

La inmunolectroforesis

CAPITULO I

Fundamentos, materiales y métodos

Por los Dres.:

ALBERTO GRANADO JIMÉNEZ,^(*) JAROSLAV MASOPUST^(**)
Y RAÚL PÉREZ ATENCIO^(***)

La introducción de la técnica de la electroforesis en el estudio de las proteínas, por A. Tiselius, constituyó una aportación importante para la diferenciación de las mezclas de las proteínas. La electroforesis en papel hace posible la separación de las proteínas séricas en cinco o seis fracciones. Con la ayuda de técnicas especiales puede llegarse a obtener de ocho a diez fracciones.¹ Sin embargo, el plasma humano contiene hasta cien o más diferentes fracciones.²

Por eso se buscaron otros métodos que permitieran una diferenciación más completa de las diversas fracciones. Entre aquellos que han obtenido más éxitos, se encuentra la inmunolectroforesis, descubierta en 1953 por Grabar y Williams.³ Con la correcta aplicación de este método se pueden distinguir hasta treinta componentes del espectro de las proteínas séricas.

Como se trata de un método que después de ser utilizado durante más de diez años ofrece numerosas posibilidades

tanto en su aspecto experimental como clínico, queremos en este trabajo dar a conocer a los médicos y trabajadores científicos no sólo su base teórica, sino también transmitir nuestra experiencia práctica, a base de una técnica simple que la hace accesible aún para los laboratorios menos equipados.

PRINCIPIOS DEL METODO

La inmunolectroforesis es la combinación de dos métodos: 1ro., la agaroforesis (electroforesis en el gel de agar), 2do., Inmunoprecipitación por doble difusión.

La agaroforesis separa primero las fracciones proteicas sobre una plaquita de agar gel, en una solución tampón, de acuerdo con la movilidad electroforética (Figura No. 1).

Luego se hace una detección de los componentes proteicos ya separados por medio de la inmunoprecipitación (técnica de Ouchterlony)⁴ es decir se dejan las fracciones difundir contra el anti-suero (suero de caballo o de conejo sensibilizado con proteínas séricas humanas), colocando en él un canalículo paralelo a la dirección de la migración (Figura No. 2).

(*) Jefe del Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina.

(**) Profesor Invitado.

(***) Profesor de Laboratorio Clínico, Escuela de Medicina, Jefe de Laboratorio Clínico, Hospital Infantil.

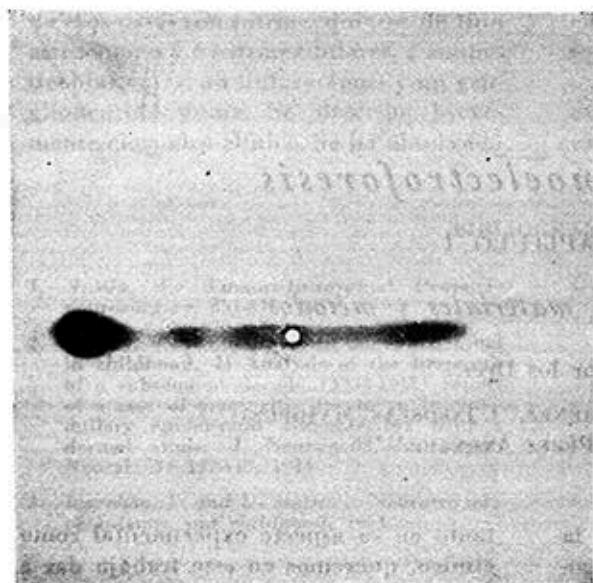


Fig. 1. Agaroforesis, presentando las fracciones proteicas:

- Albúmina*
- Alfa₁ globulina*
- Alfa₂ globulina*
- Beta-globulina*
- Gamma-globulina*

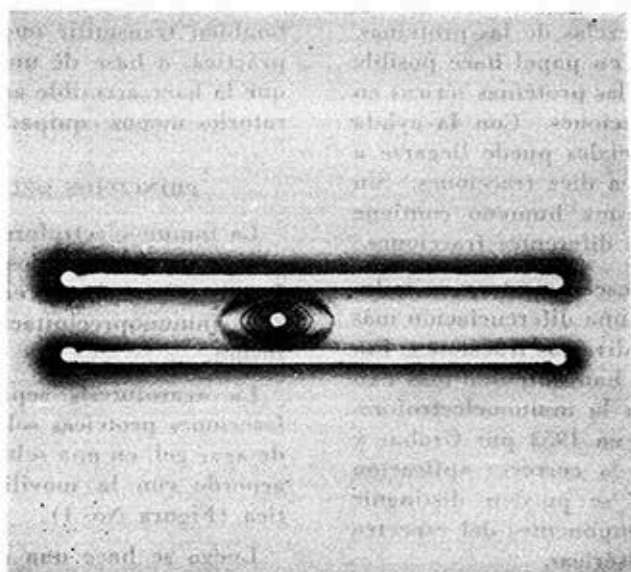


Fig. 2. Inmunoprecipitación según la técnica de Ochterlony. El suero a estudiar se coloca en el punto de partida-circular y el antisuero en los canaliculos.

Si se encuentra en el antígeno (la fracción proteica) con su anticuerpo se forma una línea de precipitación específica (Figura No. 3).

Es decir, que la separación de una

mezcla de proteínas por inmunoelectroforesis es sumamente detallada dado que en ella participan tres procesos fisicoquímicos, o mejor aún, tres propiedades de la molécula proteica, a saber:

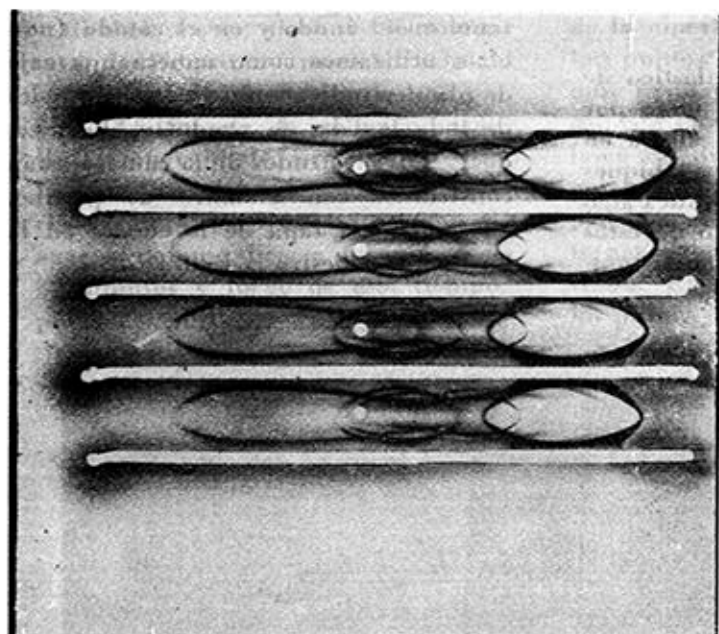


Fig. 3. Inmunolectroforesis presentando las líneas de precipitación de las fracciones:

Albúmina
 Alfa₁ globulina
 Alfa₂ globulina
 Beta₁ globulina
 Inmunoglobulinas

1) la movilidad electroforética; 2) la magnitud de la difusión y 3) las propiedades inmunológicas.

DESCRIPCION DEL METODO

1ro. Purificación del Agar:

Utilizamos Agar Difco o cualquier otro apto para bacteriología. Diez gramos de ester agar se colocan en un Erlenmeyer de dos litros y se suspenden en 1,500 ml. de agua destilada. Se deja decantar durante tres horas, se vierte luego el sobrenadante, repitiendo esta operación dos o tres veces. El agar lavado se suspende en cantidad suficiente de agua para obtener 300 c.c. de solución y se disuelve el agar con la ayuda del Baño-María hirviente. Cuando el agar está bien disuelto se vierte sobre una cubeta plana para obtener un gel de espesor uniforme de alrededor de 1 cm. se deja gelificar durante el tiempo necesario (alrededor de una hora y luego se corta en cubitos de 1 cm³ aproximadamente.

Estos cubitos se lavan con agua destilada cuatro veces por día durante ocho o diez días, conservándolos en el refrigerador. Transcurrido este tiempo el agar está listo para ser utilizado y debe ser conservado siempre en el refrigerador.

2do. Soluciones Buffer:¹

a) Buffer para la preparación de las placas de agar:

| | | |
|---------------------------------------|-------|-----|
| Acido dietil-barbitúrico . | 1.66 | gr. |
| Dietil barbiturado de sodio | 10.51 | gr. |
| Cloruro de Calcio 2H ₂ O . | 0.58 | gr. |
| Agua bidestilada, c.s.p. . | 1.000 | cc. |

b) Buffer para cámara electroforética:

| | | |
|---------------------------------------|-------|-----|
| Acido dietil-barbitúrico . | 1.38 | gr. |
| Dietil-barbiturato de sodio | 8.76 | gr. |
| Cloruro de calcio 2H ₂ O . | 0.58 | gr. |
| Agua bidestilada, c.s.p. . | 1.000 | cc. |

3ro. Cámara Electroforética:

Se utiliza una cubeta de plástico de aproximadamente 20 cm. de largo por 16 cm. de ancho y 8 cm. de altura en cuyo interior se encuentran dos tabiques del mismo material y de una altura algo inferior a la cubeta, el objeto de estos tabiques es de mantener un pH cons-

tante en el ánodo y en el cátodo (nosotros utilizamos como cubeta una caja de plástico muy común en los hospitales de toda la Isla, de productos liofilizados). Los electrodos de la cámara están contruidos con alambre de platino, adosados a la tapa de la cubeta en la forma que muestra la figura No. 4.

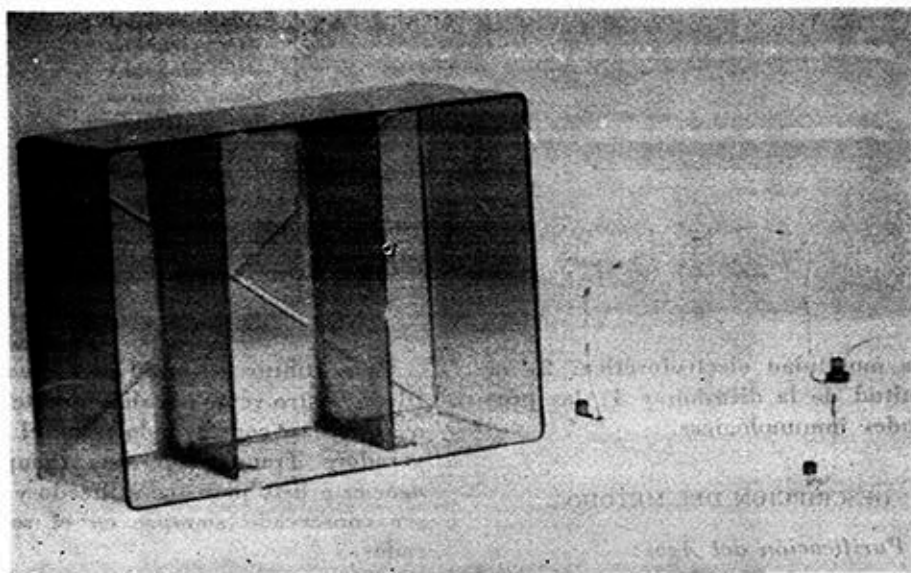


Fig. 4. Cubeta de material plástico con electrodos de hilos de platino construida en nuestro laboratorio.

FUENTES DE PODER

Como fuente de corriente continua se puede utilizar cualquier equipo que sea capaz de producir una corriente de 0 a 40 miliamperes y un voltaje que varía de 0 a 300 voltios y que puedan ser factibles de regulación.

Preparación de las placas de agar:

1) Materia!:

- a) Placas de vidrio plano de 8.5 cm. de largo por 8.5 cm. de ancho y 1 ó 2 mm. de espesor.

- b) Solución de agar Buffer: se colocan 11 gr. de agar purificado en un Erlenmeyer de 150 cc. de capacidad y se agregan 4 ml. de agua bidestilada, se disuelve con agua al calor y se agregan luego 8 ml. de la solución de Buffer para agar y se calienta hasta ebullición. Esta cantidad es suficiente para cubrir dos placas.

2) Preparación:

Se lavan las placas de vidrio con detergente, luego con agua destilada

y finalmente con alcohol. Se coloca esta placa sobre una mesa horizontal y se le agrega por medio de una pipeta 8.5 m. de la solución agar Buffer en caliente, procurando que la superficie del agar quede lo más regular posible. Estas placas con el agar se dejan gelificar durante 15 ó 30 minutos y luego de este tiempo pueden ser utilizadas o guardadas en

de la superficie de agar sobre la placa. Los puntos de partida, que deben de ser muy regulares y exactos entre sí, se hacen con la ayuda de una aguja hipodérmica de diámetro exterior de 2 mm. aproximadamente, cuya punta ha sido previamente limada y cuyas paredes externas deben presentar una superficie filosa. El desprendimiento del agar en los puntos de partida se hace por medio

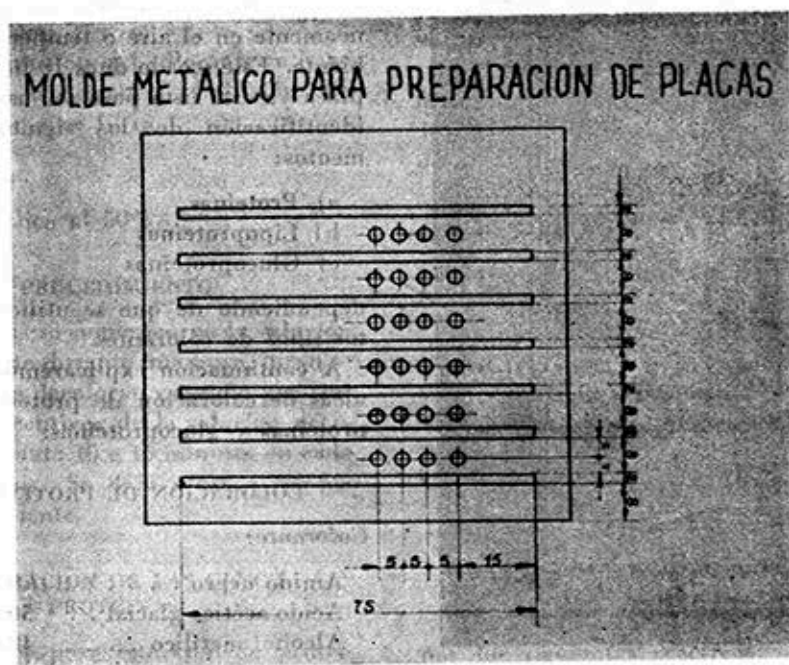


Fig. 5. Esquema de la placa utilizada para la preparación de placas de agar para inmunoelectroforesis.

cámara húmeda para su utilización posterior.

PREPARACION DE LOS CANALICULOS Y DEL PUNTO DE PARTIDA

Con la ayuda de una placa de plástico, acero inoxidable, o aluminio donde se encuentran ya troquelados los puntos de partida y los canalículos tal como se ve en la figura No. 5, se hace el corte

de la succión con un tubo de goma adicionado a la aguja. Los canalículos se cortan con una cuchilla especial o en su defecto se usan dos hojas de bisturí unidas por medio de un aplicador (Figura No. 6).

PROCEDIMIENTO DE LA AGAROFRESIS

En los puntos de partida y con la ayuda de un tubo capilar se coloca la

muestra proteica. La placa así preparada se pone en la cámara electroforética y los extremos del agar gel se unen al Buffer por medio de dos tiras de papel de filtro. Se conecta la cámara a la fuente de poder haciendo pasar una corriente continua de 6 miliamperes por placa durante 2 ó 3 horas (variando el tiempo de acuerdo con la temperatura del medio, la temperatura del gel, la

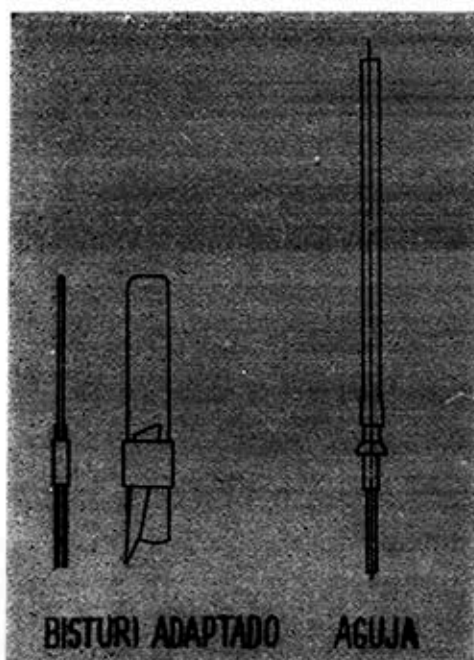


Fig. 6. Bisturí y aguja adaptado para desprendimiento del agar de los canalículos y puntos de partida respectivamente.

fuerza iónica, etc. Es inútil para observar la marcha de la migración electroforética colocar una gota de la solución de bromofenol al 1% en buffer junto con una gota de la proteína en estudio, que sirve como testigo.

INMUNOPRECIPITACION

Después de la migración electroforética se quita el agar de los canalículos y

con la ayuda de una micropipeta se llenan éstos con el antisuero y se lleva la placa a una cámara húmeda. Se deja precipitar entre 12 y 18 horas. Se lava luego la placa con solución fisiológica y se eliminan a continuación las proteínas que no reaccionaron dejando la placa en solución fisiológica durante 3 horas y luego en agua bidestilada de 3 a 5 horas. Las placas así lavadas se envuelven luego en un papel de filtro humedecido con agua destilada y se deja secar espontáneamente en el aire o temperatura ambiente. Este secado dura 10 horas. Esta placa ya está lista para ser usada en la identificación de los siguientes elementos:

- a) Proteínas
- b) Lipoproteínas
- c) Glucoproteínas

dependiendo de que se utilicen distintos tipos de colorantes.

A continuación explicaremos las técnicas de coloración de proteínas, lipoproteínas y glucoproteínas.

COLORACION DE PROTEINAS

Colorante:

| | |
|----------------------------|-----------|
| Amido negro | 0.5 gr. |
| Acido acético glacial . . | 50.00 ml. |
| Alcohol metílico | 40.00 ml. |

Mezclar y filtrar:

Decolorante:

| | |
|-------------------------------|-----------|
| Alcohol metílico | 50 partes |
| Agua destilada | 40 " |
| Acido acético glacial | 10 " |

PROCEDIMIENTO

1. Las placas se lavan con agua destilada para librarlas de las fibras de papel de filtro que se adhieren a la película de agar.
2. Se sumergen las placas en la solución colorante de 5 a 10 minutos.

3. Se decoloran por medio de 3 baños de la solución decolorante, manteniéndose de 3 a 6 minutos en cada uno de los baños.
4. Se dejan secar espontáneamente en el aire, a la temperatura ambiente.

COLORACION DE LIPOPROTEINAS

Colorante:

Sudán negro 0.5 gr.
Alcohol etílico al 60% . 500.00 ml.

La disolución del colorante se hace calentando la mezcla a ebullición. Se deja enfriar y se filtra.

Decolorante:

Alcohol etílico al 50%.

PROCEDIMIENTO

Las placas se sumergen en la solución del colorante durante una hora, luego se extraen y se decoloran pasando por tres baños consecutivos de la solución decolorante durante 10 a 15 minutos en cada uno de ellos. Se deja secar a temperatura ambiente.

COLORACION DE LAS GLUCO- PROTEINAS²

Utilizamos para este tipo de proteínas la reacción de Nadi.

Reactivos:

Solución de ácido periódico: Un gramo de ácido periódico se disuelve en 30 ó 50 ml. de agua destilada, se le añade 2.72 gr. de acetato de sodio, 3H₂O, y se completa hasta 100 ml. con agua destilada.

Solución de clorhidrato de hidroxilamina en Buffer acético: (pH 4.7): 10 gr. de clorhidrato de hidroxilamina se disuelven en 100 ml. de Buffer acético (el Buffer acético se hace con 5,144 gr. de

acetato de sodio, 3H₂O, 2.4 ml. de ácido acético glacial y se disuelve el total en cantidad suficiente para 200 ml. de agua destilada.

Solución de alfa-naftol 0.01 Molar: Disolver 144 mg. de alfa-naftol y 37.2 mg. de ácido etilen-diaminotetraacético en 1,000 ml. de agua.

Solución de parafenilen-diamina 0.01 Molar: Disolver 200 mg. de parafenilen-diamina y 37.2 mg. de ácido etilendiaminotetraacético en 1,000 ml. de agua otra solución.

Solución de peróxido de hidrógeno 0.1 Molar: Un ml. de agua oxigenada al 30% complementarlo a 10 ml. con agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Las placas ya lavadas y secadas se colocan en las soluciones siguientes:

- a) En la solución de hidroxilamina, 15 minutos
- b) En agua corriente, 15 minutos
- c) En la solución de ácido periódico, 10 minutos
- d) En agua corriente, 10 minutos
- e) En solución colorante, 5 o 10 minutos
- f) Agua corriente, 5 a 10 minutos

La solución colorante está constituida por los siguientes reactivos:

Solución de Alfa-naftol

0.1 M 1 parte

Solución de parafenilen-dia-

mina 0.01 M 1 parte

Solución de H₂O₂

0.1 M 0.2 parte

PREPARACION DE LOS ANTISUEROS⁴

Antígeno:

Suero humano 25 ml.
Agua destilada 80 ml.
Solución (SO₄)₂ AlK.2 H₂O al
10% 90 ml.

Se mezcla agitando y con ayuda de una solución de HONa 5 N se lleva a un pH 6.5. Esta mezcla se centrifuga y el sedimento se lava dos veces con una solución salina fisiológica. El sedimento lavado se suspende en solución de ClNa al 9 por mil esp. 100 ml.

ESQUEMA DE LA INMUNIZACION DEL CONEJO

Debe utilizarse un conejo de buen peso, aproximadamente 2.5 Kg.

Día 1°.: Se inyecta 5 ml. de la suspensión por vía intramuscular en cada extremidad del conejo.

Día 14.: Se repite la operación anterior.

Día 24.: Se inyecta por vía intraperitoneal 1 ml. de suero humano fresco. Agregando 100 mil U. de penicilina y 250 mg. de estreptomina.

Día 34.: Se inyecta por vía intravenosa (vena marginal de la oreja), 1 ml. de suero humano diluido de manera que la concentración de proteínas sea de 1 gr. %. Agregando también los antibióticos.

Día 44.: Se extrae muestra de sangre del conejo para probar la cantidad y calidad de los anticuerpos por medio de la inmunoelectroforesis.

Si esta prueba sólo muestra de 8 a 10 líneas de precipitación o en el caso de presentar más, éstas son muy débiles, debe continuarse la inmunización. Para ello debe continuarse inyectando 1 ml. de suero diluido por vía endovenosa ó 1 ml. de suero natural por vía intramuscular y después de cada semana de esta aplicación volver a probar la cantidad de los anticuerpos por medio de la inmunoelectroforesis. Cuando los resultados nos indican que no puede aumentarse los anticuerpos en la sangre del conejo se le extrae toda la cantidad de sangre posible, se deja coagular, se separa el suero del coágulo, se filtra el suero por medio de un filtro de Zeiss para esterilizarlo, y se guarda en ampulas cerradas.

Una vez obtenidos estos materiales y siguiendo los métodos descritos anteriormente, cualquier Laboratorio Clínico puede incluir entre sus métodos de trabajo la aplicación de la inmunoelectroforesis.

RESUMEN

1. El trabajo presenta los fundamentos teóricos de inmunoelectroforesis.
2. Se describe una metódica modificada de obtención de antisuero antihumano de conejo.
3. Hay una descripción detallada de una modificación del método para poder ser usados en los laboratorios no especializados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Aronsson, T., Grönwall, A.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 9, 338, 1957.
- 2.—Grabar, P. Burtin, P.: Analyse immunoelectrophorétique. Masson Cie., París, 1960.
- 3.—Grabar, P. Williams, C. A.: Méthode Permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques. Application au serum sanguin. Biochim. Biophys. Acta 10, 193, 1953.
- 4.—Hirschfeld, J.: Immunoelectrophoresis. Procedure and Application to the Study of Group-Specific Variations in Sera. Science Tools 7, 18-25, 1960.
- 5.—Ouchterlony, Ö.: Diffusion in Gel Methods for Immunological Analysis. Progr. Allergy 5: 1, 1958.
- 6.—Scheidegger, J. J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. Internat. Arch. Allergy, 7: 103, 1955.
- 7.—Wunderly, Ch.: La Electroforesis en papel. Edit. Científico Médica, Barcelona, 1960, pág. 84 (2da. edición).