vía clásica o alternativa. Esto último significa que este sistema se ha visto activado y que estamos en presencia de un evento inmunológico asociado a una hipersensibilidad de tipo II o citotóxica. La síntesis intratecal de C3c nos ayuda a entender los mecanismos fisiopatológicos cuando estamos en presencia de enfermedades neurológicas de índole infecciosa o autoinmune y también contribuye a corroborar un diagnóstico de una enfermedad neurológica de estas características.

Al compararse las masas moleculares, la asociación porcentual de carbohidratos y su radio hidrodinámico, el C3c guarda más similitud biofísica con la IgG1 que con el resto de las moléculas analizadas. El reibergrama para la IgG3 por estas mismas razones usa las constantes obtenidas para la IgA<sup>6</sup> y se aplica exitosamente<sup>8</sup>.

El uso del reibergrama se sustenta en la teoría de la difusión molecular/velocidad de flujo del LCR que base su teoría en la primera ley de Fick de la difusión:

$$J_i = -Dc_i / dx_i$$

Donde  $J_i$  es la difusión molecular a través de la barrera sangre-LCR,  $D$  es el coeficiente de difusión y  $dc/dx$  es el gradiente de concentración en relación con la trayectoria de difusión efectiva  $x^9$ .

El coeficiente de difusión está influido solamente por la masa molecular de la proteína en estudio.

De ahí que podamos hacer uso del reibergrama calculado para la IgG para ser usado en la determinación de la síntesis intratecal de C3c. Este reibergrama para el C3c puede ser usado en combinación con los reibergramas de las inmunoglobulinas mayores, la IgE y las subclases de IgG y conserva las ventajas que este método tiene ya que permite evaluar la síntesis intratecal, conocer la funcionabilidad de la barrera sangre-LCR y encontrar patrones de síntesis intratecal típicos para una enfermedad dada y relacionarla con otras enfermedades de un solo vistazo. Esto sin lugar a dudas abre nuevas posibilidades de evaluación de enfermedades neurológicas autoinmunes o infecciosas.

El resultado no depende del volumen de LCR extraído y puede trabajar con LCR lumbar, ventricular y cisternal y las razones que se calculan no dependen del método analítico empleado en la cuantificación siempre que se haga en la misma corrida analítica y por el mismo método y puede trabajar en cualquier rango de Q albúmina.

Si el valor de Q albúmina es mayor que  $150 \times 10^{-3}$  puede calcularse por la fórmula que hemos referido. También puede verse la fracción intratecal sintetizada dado por las líneas discontinuas percentiles por encima de la línea hiperbólica más fuerte (Q lim) que delimita la fracción de síntesis intratecal de la que difunde de la sangre al LCR.

En los pacientes estudiados al usar el reibergrama propuesto para C3c nos permitió comprobar la validez de esta gráfica para un amplio espectro de valores de razón albúmina Q albúmina que es una medida del funcionamiento de la barrera sangre-LCR. Ningún paciente fue ubicado en la región inferior a la línea hiperbólica más baja. Si se hubiesen ubicado en esta zona, ello implicaría que existiría un problema metodológico pues esa zona no tiene significación biológica y podría pensarse que el reibergrama adoptado no se ajustaría a las características moleculares de C3c. También como se observa en la Figura 2 se trabajó con pacientes con valores de Q albúmina extremos

y siempre se ubicaron en zonas biológicamente aceptables.

Es de esperar que el reibergrama para C3c pueda resultar útil para las enfermedades que cursan con elevados valores de C3 y que afectan el SNC como las enfermedades infecciosas<sup>10</sup>, las autoinmunes demielinizantes<sup>11</sup>, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson<sup>12</sup>, en la enfermedad de Alzheimer<sup>13</sup> y en enfermedades autoinmunes como la miastenia gravis<sup>14</sup>, entre otras.

## REFERENCIAS

1. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood-CSF barrier and the quantitation of humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chem* 1987;163:319-328.
2. Dorta-Contreras AJ. Reibergrama: elemento esencial en el análisis inmunológico de líquido cefalorraquídeo. *Rev Neurol* 1999;28:996-998.
3. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF): a concept common to normal blood CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994;122:189-203.
4. Reiber H. The hyperbolic function: a mathematical solution of the protein flux/CSF flow model for blood CSF barrier function. *J Neurol Sci* 1994;126:243-245.
5. Jacobi C, Reiber H, Felgenhauer K. The clinical relevance of the locally produced carcinoembryonic antigen in cerebrospinal fluid. *J Neurol* 1986;233:358-361.
6. Dorta-Contreras AJ. Nuevo reibergrama para la evaluación de la síntesis intratecal de IgG3. *Rev Neurol* 2001;33:694-696.
7. Dorta-Contreras AJ. Reibergrama para la evaluación de la síntesis intratecal de IgE. *Rev Neurol* 2004;39:794-795.
8. Dorta-Contreras AJ, Noris-García E, Escobar-Pérez X, Dueñas-Flores A, Mena-López R. Patrones de síntesis intratecal de subclases de IgG en meningoencefalitis eosinofílica por *Angiostrongylus cantonensis*. *Rev Neurol* 2003;36:506-509.
9. Dorta-Contreras AJ, Reiber H. Teoría de la difusión molecular/flujo del líquido cefalorraquídeo. *Rev Neurol* 2004;39:564-569.
10. Tatomirovic Z, Bokun R, Bokonjic D. [Intrathecal synthesis of complement components C3c and C4 in the central nervous system infections with signs of the acute serous meningitis syndrome]. *Vojnosanit Pregl* 2000;59:265-270.
11. Barnum SR. The complement system in demyelinating disease. *Mol Chem Neuropathol* 1997;31:289-300.
12. Rozemuller AJ, Eikelenboom P, Theeuwes JW, Jansen Steur EN, de Vos RA. Activated microglial cells and complement factors are unrelated to cortical Lewy bodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000;100:701-708.
13. Veerhuis R, Jansen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol* 1999;160:289-299.
14. Thorlacius S, Mollnes TE, Garred P, et al. Plasma exchange in myasthenia gravis: changes in serum complement and immunoglobulins. *Acta Neurol Scand* 1988;78:221-227.