

## **TEMA 17 INMUNOHISTOQUÍMICA**

### **• METODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.**

Sirven para detectar antígenos celulares o titulares mediante la reacción antígeno – anticuerpo. Para visualizar el lugar donde se produce la reacción antígeno – anticuerpo es preciso emplear un trazador o marcador.

El marcaje puede realizarse con fluorocromos (técnicas de inmunofluorescencia), técnicas inmunoenzimática o también pueden ser iones metálicos en forma coloidal (técnica de inmuno – oro), y el último marcador son isótopos radioactivos.

## **2. TECNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS**

### **2.1. Fundamentos:**

La fluorescencia es una forma de luminiscencia entendiéndose ésta última como la emisión de la luz que se produce a partir de una fuente de energía no térmica y bajo el efecto de una excitación.

La **fluorescencia primaria** o **autofluorescencia** es aquella que presenta determinadas sustancias de forma espontánea sin necesidad de ser modificadas; por ejemplo la lámina elástica de las arterias muestra autofluorescencia en determinadas condiciones).

En los tejidos que no poseen esta propiedad se puede inducir la fluorescencia, llamándola **fluorescencia secundaria**, esto se puede hacer mediante tinción histoquímica con sustancias fluorescentes llamadas **fluorocromos** o uniendo fluorocromos a antígenos dirigidos a anticuerpos tisulares. De este último procedimiento se sirven las técnicas de inmunofluorescencia.

### **2.2. Fluorocromos.**

Son sustancias químicas que tienen la propiedad de absorber fotones de alta energía procedente de la radiación ultravioleta o del espectro visible. Ello provoca una redistribución de los electrones de las moléculas fluorescentes, puesta de manifiesto por la emisión de una radiación luminosa de longitud de onda distinta a la que dentro del espectro visible.

Si al iluminar una sustancia con luz visible ocurre un fenómeno similar al descrito y la liberación de energía se produce de forma gradual, prolongándose la emisión de luz después de cesar la iluminación del objeto, este fenómeno se llama **fosforescencia**.

Los fluorocromos más utilizados en las técnicas de inmunofluorescencia son:

- **Fluoresceína**: absorbe luz azul y emite fluorescencia verde manzana.
- **Rodamina**: absorbe luz verde y emite fluorescencia roja anaranjada.

Los fluorocromos pueden unirse de forma covalente a los anticuerpos sin alterar la capacidad de estos últimos para unirse a sus correspondientes antígenos, por ello las fluorocromos ligados a anticuerpos específicos constituyen un medio útil de visualizar los lugares donde reproduce la reacción Antígeno – Anticuerpo.

### **2.3. Preparación del tejido para inmunofluorescencia.**

Las técnicas de inmunofluorescencia se realizan casi siempre sobre tejido congelado, porque el procedimiento

de fijación en formol e inclusión en parafina presenta numerosos inconvenientes para el desarrollo de estos métodos.

Entre los inconvenientes figuran el aumento de los fenómenos de autofluorescencia y el bloqueo de gran cantidad de determinantes antigénicos provocados por los agentes fijadores.

## 2.4. Tipos de técnicas de inmunofluorescencia

- En la técnica de **inmunofluorescencia directa** se utiliza un anticuerpo específico frente al antígeno que se desea detectar. Dicho anticuerpo está ligado a un fluorocromo.
- En las técnicas de **inmunofluorescencia de tipo indirecto** se emplea en un primer paso el anticuerpo específico no marcado y en una segunda fase un anticuerpo marcado con el correspondiente fluorocromo que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario.
- Otros procedimientos técnicos de inmunofluorescencia bastante menos utilizados que los anteriores son:
  - La **técnica de sándwich**: que se emplea para detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas frente a un determinado antígeno en las células de tejidos pertenecientes a un animal previamente inmunizado con ese antígeno. Para ello se toman secciones de ganglio linfático procedentes del animal inmunizado, se añade el antígeno en un primer paso y después un anticuerpo marcado con fluorescencia frente a dicho antígeno, si en el tejido existían anticuerpos frente al antígeno se unirán a este que quedará a su vez fijados sobre el tejido y podrán ser detectados con el anticuerpo marcado.
  - La **técnica de incubación con complemento** es una modificación de la técnica indirecta, en ella el anticuerpo que se emplea en el primer paso de la técnica ha de ser capaz de fijar el complemento. Una vez realizada la primera incubación con dicho anticuerpo que a su vez es específico frente a un determinado antígeno se añade suero de cobaya fresco como fuente de complemento y se incuba a 37 ° C, y en una tercera fase se incuba con un anticuerpo específico frente a una determinada fracción del complemento, dicho anticuerpo específico irá marcado con un fluorocromo.

## 2.5. Dobles tinciones en inmunofluorescencia.

La determinación de dos antígenos diferentes puede hacerse de **forma simultánea** o **secuencial**.

– En el primer paso se incuba el tejido con una mezcla de dos anticuerpos específicos frente a los antígenos que se quiere determinar, los anticuerpos irán marcados con fluorocromos distintos.

– En la técnica secuencial se incuba en primer lugar con uno de los anticuerpos marcado con un fluorocromo y se fotografían los campos más significativos. A continuación se elimina la positividad destruyendo los grupos fluorescentes mediante la aplicación de luz ultravioleta, una vez comprobado que la destrucción es completa se elimina el cubreobjetos introduciendo la preparación en una solución tamponada y se incuba con un segundo anticuerpo marcado con fluorocromo.

Este método presenta una serie de inconvenientes: no puede detectarse más de 2 antígenos diferentes, ya que por encima de una determinada dosis de luz ultravioleta se deteriora el tejido.

## 2.6. Microscopio de Fluorescencia.

Las técnicas de inmunofluorescencia deben examinarse siempre con un microscopio especial llamado **microscopio de fluorescencia**.

Este tipo de microscopio lleva incorporado una fuente de luz ultravioleta y luz visible, varios filtros que selecciona la longitud de onda de la luz que incide sobre la muestra a estos filtros se les llaman **filtros de excitación** o **filtros primarios**. También tienen un filtro que selecciona las longitudes de onda emitidas dentro del espectro de la luz visible dejando pasar sólo la luz emitida por las sustancias fluorescentes e impidiendo el paso de la luz excitadora, este filtro se llama **filtro secundario** o **de barrera**.

Existen 2 tipos fundamentales de microscopio de fluorescencia:

En uno de ellos la luz de excitación se transmite a través de la muestra y le llamamos **microscopio de transmisión**.

En el otro la luz se refleja en el tejido procedente de un foco de iluminación superior, a este lo llamamos **microscopio de luz de incidencia** o **epiiluminación**.

- **ASPECTOS PRÁCTICOS DEL DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.**

- **Fijación.**

Durante las inmunotinciones es conveniente aplicar alguna forma de fijación para preservar el tejido aun cuando se maneje secciones en congelación.

Las condiciones en que se realiza la fijación repercuten en el resultado, por ello debemos tener en cuenta que:

- Los fijadores que actúan por precipitación de proteínas suelen producir mejores resultados que los fijadores por reticulación o los que contienen oxidantes.
- Un exceso de fijador reduce la inmunoreactividad del tejido.
- El efecto de cada fijador sobre un antígeno puede ser distinto según la localización histológica y anatómica de dicho antígeno.
- En muestras de gran volumen la fijación por inmersión en la solución fijadora proporciona resultados variables en cuanto a positividad inmunohistoquímica ya que las zonas mejor fijadas se teñirán más que las más profundas.
- Existen determinados antígenos de superficie o receptores nucleares cuya determinación en tejidos fijados no proporciona buenos resultados, por eso debe realizarse en tejido congelado sin fijar o usando una fijación breve en acetona, en cloroformo o en una mezcla de ambos.
- La fijación debe ser inmediata para evitar la autólisis, sino fuera posible puede frenarse el proceso de autólisis manteniendo los tejidos a 4 ° C o en soluciones conservantes.

Las pautas de fijación en inmunohistoquímica serán distintas según el antígeno que se desea estudiar.

Cuando se utiliza un anticuerpo por primera vez es aconsejable utilizar secciones de tejido congelado como control a fin de determinar la fijación más adecuada así como las diluciones óptimas del anticuerpo primario. Además siempre deben utilizarse preparaciones de control positivo y negativo que serán fijadas de la misma forma que el tejido objeto de estudio.

Para acortar el tiempo de fijación puede utilizarse la fijación por microondas.

### **3.2 Decalcificación.**

La inmunoreactividad se conserva bien tras la aplicación de algunos procedimientos rutinarios de decalcificación (como por ejemplo utilizar EDTA a una concentración 0,5 M, ácido acético acuoso a una concentración al 10% o ácido fórmico al 5%).

Sin embargo si se utilizan ácidos fuertes como el ácido nítrico la inmunoreactividad desaparece al cabo de unas pocas horas de tratamiento.

.

Aunque los procedimientos habituales de deshidratación y aclaración no deterioran excesivamente los antígenos, la inclusión habitual tanto en parafina como en algunas resinas sintéticas pueden afectar a los resultados inmunohistoquímicos, así el uso de acetona en lugar de etanol y el de cloroformo o benzoato de metilo en lugar del xileno mejoran notablemente la inmunotinción.

La inclusión en parafina caliente (60°) produce pérdida de antigenicidad, por lo que el tiempo de infiltración debería reducirse al mínimo y se ha llegado a recomendar el empleo de parafinas de bajo punto de fusión.

### **3.4 Obtención de cortes. Utilización de adhesivos tisulares.**

Si el procedimiento de inmunotinción se realiza sobre tejido congelado se obtendrán en el criostato cortes de 4 – 6 micrómetros de espesor que se secan al aire a temperatura ambiente durante 2 horas.

A continuación se fijan en acetona absoluta a 4° C durante 5 minutos y se vuelven a secar al aire durante 30 minutos.

Si la técnica se va efectuar más tarde, las secciones pueden guardarse envueltas en papel de aluminio y con un desecante a – 20° C o a temperaturas inferiores.

En el momento de realizar la inmunotinción se llevan los cortes a temperatura ambiente, no se desecha el envoltorio de papel de aluminio hasta que los cortes alcanzan la temperatura ambiente se vuelven a secar al aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos, luego se realiza una refinación con cloroformo durante 20 – 30 minutos y posteriormente se pasan a un baño de solución tamponada.

Los cortes de parafina se obtienen de un grosor de 3 – 5 micrómetros y se dejan secar toda la noche en la estufa a 37° C.

A continuación se desparafinan cuidadosamente en xileno, se llevan hasta alcohol absoluto y se hidratan.

Cuando se aplican los métodos inmuno enzimáticos es bastante fácil que se desprendan los cortes debido a los numerosos lavados que es preciso efectuar. Por ello se recomienda emplear un adhesivo que fije las secciones al portaobjetos, existen varios tipos de adhesivos como albúmina de huevo, gelatina o poli L – lisina. Un exceso de adhesivo puede ser causa del aumento de tinción inespecífica de fondo.

En la actualidad existen en el mercado portaobjetos que presentan una o varias superficies ligeramente deprimidas donde pueden adherirse los tejidos para realizar la incubación sin que ocurran fenómenos de difusión de los reactivos.

### **3.5 Restablecimiento de la inmunoreactividad tisular: digestión enzimática y deslipidización.**

La pérdida de antigenicidad ocasionada por los fijadores que contienen aldehídos como el formol tamponado puede compensarse:

- Utilizando un procedimiento inmunoenzimático de máxima sensibilidad.
- Mediante digestión proteolítica con enzimas o por deslipidización.

#### **• Digestión enzimática:**

Con el tratamiento enzimático de duración óptima se reduce en gran medida la tinción no específica, probablemente porque se suprimen algunas de las moléculas proteicas responsables de la misma, se utilizan proteasas.

La digestión enzimática tiene inconvenientes como:

- ◆ Si es excesiva puede llegar a producir la destrucción del tejido con desprendimiento de porciones de este.
- ◆ Por digestión del antígeno puede debilitarse la tinción o crear falsos positivos.
- ◆ La digestión proteolítica excesiva de antígenos tisulares puede desenmascarar fragmentos proteicos comunes a diversos antígenos y por tanto incrementar la tinción no específica.

Cualquier actividad enzimática proteolítica residual debe eliminarse una vez completado el tratamiento de los cortes.

#### • **Deslipidización:**

La inmunoreactividad de ciertos antígenos de membrana se restablece mejor por medio de la exposición a disolventes de lípidos como por ejemplo el cloroformo. Al parecer las glucoproteínas están parcialmente enterradas en la doble capa de lípidos de la membrana celular por lo que se requiere una exposición prolongada (normalmente 24 horas) al cloroformo de las secciones de parafina una vez hidratados.

### **3.6 Bloqueo de la actividad enzimática endógena.**

Si en las técnicas inmunoenzimáticas se utiliza como marcador una enzima normalmente presente en el tejido que se está examinando debe inhibirse su actividad endógena antes de la inmunotinción, de lo contrario la enzima endógena reaccionará con el sustrato empleado para localizar la enzima marcadora dando lugar a falsos positivos.

### **3.7 Bloqueo de la tinción de fondo.**

#### **a) Tinción de fondo específica:**

Puede ser debida a varias causas:

- La presencia del antígeno objeto de estudio en lugares distintos a aquel en que se quiere detectar.
- La existencia en el antisuero primario de anticuerpos frente a antígenos distintos al que se quiere determinar. Este problema se puede resolver usando altas diluciones del antisuero primario.
- **Tinción de fondo inespecífica.**

Es la unión no inmunológica del antisuero a ciertos componentes de los tejidos. En estos casos la coloración del fondo puede reducirse bloqueando los lugares con afinidad no inmune por las inmunoglobulinas (que son anticuerpos).

El procedimiento implica incubar los cortes con una inmunoglobulina que no interfiera con el antisuero primario.

La tinción de fondo inespecífica también puede reducirse usando el antisuero primario en diluciones muy altas añadiendo grandes concentraciones de sal (normalmente 2,5 % de cloruro sódico) al tampón, empleando preferentemente solución tamponada tris o agregando a la disolución tamponada detergentes tales como el triton X – 100.

La digestión enzimática como ya hemos visto reduce la tinción inespecífica de fondo.

### **3.8 Penetración de los reactivos. Detergentes.**

Para obtener buenos resultados es esencial que los anticuerpos penetren de forma adecuada y alcancen los antígenos que se quieren detectar. Para contrarrestar la escasa penetración de algunos conjugados se suele recurrir al uso de detergentes como el **triton X – 100** o la **saponina** que actúan permeabilizando las membranas.

### **3.9 Controles.**

Para un buen desarrollo de la técnica es conveniente realizar siempre los siguientes controles:

- **Control negativo:** se omite el antisuero primario o se sustituye por suero no inmune o por una solución tamponada, utilizando el mismo tejido que para el control positivo, si el resultado es positivo será debido a una positividad inespecífica.
- **Control positivo:** se utiliza una sección de tejido del que se tenga certeza absoluta de que contiene el antígeno por determinar, de esta forma si con un control positivo la técnica es negativa me indica un fallo en el procedimiento técnico o un defecto de fijación.

### **3.10. Tipos de anticuerpos. Diluciones.**

Por lo que se refiere a las incubaciones todos los métodos inmunohistoquímicos consisten en tratamientos sucesivos con antisueros separados por lavados con soluciones tamponadas.

Para obtener una tinción óptima es importante que cada antisuero se use en la dilución mas adecuada, que no se evapore durante la incubación y que el anticuerpo no unido al antígeno se elimine por completo antes de la incubación siguiente.

Por eso, siempre debe ensayarse una amplia gama de diluciones cuando se usa un anticuerpo por primera vez o cuando un antisuero conocido se emplea por primera vez sobre un tejido distinto.

### **3.11. Incubaciones.**

Para prevenir la evaporación de los antisueros, las incubaciones se llevan a cabo en una atmósfera húmeda preferentemente en cámaras de incubación, de esta forma se ahorra considerable cantidad de anticuerpos, puesto que la temperatura influye en la velocidad de la reacción antígeno – anticuerpo si se realizan incubaciones cortas el procedimiento se hará a temperatura ambiente, si por el contrario se aplica incubaciones largas, por ejemplo durante toda la noche la cámara de incubación se mantendrá a 4° C.

### **3.12. Lavados.**

En cualquier procedimiento inmunohistoquímico es preciso eliminar todo el antisuero no unido al antígeno durante una incubación antes de pasar a la siguiente. Esto se realiza lavando con la solución tamponada elegida.

Para que la solución de lavado se agite continuamente sobre la superficie del corte se deposita el recipiente con los portaobjetos sobre un agitador magnético o en un baño de agitación vacío.