

La inmunolectroforesis

CAPITULO III

La aplicación de la inmunolectroforesis en la medicina

La inmunolectroforesis por su gran capacidad de diferenciación, pertenece ya a los métodos fundamentales del estudio de las proteínas, y dentro de éstas donde mayores resultados de interés ha presentado es en el conocimiento de las proteínas plasmáticas.

A medida que los estudios médicos han profundizado en el carácter bioquímico de las enfermedades y por consiguiente han necesitado utilizar estas técnicas fundamentales, para ayudar en el diagnóstico y en el pronóstico, se hacen más necesarios y útiles la aplicación de estos métodos. De esto dan cabal pauta las numerosas publicaciones llevadas a cabo en los últimos años. A continuación pasaremos revista a una serie de posibilidades en las cuales es muy útil el uso de la inmunolectroforesis para el correcto conocimiento de las mismas:

- a) Alteración de las inmunoglobulinas.
 - b) Descubrimiento de grupos genéticos.
 - c) Caracterización de las proteínas en diferentes líquidos biológicos.
 - d) Estudios de la relación entre las proteínas séricas y tisulares.
- A) *Alteración de las inmunoglobulinas.* Las inmunoglobulinas forman un grupo de las proteínas plasmáticas que son portadoras de anticuerpos. Estas proteínas se desarrollan du-

rante el transcurso de la vida, y por lo tanto tiene mucha importancia en la formación de las mismas el medio ambiente en que crece el individuo, y las agresiones que recibe de este medio; contra los cuales el organismo responde formando sustancias específicas para cada uno de los elementos extraños que lo invaden o atacan y que en ese caso actúan como antígenos creadores de anticuerpos. Para el estudio de las inmunoglobulinas, el método de preferencia en estos momentos es la inmunolectroforesis. Entre las alteraciones de las inmunoglobulinas tenemos las siguientes:

- I) Las para-proteinemias: a) obligatoria, b) facultativas y c) idiopáticas.
- II) Las dis Gamma-globulinemias.
- III) Agammaglobulinemias.

A continuación desarrollaremos brevemente el estudio de cada una de estas alteraciones.

- I) *Las para-proteinemias.* Son estados patológicos en los cuales existen en el suero sanguíneo, proteínas cualitativamente alteradas denominadas para-proteínas. La inmunolectroforesis en estos casos es un método de primerísima necesidad pues solo

por este método se pueden reconocer las diferentes paraproteinemias. En estos casos las imágenes inmunoelectroforéticas for-

Los cuadros fundamentales que se presentan aparecen en la figura 1. Así en la figura A, vemos el arco atípico de la línea Gam-

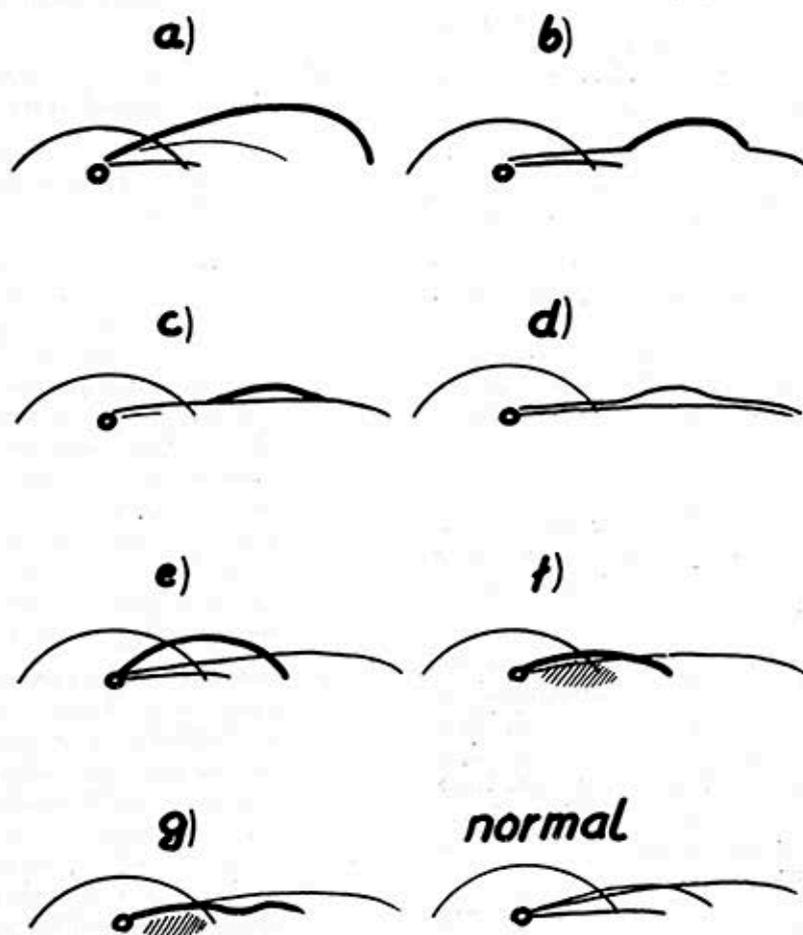


Figura No. 1. Esquemas de algunos cuadros típicos de paraproteinemias:

a-b-c-d: Paraproteinemias del tipo γ
 e: " " " β 2A
 f-g: " " " β 2M

El esquema normal contiene las líneas:

A₁S (siderofilina) β 2A, β 2M y γ globulina

man líneas atípicas (arcos formados anormalmente) que están siempre en relación con las líneas normales de la inmunoglobulina.

ma en forma de un arco muy convexo y amplio que muestra un exceso de antígeno muy grande pues el precipitado se disuel-

ve en dicho antígeno en exceso, por lo tanto presenta una parte precipitada en los extremos y otra difusa en el centro.

En la figura B, vemos el arco atípico que se forma en cualquier parte a lo largo de la línea Gamma normal en tal forma que se fusiona con ella.

En la figura C, este arco se forma sobre la línea Gamma normal a todo lo largo de su trayecto.

En la figura D, se muestra un desdoblamiento de la línea Gamma en la cual la línea de las paraproteínas va paralela a la normal formando en la parte de mayor concentración de antígeno un arco convexo.

En la figura E, vemos alteraciones en la línea de la Beta₂A-globulina que es atípicamente convexa y más visible que la normal.

La figura F nos enseña el aumento de la Beta₂Macroglobulina en forma de una línea atípica y con la presencia de una precipitación en el agar, lo cual se hace espontáneamente debido al carácter de macromolécula del antígeno.

La figura G, presenta también en la zona de la Beta₂ Macroglobulina, una doble onda y también precipitación de la Macroglobulina en el agar. De acuerdo con Bachman y Laurell,¹ con la ayuda de la inmunoelectroforesis y el uso de diferentes tipos de antisueros específicos, es decir antisuero-anti-gamma₂, anti-Beta₂Macroglobulina y anti-Beta₂A-globulina se pueden clasificar las paraproteinemias en cuatro tipos.

- I) Las paraproteinemias de tipo Gamma.
- I) Las paraproteinemias de tipo Beta₂A.
- II) Las paraproteinemias de tipo Beta₂A.
- III) Las paraproteinemias de tipo Beta₂Macroglobulina.
- IV) Las paraproteinemias del tipo Gammamicroglobulina o del tipo Bence-Jones.

La diagnosis de cada uno de estos casos puede hacerse eventualmente con un suero polivalente, pero esto es muy difícil pues las paraproteínas poseen además de sus grupos determinantes atípicos otros grupos determinantes comunes a la inmunoglobulina normal, y por lo tanto para poder determinar correctamente cada uno de los tipos antes citados de paraproteinemias debemos seguir el siguiente esquema.

Análisis inmunoelectroforético. Cada suero después de la inmunoelectroforesis se precipita por cuatro tipos de antisueros específicos (anti-Gamma-globulina, anti-Beta₂A-globulina, anti-Beta₂Macroglobulina y mezcla de estos antisueros) y además por un antisuero antihumano normal del caballo. (Mieloma componente o paraproteína).

Prueba de la depolimerización del M-Componente. Una solución de Cisteína 0.2 M. disuelta en una solución 0.2 M. de E.D.T.A. neutralizado por hidróxido de sodio) se mezcla con el suero en proporción de 1:1 y se deja en vacío en refrigeración durante toda la noche. Se hace luego dos análisis inmunoelectroforéticos

uno sin depolimerización y otro con el compuesto depolimerizado, precipitando ambos con el antisuero anti-Beta₂M-globulina y con el antisuero antihumano normal.

I) Resultados con antisuero anti-Gamma-globulina.

A) Se forma una precipitación atípica de la línea Gamma.

B) El M-Componente precipita ya en el agar gel cerca del punto de partida. Pueden darse dos casos 1) la apariencia de la línea no se cambia cuando se repite la inmunoelectroforesis en el suero que tratado con Cisteína. El M-Componente migra en electroforesis en almidón gel o contiene en su molécula menos del 2% de hexosas.

El M-Componente migra después de actuar el suero con la Cisteína y da una línea más o menos típica de la Beta₂M-globulina.

C) No se produce ninguna precipitación química con este antisuero.

II) Resultados con antisuero Beta₂A-globulina.

A) Se forma un arco atípico de la Beta₂A-globulina en la posición del M-Componente.

B) No se forma el arco atípico.

III) Los resultados por antisuero Anti-B₂M-globulina.

A) Se forma un arco atípico de la Beta₂M-globulina.

B) El M-Componente queda cerca del punto de partida y forma una precipitación libre con el anti-

suero. Contiene más del 3% de hexosas. Se forma un arco atípico después de tratar el suero con Cisteína y usando antisuero Anti-Beta₂M-globulina o antisuero polivalente.

C) No se forma un arco atípico.

IV) No se produce un precipitado espontáneo alrededor del punto de partida, ni tampoco se produce una línea de precipitación con ninguno de los tres antisue-ros anteriores pero se forma una línea Gamma atípica al usar el suero polivalente o una mezcla de los tres antisue-ros anteriores.

A) Se forma una desviación de la línea Gamma normal sin desdoblamiento, o la línea Gamma normal se desdobra en la posición del M-Componente.

B-1) El M-Componente forma un arco grueso cuya posición indica la proporción en que se encuentran entre sí el antígeno y el anticuerpo (el M-Componente se encuentra en la orina en una proporción menor que la albúmina.

B-2) El M-Componente forma una línea fina con gran difusibilidad cuya posición indica que esta difusibilidad es la típica de proteínas que posee un P.M. menor de 150.000.

V) La electroforesis en papel de las proteínas de la orina indica que el cociente (albúmina/M-Componente) es menor que en el suero. A continuación ofrecemos un diagrama según Bachmann y Laurell,¹ mediante el cual se pueden determinar las diferentes paraproteinemias.

Tipos de exámenes relacionados en texto				Límites de variación caracterizando cada grupo inmunológico							
				Gamma			Beta 2-A	Beta 2-M		Gamma-M	
I	A			+							
	B	$\frac{1}{2}$			+						
	C					+	+	+	+	+	+
II	A						+				
	B				+	+	+	+		+	+
III	A							+			
	B								+		
	C				+	+	+	+		+	+
IV	A										
	B	1									
V		2									
										+	+

DISGAMMAGLOBULINEMIAS. (Síndromes Disociados)⁶

Inmunolectroforéticamente, es posible distinguir las siguientes variantes:

- a) *Ausencia de fracción Beta 2A y Beta 2M con normal Gamma-globulinemia.*

Giedion, Scheidegger.³ En el cuadro clínico podemos encontrar repetidas infecciones bacterianas. La tasa de Gamma-globulina es normal pero la inmunolectroforesis pone en evidencia la falta de fracciones Beta 2A y Beta 2M. Las isoaglutininas están disminuidas y tampoco se producen anticuerpos después del estímulo antigénico.

- b) *Déficit aislado de Beta 2A con Beta 2M y Gamma normales.*

Casos de este tipo han sido señalados Hong,⁷ Roth⁹ y West.¹¹ Clínicamente no son acompañadas sistemáticamente de un cuadro de defecto de anticuerpos bien definidos.

- c) *Aumento de fracciones Beta 2M con disminución de fracciones Gamma y Beta 2A.*

Se trata de una situación en la que están disminuidas las globulinas 7S (Gamma y Beta 2A) y aumentadas las 19S (Beta 2M), (Gitlin y Cols.)⁴ Tampoco en esta variante es la infección lo característico o, por lo menos la conceplibilidad del niño a infecciones bacterianas serias fue mucho menos que en otras agammaglobulinemias.

AGAMMAGLOBULINEMIAS. (Hipogammaglobulinemias)

Este término introducido a la medicina por Bruton² no es rigurosamente exacto, porque en ningún caso existe ausencia absoluta de gamma-globulina. En la actualidad podemos distinguir diferentes variantes de este síndrome que muestra, generalmente, una incapacidad para producir anticuerpos circulantes, con una historia de infecciones a repetición que exhiben estos enfermos. En el cuadro inmunolectroforético se en-

cuentra déficit de todas las fracciones inmunoglobulínicas.

1. AGAMMAGLOBULINEMIAS CONGÉNITA.⁴

Características importantes de la enfermedad son su carácter hereditario y ser prácticamente exclusividad del sexo masculino. Se trata de trastornos genéticos (Alteración en la síntesis molecular) que señala desde el punto de vista clínico una hipoplasia del tejido linfoide con una historia de repetidas infecciones bacterianas. Desde el punto de vista bioquímico, el rasgo más sobresaliente definitorio, consiste en la disminución marcada de las tres fracciones fundamentales del sistema Gamma. La cantidad de la Gamma-globulina total varía alrededor de 25 mg. por 100 ml. del suero. En el cuadro inmunolectroforético falta la fracción Beta 2A y Beta 2M; la línea Gamma está muy disminuida. Good⁵ refiere encontrar tres líneas de precipitación que no aparecen en normales: la Gamma₁A, la Beta 2E y la Beta 2K.

2. AGAMMAGLOBULINEMIA ADQUIRIDA.⁶

La forma adquirida de la agammaglobulinemia (hipogammaglobulinemia) afecta equitativamente a los dos sexos. También la cantidad de la gammaglobulina es mayor que en las formas congénitas: entre 50 y 150 mgl.%. Por inmunolectroforesis, es posible demostrar en estos casos fracciones Beta 2A y Beta 2M (disminuidas).

3. HIPOGAMMAGLOBULINEMIA TRANSITORIA.⁶

En los niños de 3 a 6 meses podemos encontrar una hipogammaglobulinemia fisiológica debido a la incapacidad a producir una cantidad suficiente de in-

munoglobulinas. El recién nacido no puede elaborar los anticuerpos, pero tiene la gammaglobulina que pasó por la placenta desde la circulación de la madre. No posee las fracciones Beta 2-A y Beta 2M (Fig. No. 2). Durante el primer mes después del nacimiento el nivel de la gammaglobulina se disminuye rápidamente por catabolismo y por el aumento del volumen sanguíneo. Al fin del primer mes empieza el niño a producir sus anticuerpos, pero no en cantidad suficiente. La gammaglobulinemia sigue baja, pero no tan rápidamente. En el tercer mes alcanza su mínimo (un promedio de 500 mgl.%). Desde este tiempo normalmente, el nivel de la gammaglobulina comienza a subir porque la producción de los anticuerpos propios en el lactante tiene prevalencia sobre el catabolismo y porque la dilución de la gammaglobulina propia está atrasada, la disminución de gammaglobulinemia continúa y alcanza a los valores patológicos (sobre 200 ó 100 mgl.%). Este estado se llama de hipogammaglobulinemia transitoria. En la inmunolectroforesis podemos encontrar disminución de la línea gamma, déficit de Beta 2A y de Beta 2B (algunas veces aumentada).

4. HIPOGAMMAGLOBULINEMIA SECUNDARIA

Son sintomáticas de un proceso básico o de una condición inductora. Por ejemplo el mieloma o las paraproteinemias, son frecuentemente acompañadas por una hipogammaglobulinemia. Otro tipo es la hipogammaglobulinemia de origen hipercatabólico que ha sido observada en la colitis ulcerosa o en la gastritis hipertrófica benigna. En el síndrome nefrótico podemos encontrar dos causas de la hipogammaglobulinemia: el incremento catabólico, la pérdida por la orina. (Fig. No. 3).

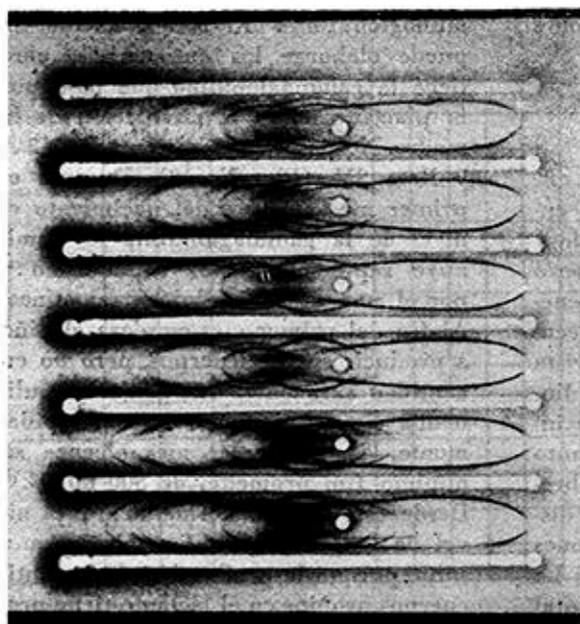
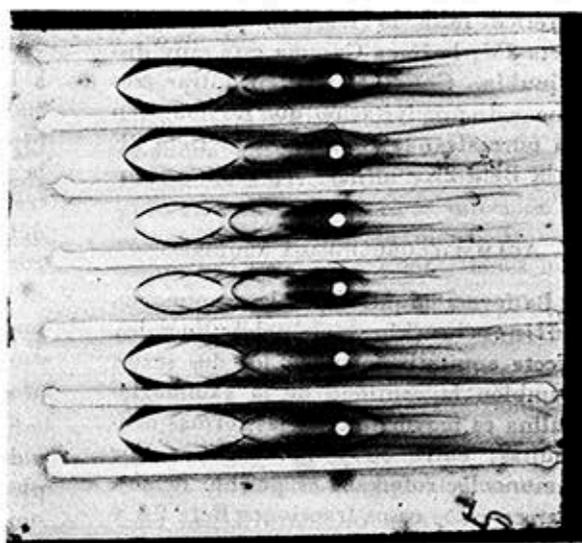


Figura 2. Comparación de Inmunolectroforograma de suero de recién nacido (4 superiores) y de adultos (2 inferiores)

Figura 3. Cuadro Inmunolectroforético de suero hipogammaglobulinemia en el síndrome nefrótico (2 centrales). Comparado con sueros superiores (2 superiores) y con sueros de aumento de γ globulina (2 inferiores).



DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN HECEs FECALES

Las heces fecales normales poseen muy pequeñas cantidades de proteínas plasmáticas que no pueden ser determinadas en un homogeneizado normal, sin embargo existen enfermedades en las

cuales la cantidad de proteínas expulsadas por este medio crece considerablemente.

En primer lugar de este tipo de patología tenemos la enteropatía exudativa, término empleado por Gordon para definir las pérdidas de las pro-

teínas plasmáticas a través del tracto gastrointestinal. Para su diagnóstico se utilizó la eliminación de la polivinilpirrolidina marcada con I^{131} , que es una macromolécula, biológicamente inerte, que después de ser inyectada por vía endovenosa, se elimina en estos casos patológicos en un porcentaje que varía de 3 al 20%. (En casos normales esta eliminación varía de 0 a 1.5%). Este tipo de diagnóstico, con elementos radioactivos necesita un equipo especial para la detección de la radioactividad amén de los trastornos que representan la inyección de un elemento de este tipo.

Otra forma de diagnóstico mucho más sencilla y accesible a cualquier laboratorio, consiste en aplicar la técnica inmuno-electroforética. Recomendamos para ello la técnica que a continuación describimos.

A) Preparación del extracto de materias fecales.

Deben usarse heces fecales frescas para evitar la acción de las enzimas

proteolíticas. En caso de consistencia líquida de las heces se pueden centrifugar directamente y utilizar el líquido sobrenadante. Si la consistencia es muy sólida se mezclan 3 gr. de las heces con 2 ml. de buffer barbitúrico (pH-8,6) en un beaker, se homogeniza con una varilla de vidrio. Se centrifuga alrededor de 10' a 3,000 R.P.M. y el líquido sobrenadante se utiliza para la inmuno-electroforesis. La lectura de la placa electroforética nos permitirá no sólo la detección de las proteínas sino también la fracción de las mismas que son eliminadas por las heces. La figura No. 4 presenta un caso grave donde el extracto de heces contiene prácticamente todas las fracciones del suero. Hay veces en que estas proteínas plasmáticas se pueden encontrar en las materias fecales debido a otras patologías y gastroenteritis celiaca, esprue, pancreatofibrosis, etc., en otros casos encontramos sobre todo la fracción albúmina, y algunas veces Alfa₁. El paso a través del epitelio intestinal de las fracciones globulínicas de alto P.M. indica una alte-

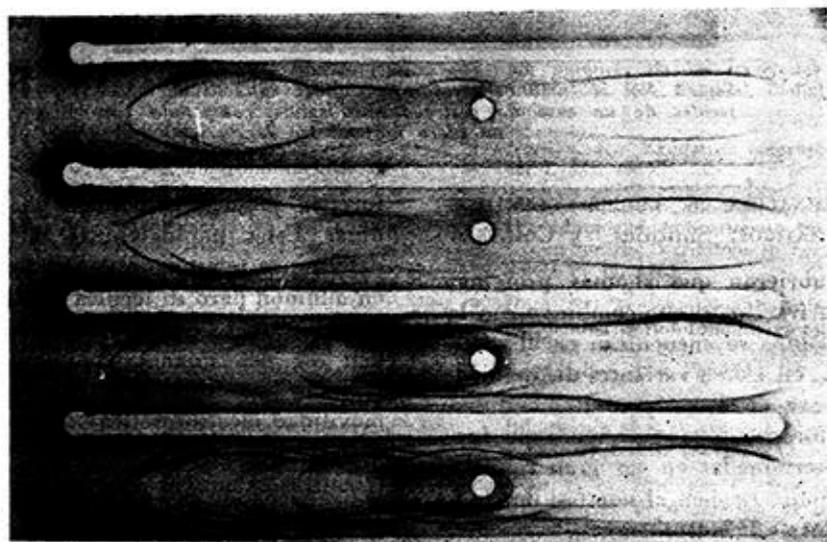


Figura No. 4. Inmuno-electroforesis del extracto de heces (2 superior) de casos de enteropatía exudativa, comparada con la del suero de los mismos pacientes (2 inferior). Electroforograma obtenido en el Hospital Infantil de Praga.

ración grave. La figura No. 5 presenta un caso de diarrea con gastroenteritis aguda y la imagen inmunolectroforética correspondiente. Se recomienda añadir a las heces un antiproteolítico que detenga la acción enzimática proteolítica de las bacterias.

G. C-componentes. La determinación de los tipos de haptoglobinas y G. c-componentes se utilizan en antropología y para la determinación de paternidad en Med. legal. (Para la determinación de las haptoglobinas se debe saturar en Hb previa la determinación inmunolectro-

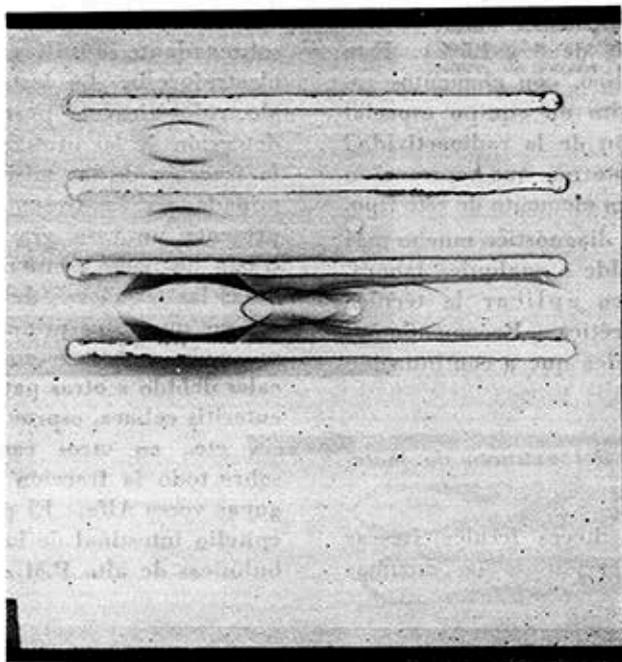


Figura No. 5. Inmunolectroforograma del extracto de heces fecales de un caso de gastroenteritis aguda, comparado con un suero normal.

DETERMINACIÓN DE GRUPOS GENÉTICOS PLASMÁTICOS. Smithies¹⁰ y Cols.

Descubrieron que algunas proteínas es decir fracciones que combinan con la hemoglobina se encuentran en el suero humano en 1 de 3 variantes distinguiéndose unas de otras por su movilidad electroforética. Estas fracciones que fueron determinadas en un gran número de personas reciben el nombre de Haptoglobinas y se transmiten genéticamente.

Hirschfeld⁶ demostró que existían otras fracciones también genéticamente transmitidas a las que denominó las

forética y luego se colorea por bencidina. Estas haptoglobinas se pueden determinar por medio de electroforesis en almidón pero su técnica es más complicada. Los G. c-componentes sólo pueden ser determinados por medio de inmunolectroforesis, de acuerdo con su movilidad electroforética).

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN DIFERENTES LÍQUIDOS BIOLÓGICOS.

Existen un gran número de posibilidades en la aplicación de la inmunolectroforesis en medicina, bioquímica,

por ejemplo se puede determinar la presencia de otras proteínas en sustancias químicamente puras y la Gamma-globulina de tipo comercial. También se puede seguir el grado de purificación de una fracción molecular para fines terapéuticos o científicos, la determinación de proteínas séricas en L.C.R. en orina normal, etc.

1) *Relación entre las proteínas séricas y tisulares.*

Un campo de investigación muy vasto se abre frente a este tipo de trabajo. La inmunización de los animales con antígenos formados por homogeneizados de tejidos y la comparación de los cuadros inmunoeléctroforéticos, nos permitirá adentrarnos cada día más en las relaciones que existen entre las alteraciones proteicas del plasma y las alteraciones de los tejidos. El estudio de la bioquímica comparativa de las diversas fracciones proteicas a lo largo de la

escala zoológica y la comparación con las del suero antihumano.

RESUMEN

Se presentan las diferentes variedades de la inmunoeléctroforesis para su aplicación en la Medicina con fines diagnósticos y para la investigación, y se incluye:

1. Una guía para distinguir las diferentes paraproteinemias.
2. Una técnica para determinar los diferentes tipos de disgammaglobulinemias.
3. Se da un método simple para el diagnóstico de las enteropatías exudativa.
4. Se señalan las posibilidades de uso de la IE en la genética.
5. Se muestran otras aplicaciones para el estudio de las proteínas tisulares y plasmáticas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—*Bachmann, R., Laurell, C. B.*: Electrophoretic and Immunologic Classification of M-Components in serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15, suppl. 69, 1963.
- 2.—*Bruton, O. C.*: Agammaglobulinemia. *Pediatrics*, 9: 722, 1952.
- 3.—*Giedion, A., Scheidegger, J. J.*: Kongenitale Immunoforese bei Feblen Shefisher Beta-2 Globuline uno quantitativ normalen gammaglobulin. *Helv. Ped. Acta* 12, 241, 1957.
- 4.—*Gütlin, D., Rosen, F. S., Janeway, C. A.*: Unome susceptibility to infection. *Ped. Clin. North. Amer.* 9: 405, 1962.
- 5.—*Good, R. A., Zak, S. J.*: Clinical investigation of patients with agammaglobulinemia and Hypogammaglobulinemia. *Ped. Clin. North. Amer.* 7: 397, 1960.
- 6.—*Gutián Peña, J., Varela Buján, J. M., Gomer Vidal, E.*: Sobre la patología de las inmunoglobulinas. Una revisión, con aportación de un caso de agammaglobulinemia, por ausencia de las fracciones Beta 2A y Beta 2M. *Rev. Español. Pediat.* 29: 233, 1963.
- 7.—*Gordon, R.*: Exudative enteropathy. *Lancet* I, 325, 1959.
- 8.—*Hirscheid, J.*: Immunoeléctroforesis-Procedure and Application to the study of Group-Specific Variations in Sera. *Science Tools* 7: 18, 1960.
- 9.—*Roth, N.*: Zur semiquantitativen Erfassen der beiden Serum-Immuno, globuline Bets 2A and Beta 2M in Neugeborenen-and Kindesalter. *Ann. Paediatr.* 199: 548, 1962.
- 10.—*Smithies, O., Connell, G. E., Dixon, G. H.*: Inheritance of haptoglobin subtypes. *Amer. J. Human Genet.* 14: 14, 1962.
- 11.—*West, C. D., Hinrichs, V., Hinkle, N. H.*: Quantitative determination of the serum globulins Beta 2A and Beta 2M by immunoeléctrophoretic analysis. *J. Lab. Clin. Med.*, 58: 137, 1961.