

06. 68. 05

RADIOINMUNOELECTROFÓRESIS CUANTITATIVA DE LAS RESPUESTAS PRIMARIAS Y SECUNDARIA, Y TOLERANCIA INMUNOLÓGICA A ALBÚMINA HETERÓLOGA

EVALUACIÓN CRÍTICA DE LA MARCACIÓN DEL ANTÍGENO Y DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS OBTENIDOS POR ESTE MÉTODO

LUIS BORELLA¹, LUIS SCAVINI y ELMO CAPALBO

Tolerancia inmunológica, según Medawar, es una falla específica en la respuesta inmunológica inducida por el contacto en la vida fetal o neonatal con material potencialmente antigénico. Tolerancia a albúmina sérica bovina (ASB) ha sido estudiada en varias especies animales por diversos autores. En la mayoría de estos trabajos no se ha analizado críticamente el antígeno empleado, ni se ha demarcado si el defecto en la formación de anticuerpos humorales a ASB era absoluto o relativo. Iniciamos esta investigación con el propósito de aclarar estos puntos oscuros, los que creemos fundamentales para el conocimiento del mecanismo básico de la tolerancia inmunológica.

En el primer experimento inyectamos ratones recién nacidos con 20 mg de ASB o Inmunoglobulina G humana (IgGH) por vía subcutánea. Al mes fueron reinyectados con ASB o ASB y IgGH en coadyuvante de Freund completo. Los anticuerpos circulantes a ASB fueron determinados por una modificación del método de Farr (1) usando ASB marcada con I-125. Los resultados, a diferencia de Farr, son expresados en microgramos de anti ASB por ml de suero, y fueron obtenidos por comparación con una curva de calibración standard. Los resultados se muestran en Tabla 1. En la columna de la derecha se observa que animales tratados en la vida neonatal con IgGH produjeron un promedio de 209 ± 165 mi-

TABLA I

Anticuerpos a ASB en ratones Bal inoculados con ASB en la vida neonatal

Ratones Nº	7	11
Tratamiento neonatal	ASB 20 mg	IgGH 20 mg
Inmunización	ASB + IgGH	ASB + IgGH
Microgramos anti ASB/ml de suero	209 S $\pm$ 165	27 S $\pm$ 1,7 *

* En cinco ratones no se detectaron anticuerpos circulantes a ASB.

¹ Investigador, Consejo Nacional de Investigaciones C y T.

Congreso argentino de hematología y hemoterapia.
2., Córdoba, 1966. Actas. Buenos Aires, Soc.
Argentina de Hematología y Hemoterapia, Mar.
1968. 990 p.

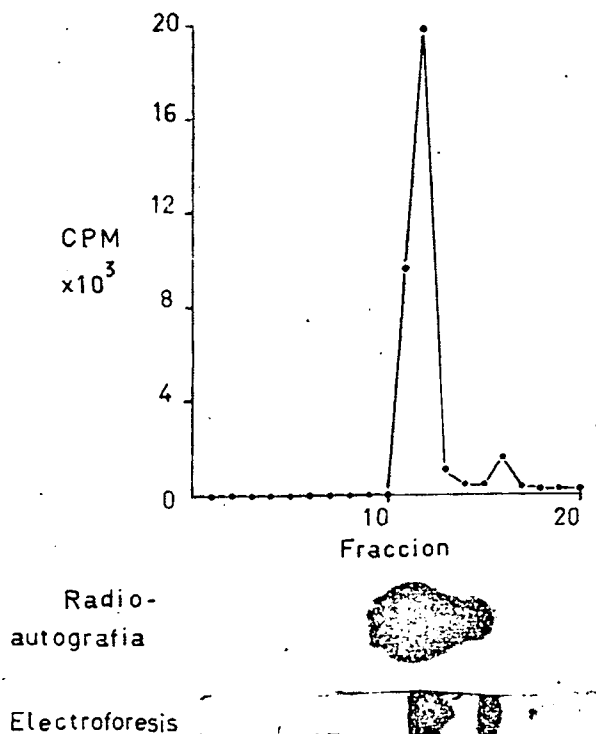
Ref. RG/ 061.3:612.1 C76/1966 (para el Dr.
Capalbo)

7 Sep. 1973.

crogramos de anti ASB por ml de suero, mientras aquellos tratados con ASB produjeron sólo $27 \pm 1,7$ microgramos. Los títulos, por micro hemaglutinación, de anti IgGH fueron similares en ambos grupos. En este experimento encontramos que, a diferencia de Dietrich y Weigle (2), más del 50 % de los ratones "inmunizados" al mes de una inyección neonatal de 20 mg de ASB, producen anticuerpos a ASB.

Al analizar estos resultados es importante conocer la homogeneidad del antígeno utilizado y la eficiencia de la marcación. Para ello efectuamos un estudio de la albúmina marcada mediante electroforesis de disco en gel de acrilamida, radioautografía y conteo de las radiaciones gamma emitidas por fracciones de la columna de gel. En la figura 1 se observa que nuestro antígeno está compuesto a lo menos de dos fragmentos, ambos marcados con I-125. Sin embargo, 90 % de la radioactividad reside en la fracción más electropositiva, la que también posee mayor concentración proteica.

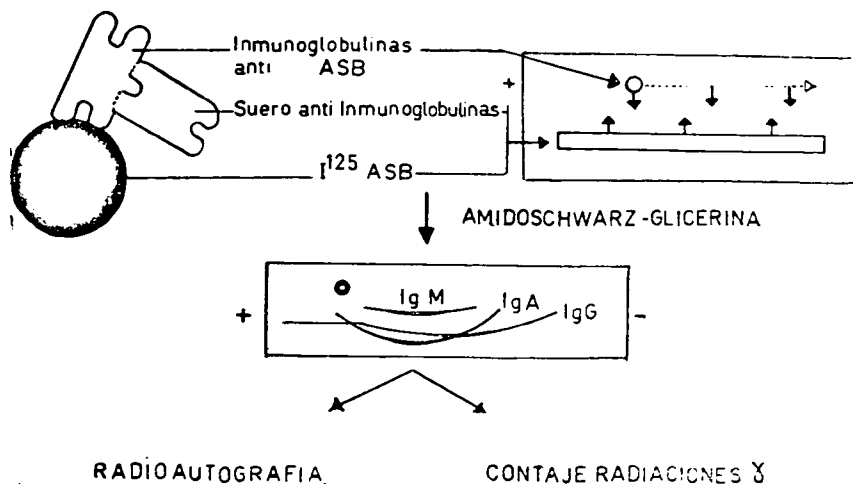
FIG. 1



Con el método de Farr hemos medido la diferencia cuantitativa global en la producción de anticuerpos humorales a ASB en animales tratados o no con ASB en la vida neonatal. Pero nada sabemos de las variaciones

individuales en las inmunoglobulinas anti ASB. Por ello, a fin de obtener simultáneamente información cualitativa y cuantitativa en un solo procedimiento, hemos modificado el método cualitativo de radioinmuno-electroforesis de Yagi (3). En la figura 2 se esquematizan el procedimiento y sus fundamentos. El primer paso es una microinmuno-electroforesis: las bandas de precipitación se producen al combinarse las globulinas M, G y A de un suero de ratón anti ASB con suero de conejo anti globulinas de ratón. En el segundo paso la albúmina bovina marcada migra desde el canal lateral hasta combinarse con la banda de inmunoglobulina portadora de anti ASB, la que por sus radiciones gamma, es autografiada en una película radiográfica. En el tercer paso, mediante un líquido de coloración y decoloración conteniendo glicerina, las bandas son transportadas a viales de plástico para su medición en un espectrómetro de centelleo.

FIG. 2



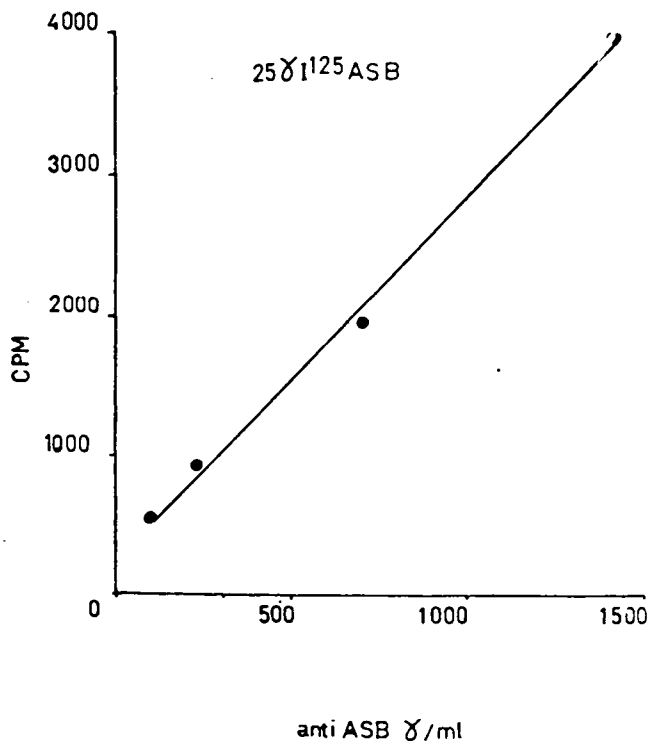
Mediante varias experiencias hemos probado la especificidad y exactitud de este nuevo método. En la primera, cuyos resultados se muestran en la figura 3, determinamos, mediante el test cuantitativo de precipitación, los microgramos de anti ASB en un suero de ratón, y por radioinmuno-electroforesis cuantitativa, usando diversas soluciones de este anti-suero, encontramos una relación lineal recta entre microgramos de anti ASB en la abscisa y cuentas por minuto en la ordenada.

En la experiencia siguiente, y a fin de descartar la posibilidad de combinación no específica del antígeno, comparamos mediante nuestro método y otro conocido, el de microhemoaglutinación de eritrocitos absorbidos con ASB, los anticuerpos en fracciones proteicas de un suero de ratón anti ASB, eluido en una columna de Sephadex G-200. En la figura 4 se mues-

tran los picos obtenidos y su análisis mediante electroforesis en gel de acrilamida. Se observa que la primera banda ancha, correspondiente a la inmunoglobulina G, aparece aumentada en las fracciones correspondientes al tercer pico E.

Como se muestra en la figura 5, la presencia de la inmunoglobulina G en las fracciones D, E y F de este suero anti ASB fue confirmada mediante inmunolectroforesis. En el gráfico la línea de puntos, que corresponde a la radioactividad de cada una de estas fracciones, sigue un estre-

FIG. 3

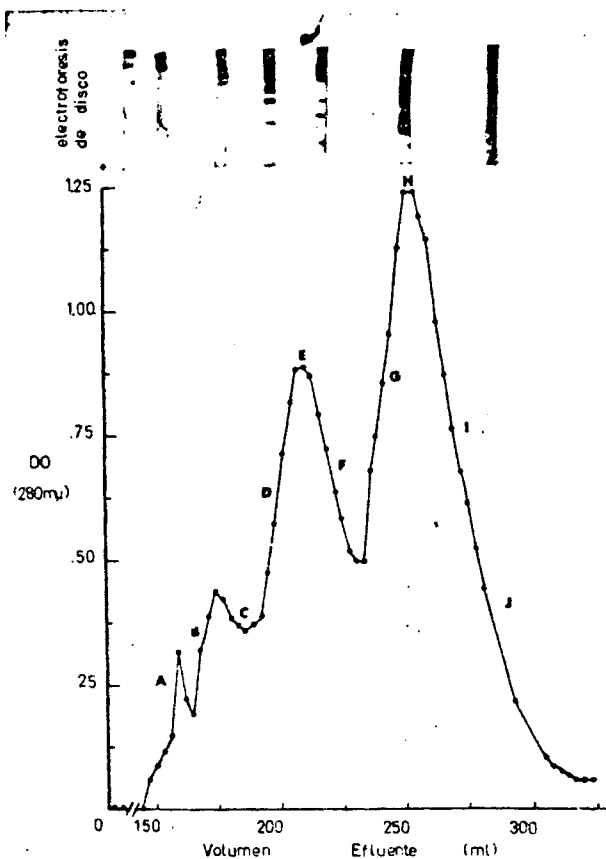


cho paralelismo con los triángulos, unidos por línea continua, los que corresponden al Log^2 del título de microhemoaglutinación. Cada fracción fue concentrada a 1 mg de proteína por ml. Por radioautografía determinamos que la placa era impresionada exclusivamente por la línea de inmunolectroforesis correspondiente a la inmunoglobulina G.

Resultados preliminares en el uso de este método para el estudio de la cinética de formación de anticuerpos en animales inmunizados o tolerantes a ASB han sido sumamente alentadores. Un ejemplo de ello se muestra en la figura 6. Análisis, mediante esta técnica, del pool de suero en

dos grupos de ratones inoculados en el lapso de 40 días con 3 inyecciones de ASB en coadyuvante de Freund, demuestra que la combinación antígeno-anticuerpo (200 CPM suero control; 4.000 CPM suero I y 12.800 suero II) no se efectúa predominantemente a nivel de la inmunoglobu-

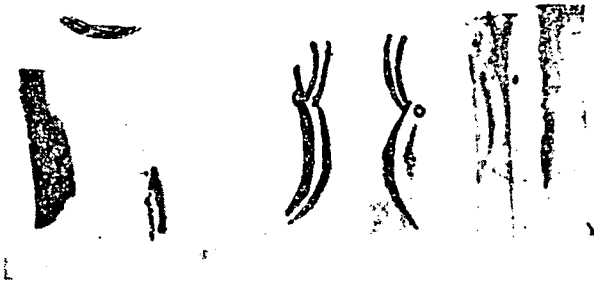
FIG. 4



lina G, como es de esperar en una respuesta anamnésica, sino casi exclusivamente en la inmunoglobulina M. Resultados también preliminares indicarian la posibilidad de su uso para la detección simultánea de dos antígenos diferentes, marcados uno con 1-125 y el otro con 1-131.

En conclusión, hemos demostrado que el método de radioinmuno-electroforesis puede ser utilizado, con las modificaciones presentadas, como técnica cuantitativa, siendo sus ventajas el que permite en un solo proce-

FIG. 5



dimiento y con mínimas cantidades de antisuero, la detección, reconocimiento y medición de diferentes clases físico-químicas de anticuerpos. Consideramos que su uso puede extenderse, por estas ventajas, a la investigación de las inmunopatías humanas.

Agradecemos la valiosa colaboración técnica de la Srta. María Inés Castronuovo.
(Comisión Nacional de Energía Atómica)