

# Técnicas inmunohistoquímicas



**Francisco J. Pallarés**

*Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y  
Toxicología Universidad de Córdoba*

# TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Las técnicas inmunohistoquímicas son aquellas que permiten la **detección de antígenos (Ag) en células y tejidos mediante una reacción Ag-anticuerpo (Ac)**, para lo que se utilizan Ac específicos frente a los Ag que queremos detectar, que van unidos con una sustancia (marcador) que hace posible visualizar la reacción.

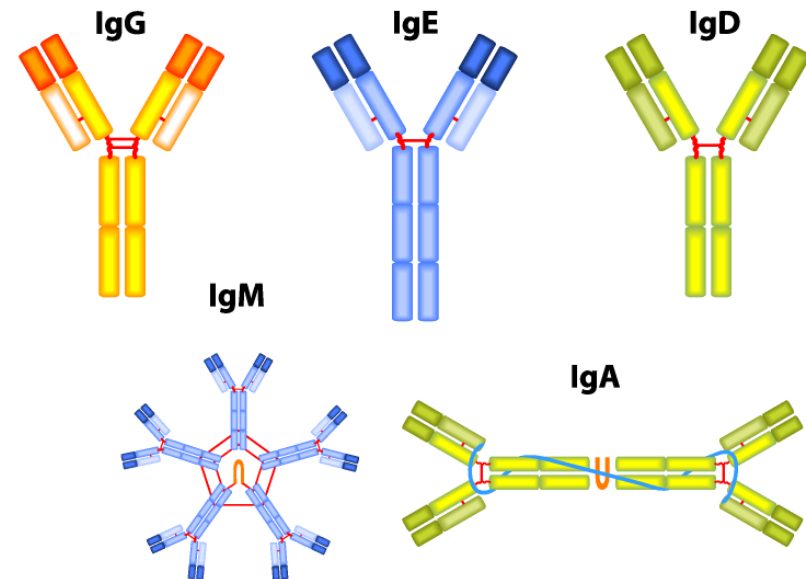


Estas técnicas pueden realizarse en muestras de diferente naturaleza como tejidos, cultivos celulares, cellspin/citospin o frotis de células o tejidos, y pueden tener aplicaciones muy diversas, entre las que se encuentran la detección de agentes etiológicos (virus, bacterias, hongos o parásitos), en inmunopatología (detección de subpoblaciones leucocitarias, citoquinas, inmunoglobulinas,...), en neoplasias (diagnóstico, determinación de estirpe celular, ...) o en endocrinología (detección de hormonas y sustancias secretadas por células).

## ANTICUERPOS

Son inmunoglobulinas (Ig) producidas por las células plasmáticas (células en las que se transforman los linfocitos B tras el reconocimiento de un Ag) y hay cinco tipos: G, A, M, D y E.

Son glicoproteínas constituidas por cuatro cadenas peptídicas (dos pesadas y dos ligeras), unidas entre sí por puentes transversales covalentes disulfuro.



En las cuatro cadenas, las porciones aminoterminales muestran una gran variabilidad en la secuencia y tipo de aminoácidos y se denominan porciones variables o segmentos Fab, siendo el resto de las cadenas constantes para cada tipo de Ig. **Es en las regiones Fab donde tiene lugar la interacción Ag-Ac.**

Para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas pueden utilizarse dos tipos de Ac, los policlonales y los monoclonales.

► **Anticuerpos policlonales:** son Ac desarrollados frente a los distintos epítomos de un mismo Ag. Estos Ac se obtienen mediante la inmunización activa de un animal de diferente especie (heterólogo) frente a determinados antígenos. Entre los que más se utilizan se encuentran: conejo, cobaya o cabra. A los animales inmunizados se le extrae el suero y se realiza la purificación de los Ac.



Los problemas más frecuentes que se derivan del uso de este tipo de Ac son la aparición de **reacciones cruzadas** o la **presencia de Ac contaminantes**, que pueden atenuarse si en la producción del Ac se utilizan Ag purificados o Ag sintéticos.

► **Anticuerpos monoclonales:** son Ac desarrollados frente a un solo epítipo de un Ag, lo que supone una serie de ventajas sobre los Ac policlonales ya que evita la existencia de otros Ac específicos, no solo frente a otros epítipos del Ag, sino también frente a posibles contaminantes.

Se producen a partir de ratones que son inmunizados con un Ag purificado. De los ratones se obtienen las células productoras de Ac específicas, que se fusionan con células de crecimiento ilimitado (líneas celulares tumorales) constituyendo hibridomas.

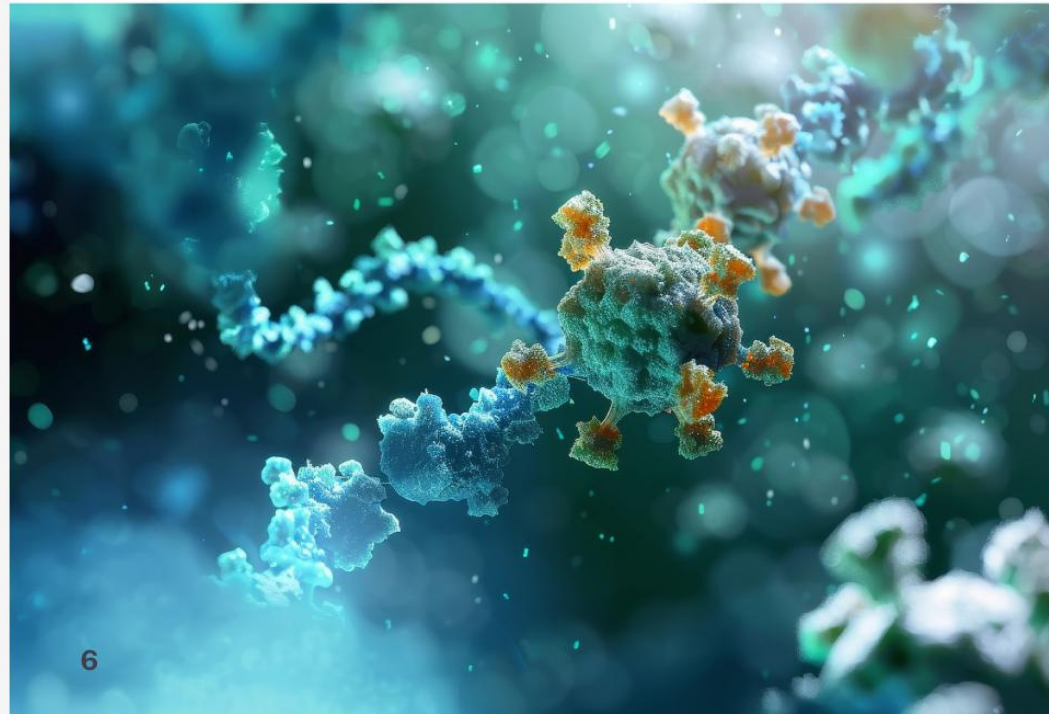
Posteriormente, se seleccionan los hibridomas que producen el Ac frente al epítipo de elección, que pueden cultivarse artificialmente, obteniéndose los Ac del sobrenadante del cultivo. Así pues, además de la especificidad para un epítipo, otra ventaja de los Ac monoclonales es la **continua disponibilidad a partir de esos cultivos celulares**, aunque evidentemente, el procesado necesario para su obtención supone que sean mucho más caros de producir que los Ac policlonales.



## MARCADORES

Son sustancias que unen a los Ac y permiten visualizar sobre la muestra el lugar de la reacción Ag-Ac. **Se conoce como conjugación a la unión del marcador al Ac.**

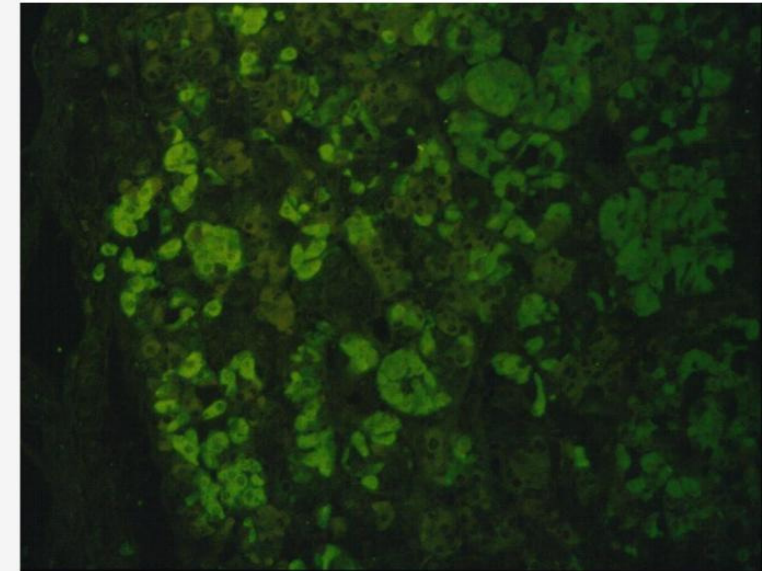
Entre las sustancias que se utilizan como marcadores se encuentran los **fluorocromos** (técnicas de inmunofluorescencia), las **enzimas** (técnicas inmunoenzimáticas) y los **iones metálicos** (técnicas inmuno-oro).



► **Fluorocromos:** entre los más usados se encuentran el **isotiocianado de fluoresceína** o la **metilrodamina**.

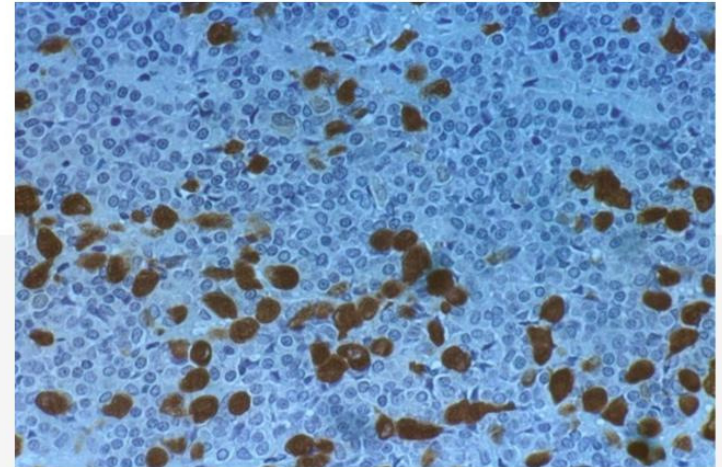


Este tipo de marcadores fueron los primeros en utilizarse en las técnicas inmunohistoquímicas, pero presentan una serie de **inconvenientes** que hacen que su utilización no esté actualmente muy extendida, como la necesidad de disponer de un microscopio de fluorescencia para su visualización, el que las muestras deban observarse rápidamente (ya que la fluorescencia decrece y no pueden conservarse durante largo tiempo), que la estructura no puede determinarse de forma precisa en el tejido con el microscopio de fluorescencia y que la mayoría de estas técnicas no pueden hacerse en cortes en parafina y requieren el uso de muestras en congelación, lo que supone una deficiente conservación estructural del tejido.



► **Enzimas:** se utilizan la **peroxidasa** y la **fosfatasa alcalina**. Las técnicas que utilizan enzimas son las más usadas actualmente. La visualización de la reacción requiere de un revelado, que consiste en añadir una sustancia (sustrato) que reacciona con la enzima, y esta reacción se visualiza mediante el empleo de un cromógeno.

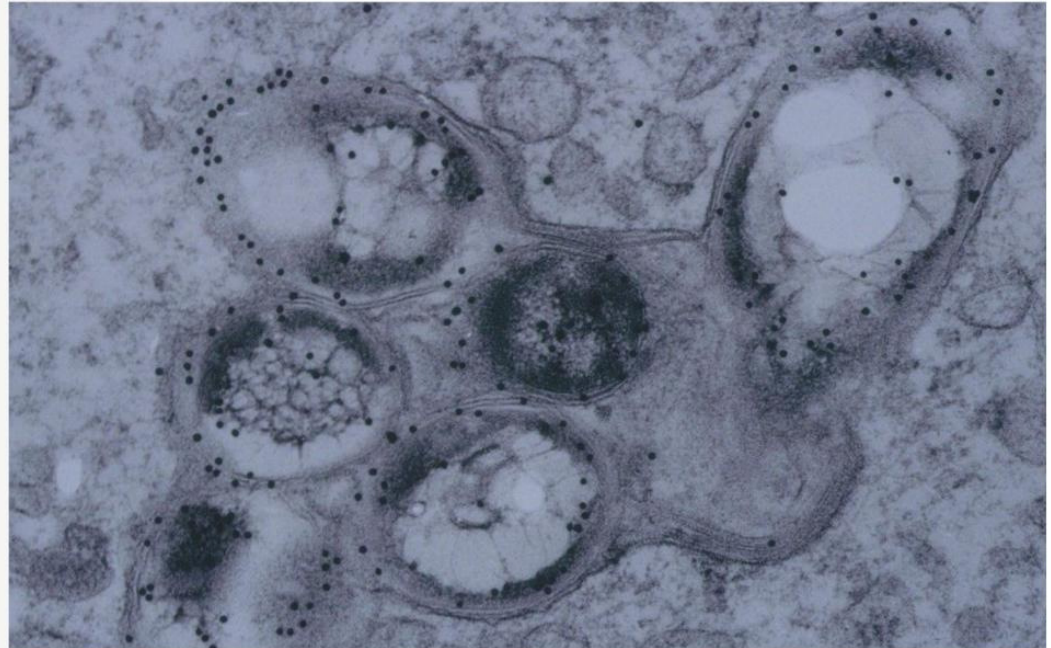
El proceso de conjugación puede alterar los Ac provocando una disminución de su sensibilidad y especificidad, lo que ha propiciado el uso de los denominados complejos para evitar este problema. Pueden ser **complejos solubles de un marcador unido a un Ac frente a él** (peroxidasa -antiperoxidasa -PAP- o fosfatasa alcalina -antifosfatasa alcalina -FAAFA-), o **complejos solubles de moléculas con gran afinidad entre sí**, como es el caso de la avidina y la biotina (avidina-biotina-peroxidasa -ABC-).



► **Iones metálicos:** se utilizan fundamentalmente para **microscopía electrónica**, y sobre todo en investigación. Utilizan partículas de oro coloidal de diferente diámetro (10, 20, 30 nm,...) por ser muy densas a los electrones.



El marcaje es muy preciso y permite su cuantificación.



## PROCESAMIENTO ESPECÍFICO DE LOS TEJIDOS

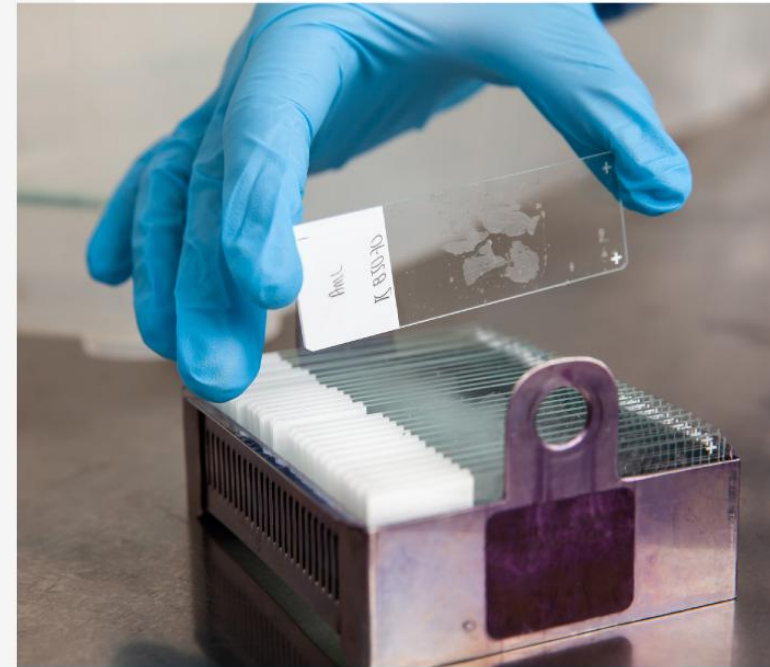
La optimización del rendimiento de las técnicas inmunohistoquímicas requiere tener en cuenta una serie de circunstancias a la hora de realizar algunas de las diferentes fases del procesado de los tejidos. Entre las fases a considerar se encuentran **la fijación, la inclusión, el desenmascaramiento y recuperación de Ag y el bloqueo de la actividad enzimática endógena.**



► **Fijación:** tiene como finalidad **preservar las características morfológicas y moleculares de un tejido lo más parecidas posibles a las que poseía en su estado vivo.**

Se pueden utilizar diferentes tipos de fijadores y cada uno de ellos presenta sus limitaciones. Entre los más utilizados se encuentran: **formol, acetona, alcohol, Bouin, sales de Zinc o Carnoy.**

Hay determinados Ag cuya detección no da buen resultado con este tipo de fijadores y se debe recurrir a la congelación.



Otro aspecto a tener en cuenta es el **tiempo de fijación**, ya que un exceso supone una reducción de la inmunoreactividad, como por ejemplo hemos podido observar en nuestro laboratorio en casos de diagnóstico inmunohistoquímico frente al virus PRRS, puesto que fijaciones en formol de más de 24 horas hacen que en muchas ocasiones podamos encontrar falsos negativos por esa pérdida de inmunoreactividad.

Algunas **características de los fijadores** más utilizados son las siguientes:

- ▶ La **fijación en formol** disminuye la inmunreactividad debido a reacciones cruzadas entre los grupos amino terminales de las proteínas lo que puede producir un enmascaramiento de Ag sobre grupos vecinos.
- ▶ La **fijación en acetona** preserva mal la estructura y muy bien los Ag de superficie.
- ▶ La **fijación con alcohol, Bouin, sales de Zinc o Carnoy** proporciona buenos resultados.
- ▶ La **fijación por congelación**, pese a dar buenos resultados con determinados Ag, tiene como inconvenientes el que requiere el uso de un criotomo para el corte de las muestras, así como la pobre calidad morfológica de las muestras.



► **Inclusión:** hay algunas prácticas que pueden ayudar a mejorar los resultados, como en el caso de la **inclusión en parafina**, que es el método más utilizado, el sustituir el etanol por **acetona** y el xilol por **cloroformo**, así como usar parafinas con punto de fusión más bajo, ya que temperaturas altas pueden alterar la inmunoreacción.



► **Desenmascaramiento y recuperación de Ag:** son métodos que ayudan a recuperar la antigenicidad perdida por la acción de los fijadores. Este proceso puede realizarse de diferentes maneras:

► **Digestión enzimática:** se realiza con proteasas como pronasa o tripsina. Si la digestión es excesiva puede haber destrucción del Ag y de parte del tejido, lo que puede dar lugar a falsos negativos. También puede producirse el desenmascaramiento de fragmentos comunes, lo que provocaría la aparición de marcaje inespecífico.

► **Calor:** se utilizan como fuentes de calor aparatos como microondas, olla a presión o autoclave. Las muestras se sumergen en soluciones como tampón citrato, EDTA, etc., y según el Ag a desenmascarar, se van variando parámetros como tiempo, temperatura y pH.

► **Detergentes:** como por ejemplo el Tween 20.

► **Deslipidización:** el uso de solventes de lípidos, como por ejemplo el cloroformo, ayudan a restablecer ciertos Ag de membrana.

► **Bloqueo de la actividad enzimática endógena:** en los casos en los que se utilizan como marcadores **enzimas** (peroxidasa o fosfatasa alcalina) que pueden estar de manera fisiológica en los tejidos, es necesario inhibir su actividad endógena para evitar la aparición de falsos positivos.

En el caso de la peroxidasa se utiliza un tratamiento con metanol y peróxido de hidrógeno, y en el caso de la fosfatasa alcalina se emplea levamisol.

## TIPOS DE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Podemos diferenciar entre técnicas directas e indirectas.

► **Técnicas directas:** el Ac primario está unido a un marcador, es decir está conjugado. Estas técnicas presentan como ventajas la **rapidez de realización** y que al hacerse una sólo incubación, se **evita el riesgo de uniones inespecíficas**.



Como inconvenientes presentan que, al estar el Ac primario conjugado, este puede alterarse, y que necesitamos tener todos los Ac conjugados.

► **Técnicas indirectas:** el Ac primario no está conjugado y se utiliza un Ac, denominado secundario o puente, que es el que se va a conjugar, desarrollado en una especie distinta a la que se utilizó para producir el Ac primario.



Estas técnicas presentan como ventajas que, **al no estar conjugado el Ac primario, este no se altera, y que la sensibilidad aumenta al aumentarse el número de reacciones.**



Como principales inconvenientes encontramos que son **técnicas más laboriosas** que las directas y que existe la posibilidad de aparición de “**ruido de fondo**” si el Ac secundario se une a una estructura diferente a la que debe.

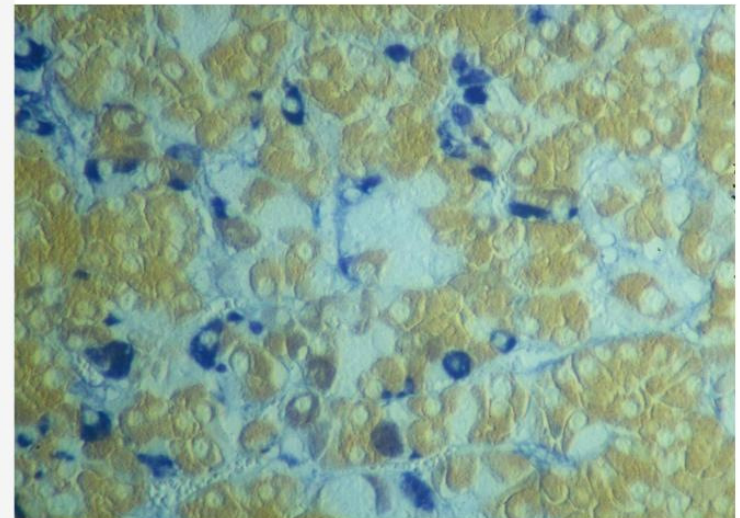
Dentro de las técnicas indirectas podemos diferenciar aquellas que utilizan complejos (PAP o ABC) o polímeros.

- ▶ **Método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP):** el Ac secundario no está conjugado y se une a un complejo Ag-Ac formado por PAP que se ha desarrollado en la misma especie que el Ac primario, por lo que se va a unir específicamente al Ac secundario. Presenta las ventajas e inconvenientes generales descritos para las técnicas indirectas
- ▶ **Método de la avidina-biotina-peroxidasa (ABC):** el Ac secundario está biotinado (unido a biotina), y debido a la afinidad que tiene esta sustancia con la avidina, para marcarlo se utiliza un complejo ABC. Presenta como ventajas, además de las generales descritas para las técnicas indirectas, que la amplificación de la señal es mayor. Como inconvenientes, los descritos para las técnicas indirectas,
- ▶ **Polímeros:** se utiliza un polimero de dextrano unido a Ac secundario y peroxidasa. Presenta las ventajas de ser una técnica simple y rápida, de alta sensibilidad y que produce una gran amplificación de la señal, pero como principal inconveniente presenta el alto coste económico.

## MARCAJES DOBLES

Se utilizan para el marcaje de dos Ag diferentes en una misma sección de tejido. Consiste en la **realización de dos secuencias de inmunorreacción utilizando marcadores diferentes en cada una de ellas de manera que se visualizarán de dos colores diferentes.**

Con el fin de evitar reacciones cruzadas, para las dos inmunorreacciones se utilizan Ac primarios desarrollados en diferentes especies. Si no fuera posible, para evitarlo habría que realizar tratamientos específicos entre las dos secuencias de inmunorreacción.



*PRL: marrón  
GH: azul*

## CONTROLES DE ESPECIFICIDAD

Cuando realizamos técnicas inmunohistoquímicas debemos utilizar una serie de controles de especificidad. Los controles que se emplean son:

- ▶ **Control positivo:** consiste en utilizar una muestra que se sabe con certeza que tiene el Ag a identificar.
- ▶ **Control negativo:** se utilizan muestras que se sabe con certeza que no contienen el Ag a identificar. También se puede utilizar la misma muestra que en el control positivo, en la cual se omite el Ac primario o se utiliza en su lugar una solución tampón de lavado. Si da resultado positivo se debe a la aparición de marcaje inespecífico.
- ▶ **Control de absorción:** se realiza la preincubación del Ac primario con Ag en exceso para que sea absorbido.

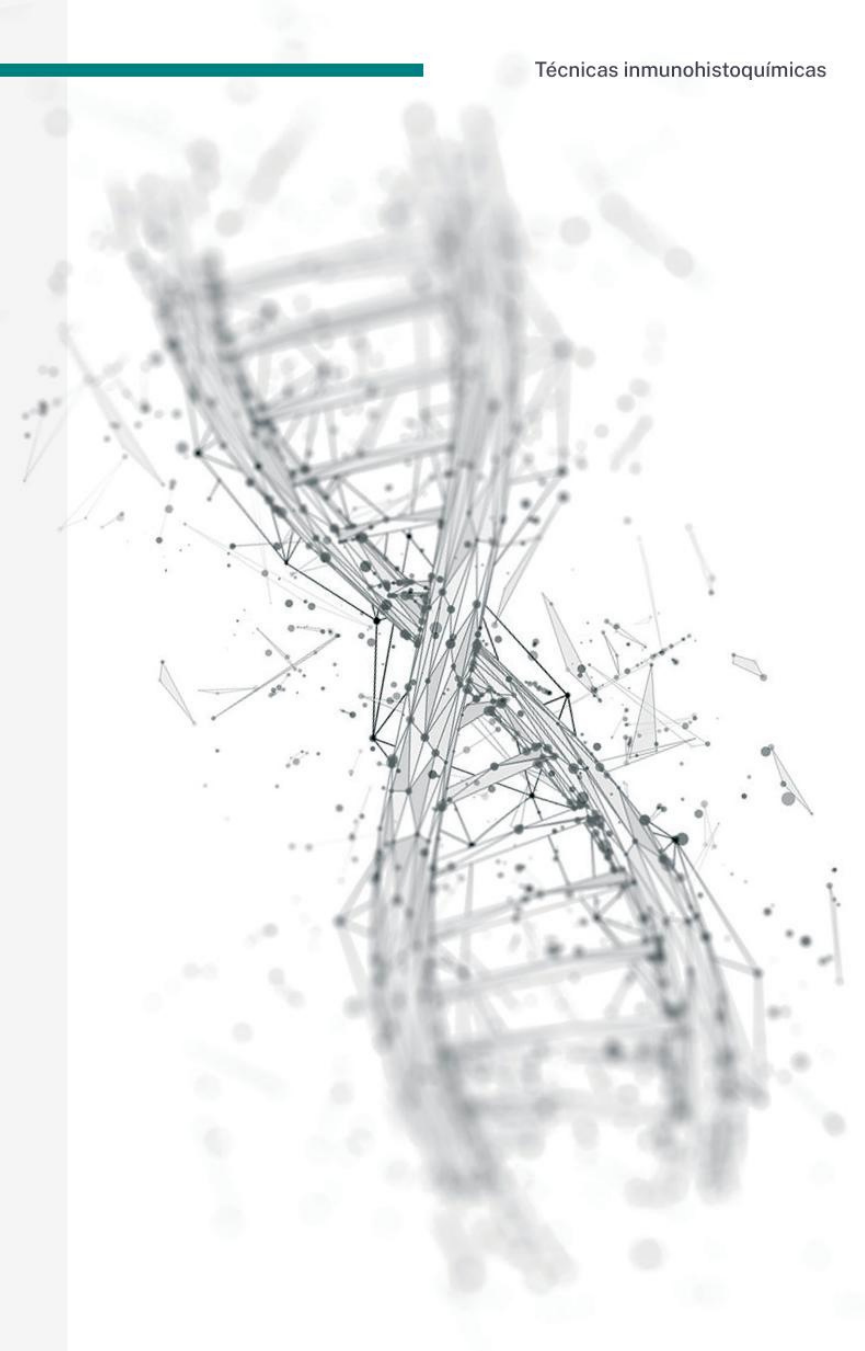


## HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Consiste en **descubrir la presencia de una secuencia de ADN o ARN** en el sitio en que se encuentran (tejidos, células y cromosomas) y se basa en la complementariedad de las secuencias de bases nucleotídicas.

Para ello se utilizan sondas, que son hebras sencillas de ADN o ARN con la secuencia complementaria a la que se quiere detectar, que van marcadas con una sustancia química o radiactiva para su visualización.

Entre sus aplicaciones más destacadas se encuentran la **detección de patógenos** (virus o bacterias), estudios de expresión genética, estudio de enfermedades de origen genético, diagnóstico y desarrollo de tumores, mapeo de cromosomas o estudios del cariotipo.



**¡Muchas gracias!**



**Grupo de Comunicación Agrinews S.L.**

*Avinguda de Jaume Recoder, 17, 08301 Mataró,  
Barcelona (España)*

*[info@grupoagrinews.com](mailto:info@grupoagrinews.com)*

*Tel: +34 93 115 44 15*