

TEMA 7: REACCIONES DE PRECIPITACIÓN

1. Introducción

Las reacciones de inmunoprecipitación se producen cuando un antígeno soluble interacciona con su anticuerpo específico, formándose unos complejos antígeno-anticuerpo que se organizan entre sí, dando lugar a una especie de enrejado insoluble.

Para que este tipo de reacción se produzca, tanto el antígeno como el anticuerpo han de ser multivalentes, es decir, que mientras que el antígeno debe poseer varios determinantes antigénicos (4 o 5), basta con que el anticuerpo tenga, al menos, 2 sitios de combinación con el antígeno. A medida que los anticuerpos van uniéndose a determinantes antigénicos de distintas moléculas de antígeno, van formándose complejos inmunes cada vez más grandes que acaban volviéndose insolubles y precipitando.

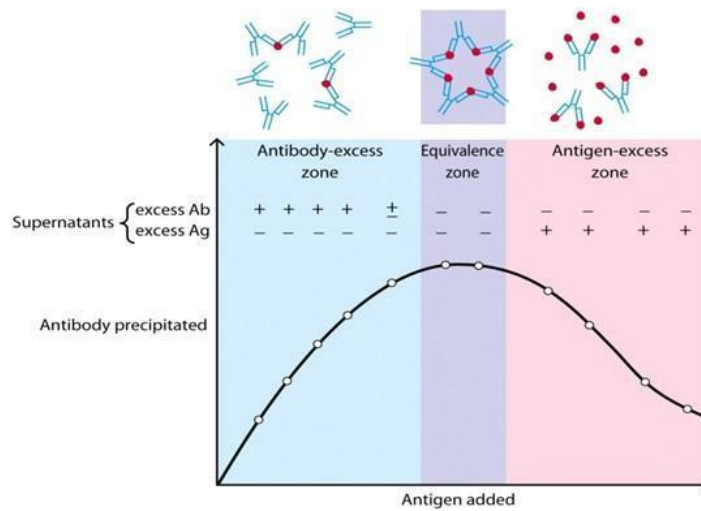


Las reacciones de inmunoprecipitación pueden producirse en un **medio líquido** o en un **medio semisólido**. Las reacciones realizadas en un medio líquido que generan un gran precipitado, reciben el nombre de reacciones de **floculación**.

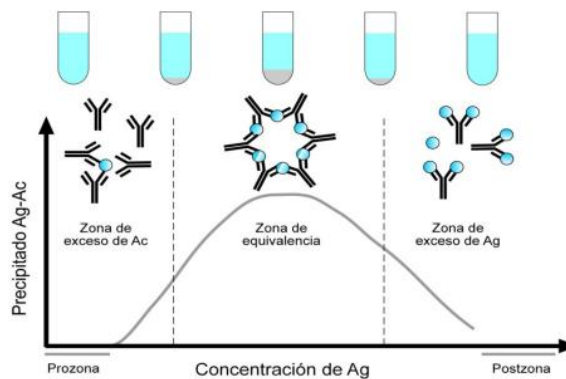
Las reacciones de inmunoprecipitación ejecutadas en un **medio semisólido** se conocen como reacciones de precipitación en geles o de **inmunodifusión**, debido a que los medios semisólidos que se usan con más frecuencia son el gel de agar y el de agarosa (el agar se prepara a partir de algas marinas, y la agarosa es uno de los polisacáridos que componen el agar).

2. Influencia de las concentraciones relativas del antígeno y del anticuerpo

La formación del enrejado entre los complejos inmunes y, por tanto, su precipitación, solo se produce cuando las concentraciones del antígeno y del anticuerpo son equivalentes (una molécula de antígeno por tres o cuatro de anticuerpo). Esta situación, en la que el antígeno y el anticuerpo están en proporciones equivalentes se conoce como **punto de equivalencia**.



Sin embargo, cuando hay un exceso de anticuerpo (una molécula de antígeno por seis o siete de anticuerpo), cada molécula de antígeno puede reaccionar con varias moléculas de anticuerpo libres, por lo que no se produce un entrecruzamiento entre las moléculas y se forman inmunocomplejos pequeños y solubles. De igual forma, si lo que existe es un exceso de antígeno (dos moléculas de antígeno por cada molécula de anticuerpo), cada sitio de combinación del anticuerpo es capaz de fijar a una molécula de antígeno libre, debido a lo cual, tampoco se constituye un enrejado adecuado que precipite.



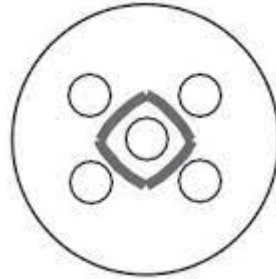
3. Reacciones en medio semisólido

Las reacciones en medio semisólido son muy utilizadas y consisten en el desplazamiento o la difusión, a través de dicho medio, del antígeno, del anticuerpo o de ambos simultáneamente, produciendo un arco o banda de precipitación cuando ambos se encuentran a la concentración adecuada. Hay varios tipos de técnicas, según se realice el desplazamiento de los reactantes de forma espontánea, como ocurre en la **doble difusión** y en la **inmunodifusión radial**, o se utilice un campo eléctrico que fuerce el desplazamiento, como es el caso de la **inmunolectroforesis**, la **electroinmunodifusión** y la **contraelectroforesis**.

3.1. Doble difusión

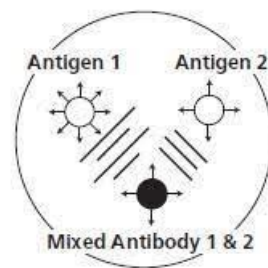
La inmunodifusión doble en dos dimensiones es una prueba descrita por Ouchterlony, que consiste en:

- Se vierte gel de agar o de agarosa en un recipiente que, generalmente, es una placa de petri.
- Se taladran unos pocillos en el gel, de forma que haya uno central y varios periféricos.
- En el pocillo central se sitúa uno de los reactivos (generalmente, el anticuerpo) y en los periféricos se emplaza el otro (normalmente, el antígeno).
- Ambos reactivos difunden a través del gel de forma radial, hasta alcanzar su punto de equivalencia y precipitar en la zona de aquel comprendida entre el pocillo del anticuerpo y los del antígeno.



En esta reacción, si el tamaño y la forma de los pocillos, la distancia entre los mismos y la temperatura y el tiempo de incubación son los adecuados, la línea de precipitación se dispone de forma perpendicular al eje que une cada pocillo de antígeno con el de anticuerpo.

Si la muestra probada contiene varios antígenos y el antisuero empleado no es muy específico y puede reaccionar con más de uno de esos antígenos, aparecen varias líneas de precipitación entre los pocillos.



En la inmunodifusión doble bidimensional, a veces, se colocan muestras distintas en pocillos periféricos adyacentes. Estas muestras pueden contener antígenos iguales, parecidos o distintos.

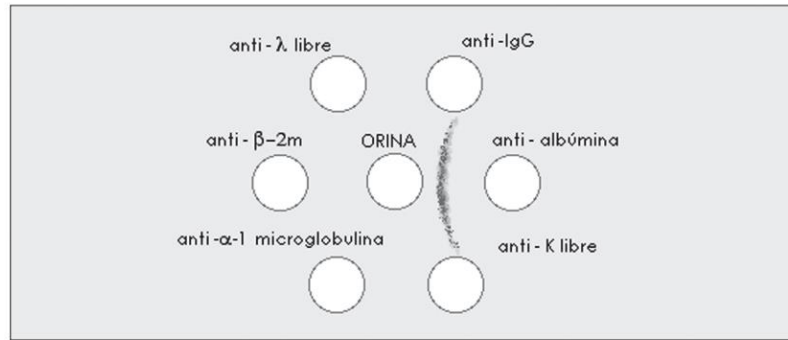
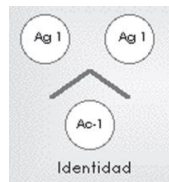


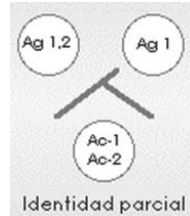
Figura 40-3. Inmunodifusión doble de una muestra de orina. Se observa un elevado nivel de albúmina y ausencia de IgG, lo que indica un posible daño inicial del glomérulo.

En cada una de esas circunstancias, el resultado obtenido es desigual, por lo que se pueden observar 3 patrones de precipitación diferentes:

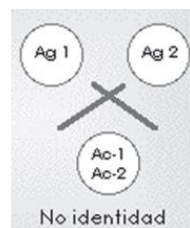
-Patrón de identidad total: corresponde a los antígenos que comparten todos los determinantes antigénicos, por lo que las bandas de precipitación se fusionan.



-Patrón de identidad parcial: hay algunos determinantes comunes y otros diferentes, siendo estos últimos los responsables de que se forme un espolón dirigido hacia el pocillo con menos determinantes reactivos.



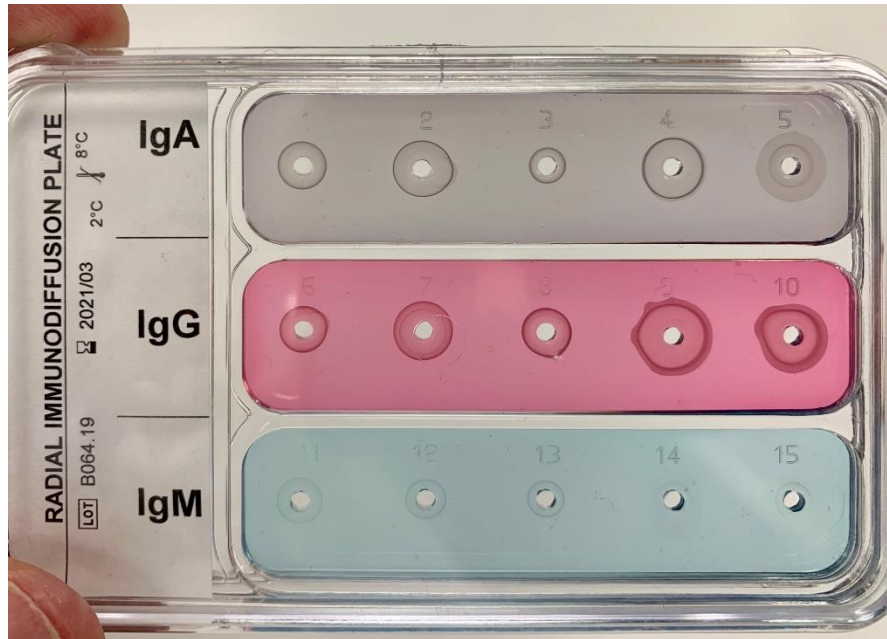
-Patrón de desigualdad: ningún determinante es compartido y, por lo tanto, son antígenos distintos.



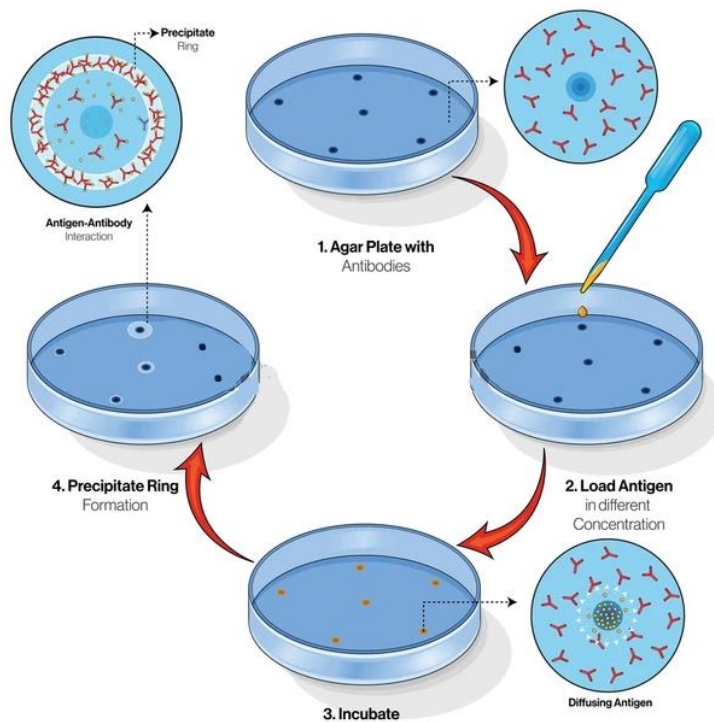
En otras ocasiones, no solo se pretende una comparación e identificación de los antígenos, sino que se intenta una cuantificación aproximada de los mismos. Para ello se realizan diluciones seriadas de la muestra y a continuación, se sitúa cada dilución preparada en un pocillo distinto de la periferia de la placa. Una vez terminada la difusión, se comparan los resultados obtenidos con la muestra con los conseguidos en otra placa con un patrón de antígeno de concentración conocida.

3.2. Inmunodifusión radial

La inmunodifusión radial (IDR) es una técnica iniciada por Mancini que consiste en la **reacción de inmunoprecipitación** verificada en el interior de un **medio semisólido**, entre un antígeno y su anticuerpo correspondiente, obteniéndose como resultado final un anillo de precipitación.



Como medio semisólido se puede utilizar un gel de agar o de agarosa. Este se sitúa dentro de una placa de cristal o de plástico, teniendo en cuenta que su espesor tiene que ser uniforme a lo largo de toda ella. Además, el gel suele colorearse para visualizar mejor los anillos formados. Previamente se incorpora al gel uno de los reactivos inmunes, que generalmente es el anticuerpo, siendo necesario que esté distribuido de una forma homogénea en todo el gel y que reaccione específicamente contra el antígeno que se busca. A la hora de realizar la prueba, se introduce el otro reactivo inmune (el antígeno) en el interior de unos pocillos previamente taladrados en el gel.



La reacción de inmunoprecipitación de la IDR es un fenómeno progresivo, es decir, cuando comienza la difusión del antígeno, la precipitación se produce en una zona cercana al pocillo. A medida que difunde más antígeno desde el pocillo, el precipitado se redissuelve y reaparece a una distancia de aquel algo mayor. Esta expansión centrífuga del diámetro del anillo de precipitado continúa hasta que todo el antígeno que contiene el pocillo ha difundido y reaccionado con el anticuerpo presente en el gel. **Cuanto mayor es la concentración del antígeno** en la muestra, más tiene este que difundir para poder reaccionar completamente con el anticuerpo en proporciones equivalentes y, por tanto, mayor es el área del anillo formado.

Hay muchos **factores** que influyen en el diámetro final del anillo formado (volumen de la muestra, concentración del anticuerpo en el medio, pH del medio y tiempo de incubación), que han de mantenerse constantes para determinar un valor fiable de concentración.

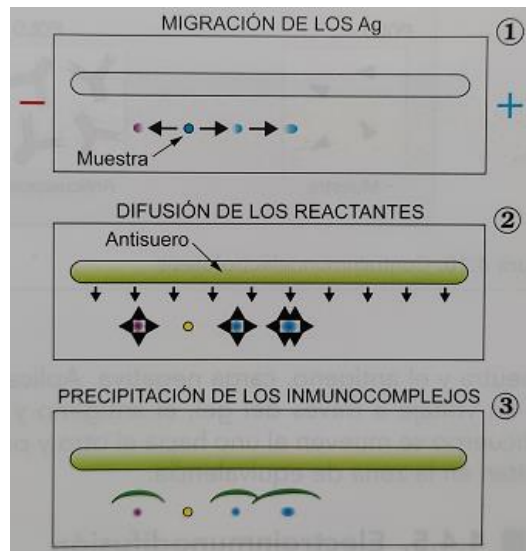
El tiempo necesario para la difusión total del antígeno depende de su concentración en la muestra aplicada, de las características de su molécula y de la temperatura de reacción. Así pues, por ejemplo, el aumento de la temperatura disminuye el tiempo de difusión sin alterar el diámetro final del anillo.

Los nuevos kits comerciales incorporan una tabla de valores precalculados, en la que se puede interpolar directamente, sin necesidad de trazar una curva de calibrado, el diámetro logrado con la muestra problema y conseguir el valor de concentración que le corresponde. Este resultado debería ser valorable solamente si el diámetro alcanzado con un patrón, sobre el que se realiza el ensayo al mismo tiempo que en la muestra, está comprendido dentro de un intervalo de valores previamente establecido por el laboratorio comercial (determinación de rutina).

La IDR permite, por tanto, a diferencia de otras reacciones de inmunoprecipitación en geles, no solo una identificación del antígeno sino también una **cuantificación** de este.

3.3 Inmunolectroforesis

La inmunolectroforesis es una técnica que se realiza cuando la **mezcla antigénica es demasiado compleja** y los antígenos han de separarse antes de ser visualizados mediante precipitación.



Sus principales aplicaciones son:

- Identificación de fracciones proteicas específicas en una mezcla antigénica.
- Hallar en una muestra biológica (normalmente suero) anticuerpos específicos frente a una determinada fracción antigénica.
- Determinar la pureza de un antígeno.

En primer lugar, la mezcla por analizar se deposita en un pocillo circular previamente taladrado en el centro, en el que se practica la prueba. Este medio suele ser un gel de agar o de agarosa que está adherido a un soporte de cristal o de plástico.

A continuación, se hace pasar una corriente eléctrica a través del medio, con objeto de separar los antígenos en función de su **carga eléctrica neta**.

Una vez finalizada la migración de los antígenos, se vierte el anticuerpo en un surco o canal previamente conformado a lo largo del medio. Tras esto, se deja en reposo todo ello para que el anticuerpo y los antígenos difundan a través del medio. Por último, aparecen unas bandas de precipitación, con forma de arco, en las zonas en las que el anticuerpo y los antígenos han reaccionado a concentraciones equivalentes.

El anticuerpo utilizado consiste en un antisuero, que puede ser **polivalente**, si va dirigido contra varias inmunoglobulinas, o **monoespecífico**, si va dirigido contra alguna inmunoglobulina o algún tipo de cadena.

Esta técnica se usa para diagnosticar enfermedades como el mieloma múltiple y otras gammopatías monoclonales, aunque hoy en día está en desuso.

3.4 Contrainmunolectroforesis

Esta técnica consiste en una doble difusión forzada por aplicación de corriente eléctrica, lo que permite acortar el tiempo y aumentar considerablemente la sensibilidad de la técnica, pues la totalidad de los componentes dispuestos en el pocillo migran en direcciones opuestas.

Se realiza en geles de agar, eligiendo el pH de forma que los anticuerpos tengan carga positiva o neutra y el antígeno, carga negativa. Aplicando un voltaje a través del gel, el antígeno y el anticuerpo se mueven el uno hacia el otro y precipitan en la zona de equivalencia.

3.5 Electroimmunodifusión

En esta técnica se realiza una inmunodifusión radial forzada por la aplicación de una corriente eléctrica, lo que, al igual que en el caso anterior, acorta el tiempo de aparición de los resultados y facilita la lectura de estos.

A esta técnica se la conoce también como electroforesis en cohete (rocket).

Los antígenos son sometidos a electroforesis en un gel que lleva incorporado el anticuerpo o suero. El pH del gel se elige para que los anticuerpos tengan carga neta neutra y no migren bajo la acción del campo eléctrico. En un extremo del gel se realizan los pocillos en los que se depositan distintas concentraciones lineales de precipitación de antígeno.

De esta manera, al migrar por el gel y encontrarse con el anticuerpo, se forman precipitados en forma de cohetes, cuya altura es proporcional a la concentración del antígeno.

Es una técnica cuantitativa, ya que nos permite interpolar los valores desconocidos en una curva patrón.

4. Reacciones en medio líquido

En este tipo de reacciones, los complejos antígeno-anticuerpo quedan en suspensión en la muestra dando un aspecto turbio al líquido. Estos agregados pueden precipitar con mayor o menor rapidez, produciendo copos de diferentes tamaños. Las reacciones en medio líquido se basan en **medir la turbidez** producida por la precipitación de inmunocomplejos en un medio líquido.

Para favorecer su determinación con métodos automatizados, es preferible evitar la sedimentación y hacer la medición lo antes posible desde el momento en que se han formado todos los inmunocomplejos.

Hay dos tipos de técnicas para realizar la cuantificación del antígeno en estas reacciones: **la turbidimetría y la nefelometría.**

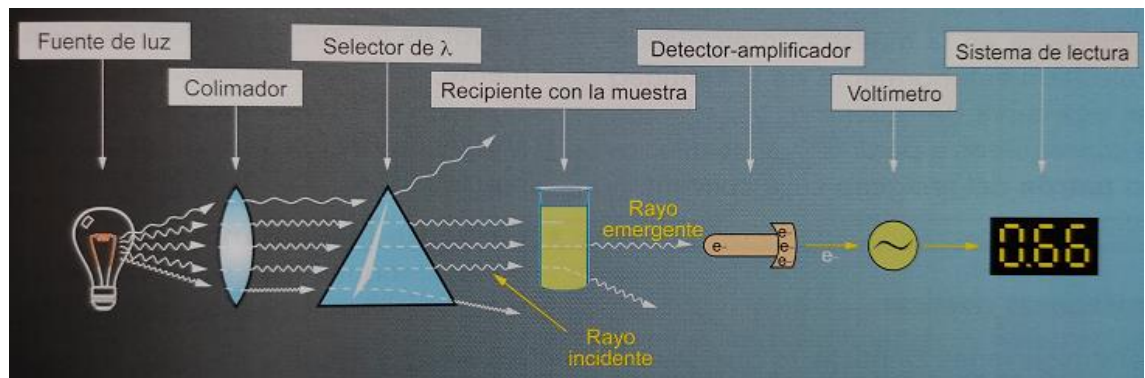
4.1. Turbidimetría

Cuando un rayo de luz colimado (sus haces son paralelos) atraviesa una suspensión homogénea de partículas, una parte de esta luz es absorbida, otra es reflejada, otra es transmitida y otra es dispersada en todas las direcciones.

Cuando las partículas detectadas por **turbidimetría** son **inmunocomplejos**, esta técnica recibe el nombre de **inmunoturbidimetría**.



En la turbidimetría **se mide la cantidad de luz absorbida**, es decir, la cantidad de luz que no es transmitida por la suspensión. Cuanto mayor es la luz absorbida (cuantificada en un espectrofotómetro en forma de absorbancia), mayor es el número de partículas presentes en la suspensión y más alta es la concentración de la sustancia problema que da lugar a las partículas y está presente en la muestra.



4.2. Nefelometría

En la nefelometría se mide la **cantidad de luz dispersada** por las partículas en suspensión, es decir, se cuantifica la cantidad de luz que es desviada por estas, con un determinado ángulo con respecto a la dirección del rayo incidente.

Cuando la muestra contiene pequeñas concentraciones de partículas dispersantes, es más recomendable recurrir a la inmunonefelometría que a la inmunoturbidimetría.

Cuando las partículas en suspensión son agregados de inmunocomplejos, esta técnica se conoce como **inmunonefelometría**.

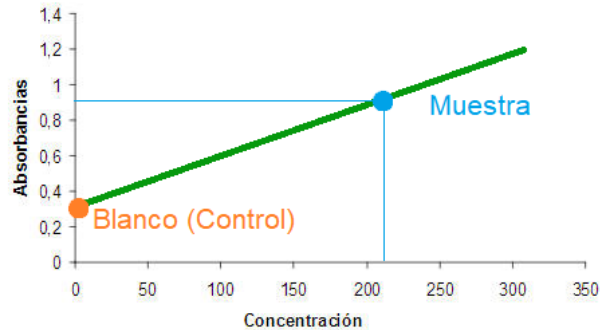
La intensidad de la luz dispersada es directamente proporcional a la cantidad de agregados formados y, por tanto, a la concentración del antígeno en la muestra.

4.3. Tipos de determinaciones

Con estas técnicas podemos trabajar de dos maneras:

» Determinaciones a punto final

Tras procesar la muestra, se deja transcurrir el tiempo suficiente para que se formen todos los agregados. A continuación, se mide la cantidad de luz bloqueada o dispersada por la muestra y se resta de la obtenida con un **blanco** preparado solamente a base de reactivos. Por último, se determina la concentración del antígeno presente en la muestra, interpolando el valor calculado anteriormente de la cantidad de luz, en una curva de calibrado, trazada con los datos conseguidos a partir de varias diluciones de un patrón del antígeno cuya concentración es conocida.



» Determinaciones cinéticas

En las determinaciones cinéticas lo que se calcula es la **velocidad con la que se forman los agregados**. Esta velocidad está directamente relacionada con la cantidad de antígeno presente en la muestra. En este tipo de determinaciones no se necesita, por tanto, un blanco de reactivos ni unos patrones.

