

Inmunolectroforesis

LIBUSE MIRCEVOVA y MARÍA C. FUSTÉ(*)

TEORIA

La inmunolectroforesis consiste en una electroforesis de las proteínas, donde la detección de éstas se basa en una in-munorreacción entre antígeno y anticuerpo del (carboxilos) y existe una mayor disociación de grupos básicos; la molécula de proteína se comporta como proteína carga negativa, así que la proteína migra como un anión hacia el polo positivo. Por el contrario, en un medio más ácido que el Punto isoelectrico está disminuida la disociación de ácido

La electroforesis en general es la migración de una partícula con carga eléctrica, hacia el cátodo, cuando es sometida al influjo de Antígeno. Son sustancias que provocan la formación de anticuerpos como un campo eléctrico.

substancias tan variadas como coloidales, proteínas que migran carga
complejos su
los proteínas, polisacáridos, se estará fiada por
progrupos encuentran disociados,
yateinolípidos-polisacáridos, etc., es sean ejemplo, amino o carboxilo.
El imprescindible que la substancia empleada por grupo carboxilo le da la carga
negativa como antígeno sea extraña al organismo V el grupo amino y guanidina la
carga que se va a producir los antipositiva.

Siendo la molécula de proteína anfotérica, ésta se comportará en un campo eléctrico de acuerdo con el pH del mismo.

En cierto pH característico para cada proteína determinada y que se llama punto isoelectrico, existe la misma disociación pequeña de los grupos ácidos básicos en la molécula de proteína y por lo tanto, dicha molécula será neutra, desde el punto de vista eléctrico, teniendo a este pH.

En un misma punto isoelectrico se encuentran los grupos básicos.

Como antígenos pueden utilizarse substancias naturales y artificiales.

Anticuerpo. Son proteínas que se forman en el sistema reticuloendotelial del organismo después de inocular un antígeno en el mismo.

Estos están unidos principalmente a la fracción y globulina del suero, aunque H110 pueden unirse también a las fracciones y globulinas, cuando forman complejos con los lípidos. Se cree que cada anticuerpo formado en el organismo es específico del antígeno que lo provoca.

Reacción antígeno-anticuerpo. ácidos disociados dan a la molécula de cada proteína, movimiento alguno.

En esta reacción un antígeno determinado se une estrechamente con su anticuerpo correspondiente.

(*) Laboratorios de Investigaciones Bioquímicas y Endocrinologías, Consejo Científico, Ministerio de Salud Pública.

De esta reacción hay ciertas alteraciones principalmente en la molécula de anticuerpo, estas alteraciones son de carácter reversible y no constituyen una desnaturalización de dicha molécula.

En esta reacción toman parte principalmente los grupos polares del antígeno y del anticuerpo y como consecuencia existen en el complejo formado menos grupos polares libres y más grupos no polares, disminuyendo asimismo la solubilidad de dicho complejo en soluciones polares como el agua.

Esta reacción antígeno-anticuerpo en la inmunolectroforesis ocurre en dos etapas:

1. Combinación específica entre el antígeno y su anticuerpo correspondiente.
2. Reacción visible en forma de precipitado, pero esta reacción no ocurre en todas las reacciones de antígenos con anticuerpos.

La primera parte de esta reacción es rápida y la segunda etapa más lenta, que consiste en la precipitación del complejo en forma visible; esta precipitación es ocasionada por descargas ulteriores del complejo en presencia de diferentes sales.

Existe un equilibrio dinámico entre el anticuerpo y el antígeno y el complejo anticuerpo-antígeno. El antígeno y el anticuerpo se pueden combinar en proporciones diferentes. Cuando la cantidad del antígeno sobrepasa el límite para que exista este equilibrio, no se hace visible la reacción como consecuencia de la disolución del complejo. Esto es, el antígeno sobrante disuelve el precipitado formado.

No es conocido a fondo el mecanismo de dicha disolución, pero es tal vez ocasionada por la reversibilidad de algunas reacciones que se producen durante la formación del precipitado.

El principio de precipitación de antígeno-anticuerpo fue usado por Ouchterlony en *doble fusión*, esta es una difusión del antígeno anticuerpo reaccionados entre sí, en una capa delgada de agar.

Para esta reacción antígeno-anticuerpo se utilizan muy pequeñas cantidades de material y de esta forma pueden ser distinguidas proteínas que no son posible detectar por reacciones químicas.

Grabar introduce la técnica de inmunolectroforesis que es la combinación de la electroforesis propiamente dicha y la inmunorreacción o reacción antígeno-anticuerpo sobre una placa de agar.

Grabar (Williams y Grabar¹ Grabar² usó una placa de agar sobre una placa de vidrio, aplicando un pequeño orificio a la placa de agar, llenando el mismo con suero humano, practicando en esta placa el fraccionamiento de las proteínas del suero por electroforesis. Después de este fraccionamiento de las proteínas, se practica una escisión en la placa de agar y en ésta se llena con antisuero de caballo, producido mediante inmunización con suero humano.

Las fracciones de proteínas humanas se difunden en el agar y también las fracciones del antisuero del caballo se difunden, encontrándose en determinado lugar y formando el complejo antígeno anticuerpo y por la influencia de los electrolitos presentes en el agar, precipitarán de manera visible en forma de curva.

Esta curva está determinada por la concentración de las proteínas y las propiedades de la misma.

El punto más alejado del trayecto de la migración de las proteínas del suero humano será la mayor concentración de

dicha proteína. Aproximadamente puede decirse que las proteínas de peso molecular mayor que las γ globulinas, precipitarán cerca de este lugar. Cuando la cantidad de proteínas es pequeña, la línea de precipitación se formará más lejos del de la fuente de antisueros y eventualmente no será visible. Esta propiedad puede utilizarse para una valoración semicuantitativa.

Algunas curvas presentan dos prominencias, esto significa que hay por lo menos dos sustancias electroforéticamente diferentes, pero como los dos antígenos son muy similares y el anticuerpo es menos específico, ¹¹⁰ llega a formar dos curvas completamente diferenciadas. El arco de la γ globulina es asimétrico, esto se debe a que algunas proteínas de γ globulinas migran electroforéticamente más rápido que otras, sin embargo, como son muy similares, algunos antisueros ¹¹⁰ pueden distinguir entre las mismas.

Actualmente se conocen más de 30 fracciones de proteínas en el suero humano. Las proteínas más estudiadas son las de la fracción gamma y beta globulinas. Las menos conocidas son las alfa globulinas.

La determinación de las diferentes fracciones, por la situación de las líneas de precipitado es muy dificultosa, pero para algunas zonas es posible hacer pruebas específicas de las mismas. Por ejemplo, la línea correspondiente a α_2 C globulina, que transporta Cu^{++} en el organismo (ceruloplasmina), puede ser comprobada con el reactivo parafenilendiamino.

TECNICA

Método de Grabar modificado por Korinek y otros,³ coloración según Michaelec.⁴

PREPARACION DEL AGAR

Agar Difeo: 15 g. 1 litro i de buffer

Buffer: Dietilbarbiturato de Na (Veronal 100 g. Acido Dietilbar- bitúrico 20 g. Agua 5 lts.	pH - 8.6
---	----------

Se ajusta el disolvente a un pH-8.6. Se coloca todo junto en un beaker y se calienta hasta que hierva (en baño maría). Se le añade 0.1 g. de mer- tiolate (timerazol) como preservativo en 1 litro de buffer con 15 g. de agar.

Para almacenarlo se guarda en pequeños frascos de 50 mi. o en tubos de ensayo en refrigeración con el objeto de usarlos según se vayan necesitando, debido a que el agar una vez vuelto a calentar para ser utilizado no se debe volver a usar.

De tomarse muy en cuenta la cantidad de agar a distribuir en la lámina de vidrio, ya que es necesario un espesor determinado y una película de agar uniforme en toda ella. La aplicación debe hacerse cuidadosamente sobre una mesa bien nivelada. Para calcular la cantidad de agar a distribuir debe tenerse en cuenta que para una lámina de 8.5 cm x 8.5 cm. se utilizan 15 mi. de agar. De acuerdo con esto deben hacerse los cálculos. Una vez distribuida el agua en las láminas de vidrio se espera de 5 a 10 minutos para que se endurezca y luego se practican unos pequeños agujeros en los cuales se aplica el suero en cuestión. También se marcan las aberturas donde se depositará luego el antisuero. Se realiza la electroforesis en un Buffer de Veronal de pH 8.6 permitiéndole migrar durante 2 y a 3 h a 150 volts y así se obtiene una distribución de la corriente en la lámina de 4 a 5 volts/cm. En estas condiciones se obtiene una migración de 5 a 6 cms.

Para hacer la migración por electroforesis se utiliza en el aparato horizontal

dos pedazos de papel de filtro Whatman No. 2, los que se humedecen en el Buffer dejándose un extremo del mismo en contacto con el Buffer y el otro en contacto con el extremo de la lámina (en ambos lados). Se nivela el Buffer dentro del aparato (el cátodo puede tener 1 cm. más alto que el ánodo).

Después de realizada la electroforesis se destapan las aberturas donde se va a aplicar el antisuero, se aplica el mismo y se «leja migrar de nuevo durante 22 horas por difusión con humedad suficiente, lo cual puede lograrse colocando un papel o un algodón humedecido en agua en uno de los extremos de la lámina dentro de una cápsula de Petri.

Después de sacar la lámina de la cápsula de Petri se coloca en un baño de cloruro de sodio al 0.9% (suero fisiológico) durante 24 horas. Se saca de este lavado y se coloca en otro igual por el mismo tiempo. (El Agar puede deformarse debido a estos dos lavados y entonces se fija con una capa delgada de Agar caliente).

Después de estos dos baños se coloca la lámina dentro de un papel de filtro durante 24 horas a una temperatura de 30°C con el objeto de secarlo y después proceder a teñirlo.

Se practica un nuevo lavado con ácido acético al 3% durante 2 horas con el objeto de eliminar los restos del papel de filtro que puedan haber quedado adheridos a la lámina.

Se colorea la lámina con Azocarmín Q con azul de bromofenol durante dos o tres horas. Después de coloreada se lava con ácido acético al 3% durante 1 hora.

SOLUCIÓN DE AZOCARMÍN

Azocarmín.....	1 g.
Acido Acético Glacial.....	50 ml.
Acetato de Sodio	6 g.
Agua	1 lt

Si no se disuelve el azocarmín se deja la solución durante 24 horas en reposo y luego se filtra.

SOLUCIÓN DE BROMOFENOL

Azul de Bromofenol	0.1 g.
Vcido Acético Glacial.....	50 ml.
Agua	1 lt.

Descripción de las distintas fracciones del suero humano determinados por la inmunolectroforesis.

Vea diagrama No. I.

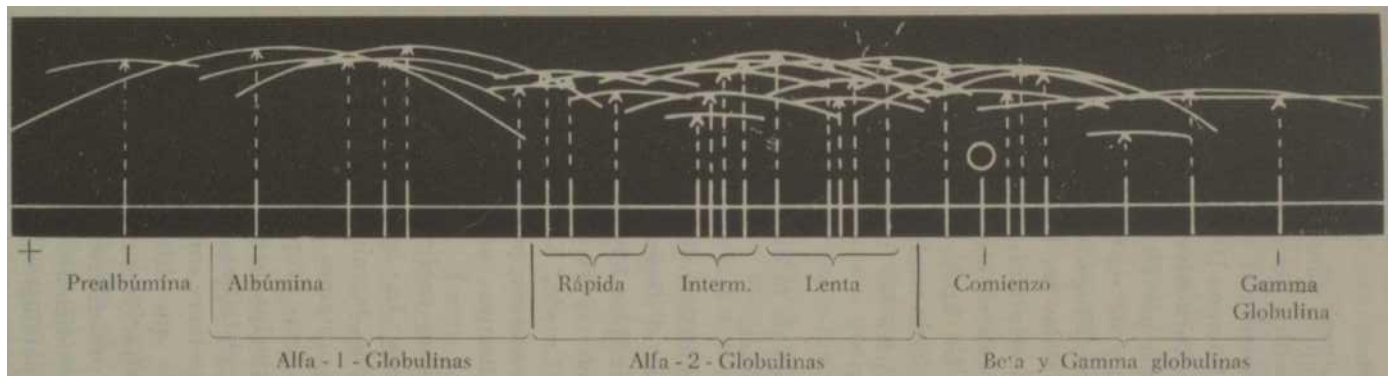
Las fracciones que migran más rápidamente que la albúmina.

Más rápidamente que la fracción albúmina migran las fracciones Si gloproteína o prealbúmina, que es una glicoproteína y la 8-1 o 8-2 lipoproteína. Si como lipoproteína se puede colorear con Sudan Black.

Zona Albúmina. En esta zona se encuentra principalmente la curva correspondiente a la alb. que se encuentra en mayor concentración. En la zona albúmina se encuentra también la línea correspondiente a alfa, proteína o alfa, seromucoide, que es una glicoproteína que se puede disolver en C10,H.

Zona Alfaglobulinas. En la zona de a, globulinas se pueden identificar como mínimo tres fracciones de alfa, globulinas. La más visible es la fracción alfa, glicoproteína.

En la zona de alfa globulinas se pueden diferenciar como mínimo 10 fracciones, las más importantes son alfa macroglobulina, alfa₂ lipoproteína, que es la lipoproteína que se encuentra en mayor concentración en el suero humano y que se puede colorear con Sudan Black. Las haptoglobinas que son glicoproteínas que forman complejo con



[Tomado de HIRSCHFELD 1962]

ARCOS FUERTES

- | | | |
|-----------------------------|--|-------------------------------------|
| 1. Albúmina | 7. α_2 Lipoproteína | 13. α_2 Globulina V |
| 2. α_1 Lipoproteína | 8. α_2 Macroglobulina | 14. Hemoglobina β_1 Globulina |
| 3. α_1 Seromucoide | 9. Geruloplasmina (α_2 Globulina IV) | 15. Transferrina |
| 4. α_1 Glicoproteína | 10. Haptoglobulina | 16. β_1 Globulina I |
| 5. α_2 Globulina I | 11. Ge (Componentes de Grupo) | 17. β_2 A |
| 6. α_2 Globulina III | 12. α_2 Globulina VI | 18. γ Globulina |

ARCOS DEBILES

- | | | |
|------------------------|----------------------|----------------------|
| α_1 Globulina A | α_2 Globulina | α_2 Globulina |
| α_2 Globulina | α_2 Globulina | β Lipoproteína |

COMPONENTES CON OTROS SUEROS INMUNES

- | | | |
|-------------------------|---------------------------|--|
| Prealbúmina | α_2 Globulina VII | β_2 Macroglobulina |
| α_2 Globulina II | α_2 Globulina VIII | $\beta\alpha$ - α_2 Glicoproteína |

la hemoglobina también se encuentran aquí. De acuerdo con la herencia de alfa₂ haptoglobulinas, existen tipos/Hp 2-2, Hp 1-1 y Hp 2-1, los cuales se pueden detectar con el reactivo bencidina. La alfa: ceruloplasmina, es una proteína que transporta el cobre en el organismo, tiene propiedades como oxidasa y se puede detectar con el reactivo parafenilendiamina y aparece también en esta zona.

Zona de las Beta globulinas. Como mínimo se encuentran 4 fracciones.

La siderofilina o B₁ transferrina es una proteína que transporta hierro en el organismo. γ_5 B o H, es una γ globulina que se une a la hemoglobina transportándola en el organismo y que se detecta con Bencidina cuando exista esta unión. (Tombs,⁵ Hirschfeld,⁶ Korinek y otros⁷).

B₂ A y B₂ M, tienen propiedades como inmunoglobulinas; la γ_3 -A se puede identificar solamente por inmunoelectroforesis. M es una macroglobulina que se encuentra en algunos sueros patológicos en alta concentración.

Zona de γ globulinas. Es muy heterogénea, está compuesta por globulinas de diferente movilidad, en el campo eléctrico, pero muy similares en la reacción inmunológica.

Antisuero selectivo. Una fracción individual se puede comprobar con el llamado antisuero selectivo, esto es el antisuero que preparado mediante la inmunización de animales con esta fracción inmunológica pura, reacciona solamente con esta fracción.

Un antisuero selectivo que de reacciones solamente con cierta proteína, se puede preparar también de antisueros que tengan los anticuerpos contra diferentes proteínas, por procedimientos especiales, como por ejemplo por saturación. Esta saturación se produce al añadir a un antisuero antígenos,

en cantidades suficientes para que reaccionen completamente con sus fracciones específicas de antisuero en forma de un precipitado.

Por ejemplo: para preparar un antisuero específico para las lipoproteínas, el procedimiento es el siguiente: añadimos suero humano Dextransulfatado (en el cual se encuentran precipitadas las lipoproteínas por acción del dextransulfato después de separado este precipitado por centrifugación) a un antisuero que tiene todas las fracciones de anticuerpos, precipitarán todas las fracciones del antisuero menos las correspondientes a las lipoproteínas, separando este precipitado tendremos un antisuero específico para las lipoproteínas. (Xacko y otros).⁸

Aplicaciones de la inmunoelectroforesis en medicina.

La inmunoelectroforesis puede servir como ayuda al diagnóstico. En diferentes enfermedades hay diferentes alteraciones en ciertas fracciones de proteínas de suero. (Crowle,⁹ Korinek,¹⁰ Lecoq.¹¹) Estas alteraciones pueden ser de dos clases cualitativas y cuantitativas.

Alteraciones cualitativas en inmunoelectroforesis. La inmunoelectroforesis es un método de valor para determinar diferentes proteínas anormales o paraproteínas. Estas proteínas anormales se derivan principalmente de las γ globulinas, γ_3 -2 A globulinas y p₂ M globulinas. Estas alteraciones consisten en líneas de precipitado que difieren en su forma de la que ellas tienen en casos normales, pudiendo presentarse una o más líneas en estas condiciones que pertenecen a proteínas patológicas.

Estas alteraciones pueden verse principalmente en mielomas (Wunderly¹²) y en la macroglobulinemia de Waldenstrom (Schliedegger,¹³ Schlieffarth,¹⁴).

En los mielomas ocurren frecuentemente las anomalías siguientes: el trazo de las γ globulinas está considerablemente ensanchado y se desplaza hacia la fuente del anticuerpo, denotando una muy fuerte concentración de antígeno en un lugar restringido.

Este refuerzo es variable en cuanto a su sitio pudiendo ir desde las γ globulinas más lentas hasta la región de las B2 globulinas.

Alteraciones en las fracciones α y B-globulinas son raras. Se encuentra delante del trazo de las γ globulinas a veces un trazo suplementario que concuerda con las γ globulinas y evoca una reacción de identidad parcial. Este trazo se observa principalmente entre los enfermos que presentan una proteinuria de Bence-Jones. Las β_2 globulinas se encuentran de vez en cuando ausentes con mayor frecuencia y a veces están fuertemente disminuidas. Como este trazo está normalmente enmascarado en parte por las γ globulinas resulta necesario para estudiar sus variaciones saturar el suero inmune por las γ globulinas.

La púrpura hiperglobulinémica de Waldenstrom muestra un aumento de las γ globulinas que afectan a todas las movilidades y se acompañan de perturbaciones de la macroglobulina de carácter de paraproteína que está principalmente en las fracciones γ y α_2 globulinas. Una macroglobulina fisiológica se encuentra en sueros normales en concentración de 0.3% y se llama β_2 M o B2-macroglobulina.

Alteraciones cuantitativas. En diferentes enfermedades pueden observarse diferentes anomalías en el espectro de las proteínas. El método de inmuno-electroforesis tiene valor principalmente en las hipogammaglobulinemias y agammaglobulinemias donde existe una disminución de la línea gamma o dicha fracción no es visible.

La agammaglobulinemia, deficiencia en la cual el organismo es incapaz de producir anticuerpos (gammaglobulinas), se señala en el niño por una resistencia disminuida a las infecciones la que le es generalmente fatal.

Donde más valor representa este método es en la hiposiderrofilinemia, que es una enfermedad que no puede diagnosticarse como las anteriores, por medio de la electroforesis en papel. En esta enfermedad está disminuida la fracción (β_1 -transferrina) y aumentada la antefracción S. (Iványi y otros.¹⁵)

El aumento de la antefracción δ también aparece en la hiperhaptoglobulinemia.

La fracción S¹ lipoproteína aparece prolongada hasta el sector correspondiente a la antefracción S¹ en embarazo avanzado y en enfermedades neoplásicas.

Las metástasis neoplásicas óseas se distinguen frecuentemente por la hipertrofia del trazo de las β_2 globulinas.

El suero de pacientes que sufren de nefrosis lipoídica produce: disminución de la albúmina y γ globulinas, aumento de las α globulinas. Este aumento no ocurre en una sola proteína sino en el conjunto de las globulinas del grupo α_2 globulinas.

Las afecciones hepáticas acompañadas de una elevación de las γ globulinas (Cirrosis hepática, hepatitis) muestran un trazo grande de γ globulinas típico del exceso de antígeno. Este aumento se observa uniformemente en todas las γ globulinas. Está generalmente asociado a un aumento de las β_2 globulinas.

Han sido observadas otras alteraciones en diferentes enfermedades, pero por el momento no tiene valor para el diagnóstico debido a que existen otros mé

todos seguros para ello. Por ejemplo, en la fase aguda del lupus eritematoso ¹¹⁰ aparece la fracción III, A globulina.

Determinación de grupos de suero humano. Existen dos grupos de α -haptoglobulinas I α -HI que forman tres combinaciones en suero humano (Hp-1-1) (Hp-2-2) y (Hp-2-1). Existe otro grupo Ge (α_2 globulina) en donde se observan también 3 variaciones como grupo Ge 1-1, Ge-2-1 y Ge-2-2. Ambos grupos: grupo de α -, haptoglobulinas y grupo Ge (grupo de α - γ globulinas), se pueden detectar por inmunoelectroforesis. Para detectar el Ge grupo existe solamente un método: el método de electroforesis ¹¹¹ Hirschfeld.¹⁸⁾

Significación de la inmunoelectroforesis en la embriología. Por medio de la inmunorreacción se puede demostrar en que momento el tejido embrionario adquiere su identidad biológica o sea en que momento este tejido se comporta como un tejido adulto desarrollado.

Gracias al método de inmunoelectroforesis se pueden analizar diferentes fracciones de proteínas en cantidades más pequeñas que una millonésima de gramo. Con ninguna otra técnica se puede detectar la pureza de una proteína como por este método. Por el momento la inmunoelectroforesis es una técnica nueva que en un futuro abrirá nuevos caminos a la investigación y al análisis de las proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. —Crowle, A. J.: *Inmunodifusión*, Academic Press, New York and London 1961.
2. —Grabar, P.: *The study of the normal and pathological constituents of the blood by immunoelectrophoretic analysis*, Triangle, The Sandoz J. of medicine, Science IV: 185-196, 1960.
3. —Hirschfeld, J.: *Characterization of precipitating components in normal human sera obtained by an immunoelectrophoretic technique*, Acta path. microbiol. scand. 49: 255-69, 1960.
4. —Hirschfeld, J.: *Sci. Tools*, 8: 17, 1961.
5. —Ivaný P., Korinek J., Kucera J.: *Bratislavské lékarské listy*, 42: 98, 1961.
6. —Korinek J.: *Nekteré príklady pouziti imunoelektroforezy y hematologii*, Cas. lek. ces. 102: 753-762, 1963.
7. —Korinek J., Koutný I.: *Zeitschrift für Immunitäts- und Allergieforschung*, 125: 191 1963.
8. —Korinek Paluska E., Mach O.: *Some notes concerning serum Beta₂ haptoglobin*, Clin. chim. Acta, 6; 388, 392, 1961.
9. —Lacko L., Korinek J., Burger, M.: *The interaction of antibiotics of the tetracycline type with serum lipoproteins*, Clin. Chim. Acta 4: 800-806, 1959.
10. —Lecoq, R.: *Manual d'analyses medicales et de biologie clinique*, ed. G. Doin & C.. Paris, 1962.
11. —Michalec, Ruzicka, J., Korinek, J.: *Elektroforesa na papire av jinych nosicich*. CSAV, Praha 1959, pag. 278.
12. —Scheidtger, L.: *L'immunoelectroforese*. Semaine Hóp. Paris, 32, 2119-2127, 1956.
13. Scheiffarth, F., Giitz, H.: *Immunoelektroforetische Studien bei Hypergamaglobulinämie und der Macroglobulinämie Waldenström*, Aerztliche Wchnschr, 13, 751-755, 1958.
14. Tombs, M. *PA haemoglobin-binding globulin in human serum*, Nature 186. 1055-1056, 1960.
15. Williams, C. A., Grabar, P.: *Immunoelectrophoretic studies on serum proteins; antigens of human serum*, J. Immunol. 74, 158-168, 1955.
16. Underly, Ch.: *Die Immunoelectrophorese in Agar-Gel. Methode und Ergebnisse*, Experientia 13. 421-434, 1957.