

83



Universidad Nacional Autónoma de  
México

---

---

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**"TECNICAS DE INMUNOHISTOQUIMICA COMO  
MEDIO DE DIAGNOSTICO"**

**PRUEBA ESCRITA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

EN EL PROGRAMA DE TITULACIÓN POR ALTO PROMEDIO

PRESENTA

**VERÓNICA GÓMEZ GÓMEZ**

DIRECTOR: C. D. ALEJANDRO MIRANDA GÓMEZ

ASESORA: DRA. MARÍA GUADALUPE FLORES LUNA



México, D.F.

2000

274326



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Indice Temático

1. Introducción	3
2. Generalidades	4
3. Conceptos básicos de Inmunología	5
4. Métodos inmunohistoquímicos	6
Enzimas	7
Técnica de inmunofluorescencia	8
Técnica de inmunoperoxidasa	9
Técnica con fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa	12
Método de avidina-biotina	13
Cromógenos	15
5. Aspectos prácticos en el desarrollo de las Técnicas Inmunohistoquímicas	16
Autolisis	16
Fijación	16
Inclusión	19
Decalcificación	20
Pretratamiento del tejido	20
Bloqueo de la actividad endógena	21
Bloqueo de tinción de fondo	22
Control	22
6. Producción de anticuerpos	24
7. Aplicación diagnóstica	27
8. Conclusiones	28
9. Bibliografía	29

## 1. INTRODUCCION

Uno de los retos principales de la ciencia médica, es el conocimiento y la integración de los adelantos básicos de la inmunohistoquímica en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. Por otro lado, el análisis cualitativo y cuantitativo de diversas características de la respuesta inmunitaria, ha conducido a un mejor entendimiento de la patogénia de muchos trastornos clínicos. Por lo tanto, este entendimiento a estimulado la investigación científica básica en inmunología e histoquímica.

La Inmunohistoquímica es la unión de dos disciplinas Inmunología e Histoquímica. El conocimiento de esta técnica nos conduce a la conclusión de que la Inmunohistoquímica es capaz de resolver la mayoría de los problemas que se plantean actualmente en el diagnóstico clínico.

Los métodos inmunohistoquímicos se emplearon originalmente en los estudios sobre las reacciones inmunológicas del organismo. Sin embargo, la importancia de la inmunohistoquímica es mucho mayor. En principio, es posible determinar la localización de cada proteína que se forma en el organismo. La palabra inmunohistoquímica fue empleada por primera vez en 1903 por Arrhenius.

Estas técnicas se utilizan para identificar antígenos presentes en suspensiones celulares o en cortes de tejidos, su aplicación más común está orientada a la detección de antígenos. Los antígenos pueden ser propios de las células examinadas o corresponder a microorganismos (o sus productos) localizados dentro o en la superficie de las células.

## **2. GENERALIDADES**

Los métodos inmunohistoquímicos se basan en el empleo de un anticuerpo específico marcado por enlace químico con una sustancia que puede hacerse visible, sin que se afecte la capacidad del anticuerpo de formar el complejo antígeno-anticuerpo. El principio puede ilustrarse con la denominada técnica de anticuerpo fluorescente, en la cual se emplea la fluoresceína.

Los anticuerpos pueden tratarse con enzimas para poder localizar los complejos antígeno-anticuerpo por determinación enzimohistoquímica. Por lo que desarrollaremos las técnicas más empleadas, así como los factores y aspectos prácticos que intervienen durante el proceso, para obtener resultados positivos.

La especificidad del método depende de que el antígeno empleado pueda aislarse sin mezclarse con otras sustancias. Por lo tanto un control importante del método es la investigación del grado de pureza del antígeno. Debe asegurarse la especificidad de la reacción inmunohistoquímica por medio del uso de tejido control.

### 3. CONCEPTOS BASICOS DE INMUNOLOGIA

Para ayudar a la comprensión general de los métodos inmunohistoquímicos, es necesario describir algunos términos que se emplearán a lo largo de este trabajo.

#### ANTIGENO.

El antígeno es una molécula que genera como respuesta la producción de un anticuerpo o células sensibilizadas. La parte de antígeno que se une específicamente al anticuerpo se llama determinante antigénico o epitope. Una molécula antigénica puede tener varios epitopes, aunque el anticuerpo solo se unirá a un epitope específico. La gran mayoría de los antígenos son proteínas y su antigenicidad depende de la estructura química que pueden ser carbohidratos y fosfolípidos<sup>(5)</sup>.

#### EPITOPE.

La porción del antígeno que se combina con el sitio de enlace del anticuerpo se llama determinante antigénico. Esta es una estructura química tridimensional presente en el antígeno que determina la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo<sup>(2)</sup>.

#### ANTIGENICIDAD.

La antigenicidad es la capacidad que tiene un antígeno para producir una respuesta inmunitaria. La antigenicidad depende de la naturaleza fisicoquímica y de la estructura tridimensional del antígeno, además del procesamiento químico y físico del tejido. Un antígeno óptimo debe retener la antigenicidad para ser reconocido fácilmente por los anticuerpos.

La alteración de la antigenicidad depende del antígeno en particular y de los procedimientos en el manejo del tejido como: la autólisis, fijación e inclusión<sup>(2)</sup>.

#### ANTICUERPOS.

Los anticuerpos forman parte de un grupo de proteínas con similitudes estructurales, a las que se ha denominado inmunoglobulinas. La mayor parte de las inmunoglobulinas, o quizás todas son sintetizadas por las células plasmáticas, pasando al suero y líquidos tisulares. Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glucoproteínas que tienen afinidad específica por los antígenos, las cuales son producidas como respuesta a la estimulación antigénica. Estos son clasificados de acuerdo a su movilidad

electroforética, la cual depende de la composición química. Las distintas clases de inmunoglobulinas dependen de la estructura tridimensional, del porcentaje de carbohidratos y de la función de otras sustancias. Estructura básica. La molécula de inmunoglobulina utilizada en el método inmunohistoquímico es la subclase IgG.

La fracción variable (Fab) tiene una especificidad diversa y tiene afinidad específica por los antígenos. La fracción constante (Fc) contiene receptores para el sistema de complemento, fracción o receptor para la proteína A y células inflamatorias (macrófagos, mastocitos, linfocitos y al sincitiotrofoblasto placentario).

La unidad estructural básica de cada clase de inmunoglobulina consiste en dos pares de cadenas polipeptídicas unidas por enlace de disulfuro. Estas cadenas polipeptídicas corresponde a: dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H).

#### AFINIDAD

La fuerza del enlace entre un determinante antigénico de un antígeno o hapteno y el sitio de enlace de un anticuerpo se denomina afinidad del anticuerpo. La afinidad es la suma de las fuerzas de atracción y repulsión entre el anticuerpo y su antígeno correspondiente<sup>(7)</sup>.

#### 4. METODOS INMUNOHISTOQUIMICOS

Los métodos inmunohistoquímicos son métodos de inmunolocalización que utilizan una enzima como trazador del marcaje. La reacción antígeno-anticuerpo se observa añadiendo al final de la reacción el substrato de la enzima más una sustancia llamada cromógeno. El cromógeno da lugar a un precipitado insoluble y coloreado. Las enzimas más utilizadas como trazadoras del marcaje son: peroxidasa, fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa (ocasionalmente usada)<sup>(5)</sup>.

electroforética, la cual depende de la composición química. Las distintas clases de inmunoglobulinas dependen de la estructura tridimensional, del porcentaje de carbohidratos y de la función de otras sustancias. Estructura básica. La molécula de inmunoglobulina utilizada en el método inmunohistoquímico es la subclase IgG.

La fracción variable (Fab) tiene una especificidad diversa y tiene afinidad específica por los antígenos. La fracción constante (Fc) contiene receptores para el sistema de complemento, fracción o receptor para la proteína A y células inflamatorias (macrófagos, mastocitos, linfocitos y al sincitiotrofoblasto placentario).

La unidad estructural básica de cada clase de inmunoglobulina consiste en dos pares de cadenas polipeptídicas unidas por enlace de disulfuro. Estas cadenas polipeptídicas corresponde a: dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H).

#### AFINIDAD

La fuerza del enlace entre un determinante antigénico de un antígeno o hapteno y el sitio de enlace de un anticuerpo se denomina afinidad del anticuerpo. La afinidad es la suma de las fuerzas de atracción y repulsión entre el anticuerpo y su antígeno correspondiente<sup>(7)</sup>.

#### 4. METODOS INMUNOHISTOQUIMICOS

Los métodos inmunohistoquímicos son métodos de inmunolocalización que utilizan una enzima como trazador del marcaje. La reacción antígeno-anticuerpo se observa añadiendo al final de la reacción el substrato de la enzima más una sustancia llamada cromógeno. El cromógeno da lugar a un precipitado insoluble y coloreado. Las enzimas más utilizadas como trazadoras del marcaje son: peroxidasa, fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa (ocasionalmente usada)<sup>(5)</sup>.

## ENZIMAS UTILIZADAS EN LOS METODOS INMINOHISTOQUIMICOS

Las enzimas son proteínas que disminuyen la cantidad de energía que se requiere para llevar a cabo una reacción; esta actividad catalítica es específica. Para realizar su función, se unen a las moléculas por catalizar o substratos<sup>(11)</sup>.

*Peroxidasa.* (enzima que interviene en el proceso de reducción y oxidación)

La peroxidasa utiliza el peróxido de hidrógeno o un peróxido orgánico como sustrato, se encuentran presente en la leche, vegetales, leucocitos, plaquetas y eritrocitos. Es la enzima utilizada más fácilmente como marcador. Consiste en más de 20 isoenzimas que tienen un punto isoeléctrico diferente. La peroxidasa ideal debería tener un punto isoeléctrico, a un pH casi fisiológico, el cual es óptimo para la reacción antígeno-anticuerpo<sup>(11,2)</sup>.

La peroxidasa demuestra la habilidad de reducir el peróxido de hidrógeno a agua en presencia de un electrón donador. Existen múltiples sustratos para la peroxidasa. Los siguientes factores influyen para la selección del sustrato:

- 1- Color- El color podría contrastar con otros colores existentes en el tejido. Ejemplo. Un cromógeno café claro podría contrastar con la melanina. Un segundo cromógeno de color diferente podría ser seleccionado para una doble tinción inmunohistoquímica.
- 2- Solubilidad. Unicamente DAB forma un precipitado insoluble en las preparaciones tisulares, las cuales pueden permanecer almacenadas por largo tiempo. Los otros cromógenos son solubles en solventes orgánicos
- 3- Sensibilidad<sup>(2)</sup>.

*Fosfatasa alcalina.* En 1969, fue utilizada por primera vez por Avrameas., su sustrato incluye sales de naftol, como agentes de unión (naftol AS-MX o fosfato AS-BI) y sales de diazonio como cromógeno<sup>(2)</sup>.

*Glucosa oxidasa.* La glucosa oxidasa no es muy utilizada por que el sustrato que requiere no es estable<sup>(9)</sup>.

Clasificación de los métodos inmunohistoquímicos:

*Inmunofluorescencia:* directa e indirecta

*Inmunohistoenzimática:* método de la peroxidasa, método peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), método avidina-biotina (ABC) y método de estreptavidina-biotina (SAP).

## INMUNOFLUORESCENCIA

La inmonofluorescencia se puede aplicar como una técnica inmunohistoquímica o inmunocitoquímica para detección y localización de antígenos en células o tejidos. El anticuerpo específico se conjuga con compuestos fluorescentes, dando como resultado un trazador sensible para antígenos del tejido. El anticuerpo conjugado reacciona con los antígenos de las células o tejidos formándose así un complejo inmune estable. El anticuerpo no fijado se elimina por lavado y la preparación resultante se observa en un microscopio de fluorescencia <sup>(8)</sup>.

El fenómeno de fluorescencia es la emisión de luz con diferente longitud de onda, a la longitud de onda excitatoria o incidente. Los fluorocromos como la rodamina o fluoresceína utilizados en los laboratorios clínicos, tienen espectros característicos de emisión y absorción. El isotiocianato de fluoresceína (FITC) se unen con rapidez covalente a las proteínas en un pH alcalino y emite un color característico verde-amarillento. El isotiocianato de tetrametil rodamina, emite su color característico anaranjado-rojizo<sup>(9)</sup>.

La técnica de inmunofluorescencia utiliza preferentemente tejido fijados por congelación, ya que de esta manera se asegura la preservación de la antigenicidad de los antígenos presentes en las células y/o tejidos.

Las desventajas del marcador con inmunofluorescencia son: 1) El marcador puede por sí misma apagar gradualmente el proceso que es activado por la incidencia de luz. Por lo que los marcadores fluorescentes no son permanentes. Aunque este proceso se apague puede ser acelerado. 2) La eliminación no puede ser deshidratada la eliminación de la cubierta compromete la tinción. La deshidratación para la eliminación de la cubierta y un panorama óptimo soluciona la inactivación y solubilidad de los compuestos fluorescentes. 3) Se requiere la filtración de luz para evitar la incandescencia de la luz a una longitud de onda de amplio espectro, por que la luz fluorescente no se observa en la luz blanca.

Los sistemas de detección para la técnica de fluoresceína pueden ser directos o indirectos

*Método directo.* En este método el anticuerpo conjugado se añade directo a la selección de tejido o suspensión de células viables.

*Método indirecto.* Este método permite la detección de anticuerpo en el suero. Elimina la necesidad de purificar y conjugar individualmente cada muestra de suero.

### TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA

La peroxidasa es una enzima obtenida del rábano picante, es el trazador de marcaje enzimático más utilizado. La peroxidasa puede emplearse de la siguiente forma:

- ◆ Técnicas con anticuerpos marcados: técnica directas o indirectas
- ◆ Técnicas con anticuerpos sin marcar: técnicas de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).

#### Técnicas con anticuerpos marcados

En esta técnica el anticuerpo va unido al trazador, pudiendo procederse por el método directo o indirecto, similares en su fundamento a los aplicados a la inmunofluorescencia.

#### *Método directo*

En este método el anticuerpo primario se conjuga directamente con la enzima peroxidasa (en desuso). Es el método más sencillo, pero el menos sensible para la detección de antígenos.

*Método indirecto*

En este procedimiento el anticuerpo primario sin conjugar se une en un primer paso con el antígeno presente en la sección de tejido. Posteriormente se añade un anticuerpo secundario, marcado con el trazador enzimático el cual es obtenido en un animal diferente al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se produce específicamente contra la clase de inmunoglobulina que constituye el anticuerpo primario.

Ventajas del método indirecto:

- a) es más sensible que la técnica directa y,
- b) el anticuerpo secundario puede utilizarse para todos los anticuerpos primarios posibles obtenidos de una misma especie.

Características de los métodos directo e indirecto:

1. En los dos existe una sola molécula de peroxidasa por cada una de anticuerpo y
2. La sensibilidad de ambos métodos es superior a la de la inmunofluorescencia, debido a que cada molécula de peroxidasa es capaz de desdoblar múltiples moléculas de substrato.

Los métodos de marcaje con peroxidasa, encierran dos inconvenientes principales:

1. En los tejidos existe normalmente peroxidasa endógena que puede dar lugar a falsos-positivos. Por esta razón como fase previa a la realización de la técnica, es necesario inhibir la actividad endógena de la peroxidasa sobre el tejido de estudio.
2. El cromógeno utilizado para revelar la reacción, es la diaminobenzidina (DAB) que posee una gran toxicidad carcinogénica por lo que debe ser manipulada con precaución.

Técnicas con anticuerpos no marcados. Método de la Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP)

En esta técnica en lugar de usar anticuerpos marcados con una enzima, utiliza como trazadores de marcaje inmunocomplejos formados por la enzima peroxidasa y anticuerpos específicos contra ella.

El complejo se obtiene, al entrar en contacto "in vitro" los anticuerpos con la peroxidasa formando el complejo peroxidasa-antiperoxidasa o complejo (PAP) a través de una reacción de precipitación. El complejo PAP está formado por tres moléculas de peroxidasa y dos de anticuerpo antiperoxidasa<sup>(4)</sup>.

Para este procedimiento de inmunotinción se utilizan sucesivamente tres reactivos inmunes diferentes:

1. Anticuerpo primario, semejante a los empleados para los métodos de inmunoperoxidasa directa e indirecta.
2. Anticuerpo puente o secundario, que unirá el anticuerpo primario al complejo PAP.
3. Complejo PAP, que contiene la enzima que actuará como trazador de la reacción inmune.

Este procedimiento de inmunolocalización es de 100 a 1000 veces más eficaz que las técnicas indirectas que emplean anticuerpos marcados con fluorocromos o peroxidasa; y 20 veces más sensible que las técnicas en que el anticuerpo antiperoxidasa y la peroxidasa se aplican como soluciones separadas<sup>(4)</sup>.

Procedimiento técnico

1. Desparafinar e hidratar.
2. Inhibir la peróxidasa endógena.
3. Incubar con suero de cerdo (o del animal del que se haya obtenido el anticuerpo puente) normal o diluido en TBS al 1/20 durante 20 a 30 minutos.
4. Drenar el exceso de suero y secar alrededor del círculo.

5. Incubar con el anticuerpo primario de conejo a la dilución óptima, usando como diluyente suero normal de cerdo al 1:20 o TBS. Incubar 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente o toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
6. Eliminar el exceso de anticuerpo con TBS y aplicar tres lavados en TBS de 3 minutos cada uno.
7. Incubar con el anticuerpo secundario (habitualmente, suero de cerdo anti-IgG de conejo), usando para diluirlo el mismo solvente que para el anticuerpo primario. La incubación se realiza en cámara húmeda por 30 minutos.
8. Proceder como en el paso 6
9. Incubar en cámara húmeda, de 30 a 60 minutos con el complejo peróxidasa-antiperóxidasa en la dilución óptima.
10. Proceder como en el paso 6.
11. Revelar con DAB aproximadamente 10 minutos bajo control microscópico.
12. Lavar con agua corriente.
13. Contrastar con hematoxilina, deshidratar, aclarar y montar <sup>(4)</sup>.

#### TECNICAS CON FOSFATASA ALCALINA Y GLUCOSA OXIDASA COMO ENZIMAS TRAZADORAS

El método que utiliza a la enzima fosfatasa alcalina, es menos empleada que la peroxidasa, debido a la mayor dificultad de su manejo.

La fosfatasa alcalina es una enzima capaz de hidrolizar los ésteres de fosfato en un medio alcalino. Para visualizar la actividad de la enzima se procede al revelado empleando naftol-AS-fosfato como substrato y sales de diazonio tipo rojo rápido (fast red) o azul rápido (fast blue) como agente de unión, manifestándose de un color azoico rojo o azul. El principal inconveniente de los métodos que utilizan la fosfatasa alcalina como trazador, es la necesidad de utilizar un medio de montaje acuoso para la confección definitiva de las preparaciones.

La mayor ventaja para la utilización de la fosfatasa alcalina como trazador es que debido a la escasa proporción presente en los tejidos normales, no suele ser necesario inhibir su actividad endógena. Los tejidos que presentan fosfatasa y que son de importancia en nuestra área son; dentina, tejido óseo, cemento radicular y cartílago.

La glucosa oxidasa es una enzima que histoquímicamente, se manifiesta por oxidación de la glucosa con reducción simultánea de una sal de tetrazoilo incolora que se transforma en un azul formazán estable y no degradable. La enzima es aislada del "Aspergillus niger" y de la que no existe actividad endógena en los mamíferos<sup>(4)</sup>.

#### Procedimiento técnico

Se procede igual que para la técnica de PAP, aunque usando un complejo de fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina.

La reacción puede mejorarse repitiendo una o dos veces todos los pasos a partir de la incubación con el anticuerpo secundario o puente.

#### MÉTODOS DE AVIDINA-BIOTINA

Es un método altamente sensible, en el cual se emplean anticuerpos marcados, la reacción se basa en la gran afinidad que poseen entre sí las moléculas de avidina y biotina generando un fuerte enlace no inmune.

*Avidina.* Es una glicoproteína de alto peso molecular. Se encuentra en la clara del huevo y en el *Streptomyces avidinii* (estreptoavidina). Está formada por cuatro subunidades que configuran una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas que sirven de enlace con la biotina. La avidina puede unirse con enlaces covalentes, con una gran variedad de proteínas, glicoproteínas y polisacáridos<sup>(5)</sup>.

*Biotina.* Es una proteína de bajo peso molecular, perteneciente al complejo B. Se encuentra presente en la yema de huevo. Se une fácilmente con anticuerpos y proteínas trazadoras mediante enlace covalente, a cadenas laterales aminos o carboxilo de residuos de aminoácidos, o residuos de azúcares, de proteínas y glicoproteínas. Pueden unirse hasta 150 moléculas de biotina a una sola molécula de anticuerpo<sup>(4)</sup>.

Los métodos inmunoenzimáticos que utilizan la avidina-biotina (para ser visible la reacción antígeno-anticuerpo) puede realizar por medio de dos métodos:

Técnica directa. El anticuerpo primario es marcado con la biotina.

Técnica indirecta. Es la más habitual, el anticuerpo secundario es marcado con la biotina.

Dependiendo del desarrollo de la fase no inmunológica del proceso se obtienen dos métodos:

#### *Método puente avidina-biotina.*

Se une el anticuerpo biotinilado con avidina sin marcar para ligar a continuación el complejo con una enzima biotinilada.

Procedimiento:

Los pasos 1 al 6 son iguales que en la técnica del complejo avidina-biotina. Después se procede a incubar la avidina marcada con la enzima durante 30 minutos. Los pasos 8 al 11 son así mismos iguales.

A continuación se describirá la técnica del complejo ABC como técnica de mayor relevancia.

#### *Método de complejo avidina-biotina o ABC*

Se aplica un complejo de avidina y un trazador enzimático biotinilado que contengan lugares libres en la avidina para que se produzca la fijación sobre al anticuerpo primario o secundario biotinilado

Procedimiento:

1. Incubar con suero normal de cerdo (SNC), diluido 1:20 en solución amortiguadora Tris/salina (TBS) durante 20 minutos.
2. Drenar el exceso de SNC.
3. Incubar con el anticuerpo primario en la dilución óptima, usando como solvente SNC en dilución 1:20, durante 30 a 45 min. A temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
4. Eliminar el exceso de anticuerpo primario y lavar en TBS, tres cambios de cinco minutos cada uno.
5. Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado (dilución óptima), disuelto en SNC con una concentración 1:20, de 40 a 45 minutos.
6. Proceder como en el paso cuatro.

7. Incubar el complejo avidina-biotina (dilución óptima), disuelta en SNC a 1:20 de 30 a 60 minutos.
8. Proceder como en los pasos 4 y 6.
9. Incubar con la solución correspondiente de revelado según se haya elegido el marcaje con peroxidasa o fosfatasa alcalina.
10. Lavar en agua corriente.
11. Contrastar con hematoxilina (de preferencia hematoxilina de Mayer), y montar<sup>(4)</sup>.

#### Ventajas de la técnica avidina-biotina

- ◆ El método tiene muy alta sensibilidad ya que muchas moléculas de biotina se pueden unir a un solo anticuerpo.
- ◆ Permite que el anticuerpo se pueda emplear muy diluido, debido a la gran cantidad de unión de biotina a un solo anticuerpo.

#### Observaciones:

Algunos tejidos tienen la capacidad de atrapar la avidina (ya sea por afinidad molecular o por su alto contenido en biotina endógena), lo cual puede determinar la aparición de falsos positivos.

#### CROMOGENOS

Las enzimas utilizadas en los métodos inmunohistoquímicos tienen la capacidad de interaccionar con una tercera sustancia, que dé lugar al producto opaco o insoluble preciso.

Como cromógenos se emplean los siguientes:

- ◆ 3,3´diaminobencidina (DAB) para la peroxidasa
- ◆ 3-amino-9-etil-carbazol, para la peroxidasa
- ◆ 4-cloro-1-naftol, para la peroxidasa.
- ◆ Fenilendiaminapírocatecol, para la peroxidasa.
- ◆ Nitroazul de tetrazolio, para la glucosa-oxidasa.
- ◆ Fosfato de naftanol, para la fosfatasa alcalina<sup>(9)</sup>.

## **5. ASPECTOS PRACTICOS DEL DESARROLLO DE LAS TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS**

Es conveniente mencionar y detallar los factores que repercuten en el resultado de las técnicas inmunohistoquímicas y de las inmunotinciones para preservar el tejido

### **AUTOLISIS.**

La isquemia y muerte celular pueden ocurrir después de la desvitalización del tejido. La reacción es iniciada por enzimas proteolíticas, metabolizando los componentes celulares. Estas enzimas alteran irreversiblemente la estructura molecular y por lo tanto la antigenicidad. Una autólisis mínima por enzimas proteolíticas endógenas provoca un marcado cambio en la antigenicidad <sup>(1)</sup>.

### **FIJACIÓN.**

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

El propósito de la fijación es: 1) Inactivar el mecanismo autolítico, con retención de la arquitectura celular, 2) Inmovilizar las moléculas para evitar la relocalización en otra parte de la célula, o para prevenir la difusión, 3) Incrementa la rigidez tisular que facilita el corte.

La precisión de la localización de las moléculas ya fijadas depende del antígeno, del fijador y de las condiciones de fijación.

La finalidad de la fijación es disminuir la pérdida de proteínas. Los antígenos más pequeños están sujetos a una mayor movilización. La fijación es acelerada por el calor y la agitación que optimizan la localización de antígenos.

A consecuencia de las reacciones química durante la fijación la antigenicidad es alterada. El formaldehído altera considerablemente la antigenicidad de los filamentos intermedios de queratina, en contraste, el formaldehído y el etanol no modifican la antigenicidad de hormonas péptidas. El beneficio de la alteración de la estructura proteica es la inactivación de las enzimas endógenas que son las responsables de un falso positivo <sup>(1,4)</sup>.

Las condiciones del fijador también afectan la antigenicidad; El fijador debe ser una solución isotónica y con un pH neutro para obtener una optima retención de la antigenicidad.

Aspectos importantes que debemos tomar en cuenta durante el desarrollo de la fijación:

1. Los fijadores que actúan por precipitación de proteínas, como los fijadores ácidos (solución de Bouin o solución de Carnoy), el alcohol etílico y los compuestos a base de metales pesados (B5 o Zenker), suelen producir mejores resultados que los fijadores por reticulación (formalina) o los que contienen oxidantes, como la solución de Helly.
2. Para preservar la antigenicidad es necesario controlar el tiempo de fijación. Dependiendo de la localización histológica y anatómica del antígeno a examinar el fijador actuará de diferente manera.
3. Cuando se va a fijar una muestra de gran volumen, la fijación por inmersión en la solución fijadora proporciona resultados variables en cuanto a la positividad inmunohistoquímica, ya que las zonas mejor fijadas se teñirán más que las más profundas.
4. La fijación debe ser inmediata para evitar la autólisis.

Los agentes fijadores más comunes son:

*Congelación.* El método por congelado da una buena retención y conserva la antigenicidad natural. Hace más rápida y precisa la localización de las moléculas antigénicas. Las desventajas de la congelación de tejidos son las siguientes:

1. Posible difusión de los antígenos, principalmente de moléculas pequeñas, a los diferentes comportamientos celulares o fuera del tejido.
2. Inactivación irreversible de las proteínas (enzimas) endógenas
3. Distorsión considerable de la estructura celular por la formación de cristales de hielo. Un congelado con deshidratación ultra rápida puede corregir este problema.
4. La congelación hace que las secciones se desprendan más fácilmente del tejido.

*Alcohol y acetona.* La fijación de los antígenos con alcohol y acetona es por desnaturalización de las enzimas. Provoca una mínima alteración de la antigenicidad, Su desventaja es similar a la fijación por congelación, es decir, es posible la traslocación de antígenos y no previene la autólisis de los tejidos y en ocasiones provoca una mala preservación estructural.

Los fijadores alcohólicos se recomienda para la determinación de filamentos intermedios tales como vimentina, desmina, citoqueratinas, proteína ácida glial fibrilar y neurofilamentos. La acetona altera la preservación morfológica pero conserva muy bien los antígenos de superficie celular.

*Aldehídos.* El más comúnmente utilizado es el formaldehído y el glutaraldehído, ambos fijadores tienen enlaces covalentes con los grupos amino de las proteínas.

*Formaldehído.* El formaldehído puede ser combinado con otros ácidos como, el ácido pícrico, lo cual mejora la fijación de proteínas básicas y de histonas, o con ácido peryódico (los grupos de carbohidrato son oxidados para el aldehído) y complejo polimérico de lisina y formaldehído <sup>(3)</sup>.

*Glutaraldehído.* La preservación ultraestructural es mucho mejor con el glutaraldehído, por que sus dos grupos aldehídos proveen enlaces fuertes. Sin embargo la penetración al tejido es mínima (p.e. 0.35 mm/hr. in vivo). En contraste con el formaldehído forma un enlace débil, pero la penetración es más rápida, ya que contiene un sólo grupo aldehído, ocasionando alteración de la antigenicidad. La combinación de estos dos aldehídos maximiza la preservación ultraestructural y retención de la antigenicidad natural.

*Paraformaldehído.* Se utiliza en casos especiales, en general proporciona buenos resultados inmunohistoquímicos. Para los tejidos incluidos en plástico puede ser eficaz la fijación en paraformaldehído vehiculado en buffer cacodilato 0.1 M (pH 7.2) con cloruro cálcico 50 Mm. Para la identificación de enzimas y proteínas de gran tamaño se recomienda el paraformaldehído al 4%, ya sea solo o con glutaraldehído al 50 por 100 en buffer fosfato 0.1 M (pH 7.2 a 7.4) <sup>(4)</sup>.

*Osmio.* El tetraóxido de osmio es un compuesto tetrapolar que interactua con los lípidos y proteínas por medio de quelación en múltiples sitios. Causa gran alteración de la antigenicidad debido al cambio de la forma nativa de estas moléculas, permitiendo múltiples uniones cruzadas, así como corte de las proteínas.

*Compuestos de mercurio.* Microscópicamente las sales de mercurio proveen buena fijación, pero con mala conservación de la estructura celular, con retención de antigenicidad, por que el cloruro de mercurio penetra al tejido lentamente. Muchas veces es combinado con otro fijador.

1. B5. Es una mezcla de formalina y cloruro mercúrico, neutralizado con acetato de sodio.
2. Zenker's. Es una solución de cloruro de mercurio, dicromato de potasio y ácido acético, el mercurio negro precipitado puede ser removido, ya que, puede confundir la interpretación de la inmunotinción <sup>(1)</sup>.

En el diagnóstico, la eficiencia y la preservación de la ligera morfología microscópica son consideraciones dominantes. Por lo tanto el formaldehído es el fijador más común.

El formaldehído es el fijador más comúnmente utilizado para fines diagnósticos, ya que es eficaz en preservar la morfología microscópica de los tejidos. Sin embargo cuando el objetivo es la localización precisa de antígenos, se usa un fijador especial y el método de fijación debe ser cuidadosamente evaluado.

## INCLUSION

Los medios de inclusión y las condiciones de la inclusión intervienen considerablemente en la alteración de la antigenicidad. El método habitual de inclusión, tanto en parafina como en algunas de las resinas sintéticas, puede afectar a los resultados inmunohistoquímicos. El uso de acetona en lugar de etanol y el de cloroformo o benzoato de metileno en lugar del xileno mejoran notablemente la inmunotinción. Los métodos más comunes de inclusión son los siguientes:

*Congelación.* El método de inclusión por congelación provee suficiente rigidez estructural del tejido que facilita los cortes del mismo. Una ventajas sobre los otros medio de inclusión es que provoca una mínima alteración de la antigenicidad.

*Parafina.* La parafina son compuestos de hidrocarburos. Las principales ventajas de la parafina son: facilita el corte en muchas secciones y no causa una alteración significativa de la antigenicidad.

*Plásticos.* Son metacrilatos y resinas epóxicas, causan profundo efecto en la antigenicidad, el uso de metacrilato de glicol favorece a la retención de la antigenicidad natural

En cuanto al medio de inclusión, la tinción inespecífica de fondo es mayor en el material embebido en parafina que en las secciones por congelado.

#### DECALCIFICACION

La inmunorreactividad de las inmunoglobulinas, polipéptidos, hormonas, filamentos intermedios, antígenos tumorales y proteína S-100 se conserva bien tras la aplicación de algunos procedimientos rutinarios de decalcificación (EDTA 0.5 M, ácido acético acuoso al 10% o ácido fórmico al 5%) <sup>(10)</sup>.

#### PRETRATAMIENTO DEL TEJIDO.

La secuencia antigénica constituida por múltiples antígenos diferentes es detectada más fácilmente que un solo epitope. La sensibilidad puede ser aumentada por exposición de mayor números de sitios antigenicos, a través de enzimas digestivas. La antigenicidad es alterada por la fijación, pero puede ser restablecida parcialmente dependiendo del antígeno en particular incubándolo en las siguientes soluciones proteicas:

1. Tripsina. Incubar al 0.1 % una solución de tripsina, en 0.05 de solución buffer de Tris-HCL con 0.1 % CaCl<sub>2</sub> a pH 7.8 por 15 minutos.
2. DNasa. Incubar con varias gotas 5mg/ml de solución de DNasa en 0.05 M Tris HCL buffer con 0.1 M de MgSO<sub>4</sub> a pH 7.4
3. Pronasa. Incubar en una solución de 0.12 -0.25 mg/ml de pronasa a 37°] por 1 hora o en 0.1 % de pronasa en 0.5 de solución buffer de Tris HCL pH 7.5 por 2 horas en tejidos con hidroxietil-metacrilato.
4. Pepsina Incubar 4mg/ml pepsina en 0.0 N HCL, a 37°C.
5. Papaína. Incubar papaína al 0.1 % en 0.05N Tris HCL a pH 7.5, por 2 horas a 37 °C.
6. Proteína V. Fijar con xilol la porción de glicol metacrilato del tejido para incubar en 0.25 mg/ml la proteína V a pH 7.4, por dos horas.
7. Guanidina o urea. La antigenicidad puede ser restablecida por desnaturalización en una solución 6M de guanidina o urea en 0.1 M Tris-HCL buffer a pH10.2, durante la noche.

Nota: el tiempo de incubación para las soluciones proteicas podría requerir un incremento, para fijar el tejido por un tiempo prolongado o sumergirlo en glicol metacrilato. Ejemplo. Fijar un tejido por 6 semanas en formaldehído requerirá incubarlo por arriba de 2 horas.

#### BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA ENDOGENA

Algunas enzimas utilizadas como trazadores del marcaje, se encuentran en los tejidos normales a examinar, por lo que debe inhibirse su actividad endógena antes de la inmunotinción; de no ser así, la enzima endógena reaccionará con el substrato empleado para localizar la enzima marcadora, dando lugar a falso-positivo.

La peroxidasa y otras sustancias que originan reacciones similares a ella (como la hemoglobina), se encuentran en tejidos normales y en tumores; se encuentran principalmente en leucocitos y hematíes. El método más empleado para inhibir la actividad endógena de la peroxidasa es la incubación de las secciones, antes del procedimiento inmunológico, con metanol absoluto al que se añade peróxido de hidrógeno (metanol absoluto que contenga agua oxigenada al 0.3 %, durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente).

La actividad de la fosfatasa alcalina, a excepción de la de tipo intestinal, puede bloquearse con levamisol 1nM. La fosfatasa alcalina de tipo intestinal es sensible al tratamiento con ácido acético al 20 %, peróxido de hidrógeno al 0.3 % y al ácido peryódico al 2.5 %.

La glucosa óxidasa y otras enzimas como la alfa-2-galactosidasa no tienen actividad en los tejidos humanos.

## BLOQUEO DE TINCION DE FONDO

En las técnicas de inmunohistoquímica, la tinción de fondo o **background** puede ser específica o inespecífica. La tinción de fondo específica es debida a varias causas.

1. A la presencia del antígeno objeto de estudio en lugares distintos a aquel en que se quiere detectar.
2. A la existencia en el antisuero primario de anticuerpos frente a antígenos distintos al que quiere determinarse.
3. Al atrapamiento pasivo del antígeno o a su difusión a lugares donde habitualmente no se encuentra.

La causa más frecuente de tinción de fondo inespecífica es la unión no inmunológica del anticuerpo a ciertos componentes de los tejidos, sobre todo colágena y reticulina, debido a fuerzas hidrófobas y electrostáticas. Por lo común es el anticuerpo primario el que proporciona los niveles más altos de tinción de fondo inespecífica. La tinción de fondo inespecífica puede reducirse usando el anticuerpo primario en diluciones muy altas, añadiendo grandes concentraciones de sal (25% de NaCl) al amortiguador, empleando de preferencia. Por ejemplo, al Tris buffer se le agrega un detergente tal como el Tritón X-100. La digestión enzimática, reduce igualmente la tinción de fondo inespecífica.

La coloración de fondo puede reducirse bloqueando los lugares con afinidad no inmune por las inmunoglobulinas

## CONTROLES

Una tinción inmunohistoquímica es específica si se demuestra lo siguiente:

1. No ocurre tinción si se omite el anticuerpo primario.
2. Se inhibe la tinción si se adsorbe el anticuerpo primario con el antígeno frente al cual se ha obtenido, pero no con otros antígenos.

Controles que se deben realizar para un buen desarrollo de la técnica:

*Control negativo.* Se omite el anticuerpo primario o se sustituye por suero no inmune o buffer, utilizando el mismo tejido que para el control positivo.

*Control positivo.* Se utiliza una sección de tejido del que se tenga certeza absoluta de que contiene el antígeno por determinar.

*Control de adsorción.* El control negativo ideal consiste en demostrar que desaparece la inmunoreactividad si el antígeno primario es preadsorbido por el antígeno, pero no si es preadsorbido por moléculas similares.

#### *Causas de falsos-negativos*

1. Enmascaramiento de los antígenos.
2. Desnaturalización de los antígenos por calor, lo que impide que los anticuerpos los reconozcan.

#### *Causas de falso-positivos*

1. Presencia de peróxidasa endógena, por una mala inhibición.
2. Reacciones cruzadas inespecíficas entre antígenos y anticuerpos <sup>(4)</sup>.

## 6. PRODUCCION DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos producidos en empresas comerciales, ofrecen una entrega eficaz y es predecible aprovechar la habilidad del amplio rango de anticuerpos. Una de las desventajas es la incertidumbre particular que poseen los anticuerpos en la habilidad y especificidad de detectar antígenos en tejidos procesados y fijados de diferente manera.

Las empresas comerciales en ocasiones no incluyen información detallada acerca de las especificaciones del anticuerpo que ellos proporcionan, en contraste a los anticuerpos producidos y purificados en los laboratorios de investigación. Esta información detallada del anticuerpo es importante tenerla en consideración cuando existen fallas en el proceso de inmunotinción o cuando existan resultados inesperados.

### ANTICUERPOS POLICLONALES

La inmunización adecuada de un animal produce una variedad de anticuerpos con diferente especificidad y afinidad. El antisuero policlonal consta de una mezcla de anticuerpos dirigidos contra varios epitopes del antígeno y contra cualquier otra molécula en la preparación de inmunización, es decir contra inmunoglobulinas del animal inmunizado. Los anticuerpos policlones se obtienen más rápido y fácilmente que los anticuerpos monoclonales. Una desventaja significativa es la amplia heterogenicidad de anticuerpos. Para minimizar la contaminación del anticuerpo, el inmunógeno debe ser lo más puro posible.

### ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para obtener anticuerpos específicos puros de un antígeno determinado consiste en producir anticuerpos monoclonales mediante el cultivo de células. La producción se puede mantener indefinidamente generando una clona inmortal de células productoras de un único anticuerpo con una especificidad bien definida. Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas que provienen de una clona de células híbridas<sup>(6)</sup>.

La mayoría de los anticuerpos monoclonales se obtienen mediante la fusión de esplenocitos de ratón con una célula B de mieloma de ratones de la misma cepa, que no secrete anticuerpos (fig. 1). También es posible producir células híbridas entre cepas diferentes e incluso entre especies diferentes, pero estos híbridos suelen ser inestables.

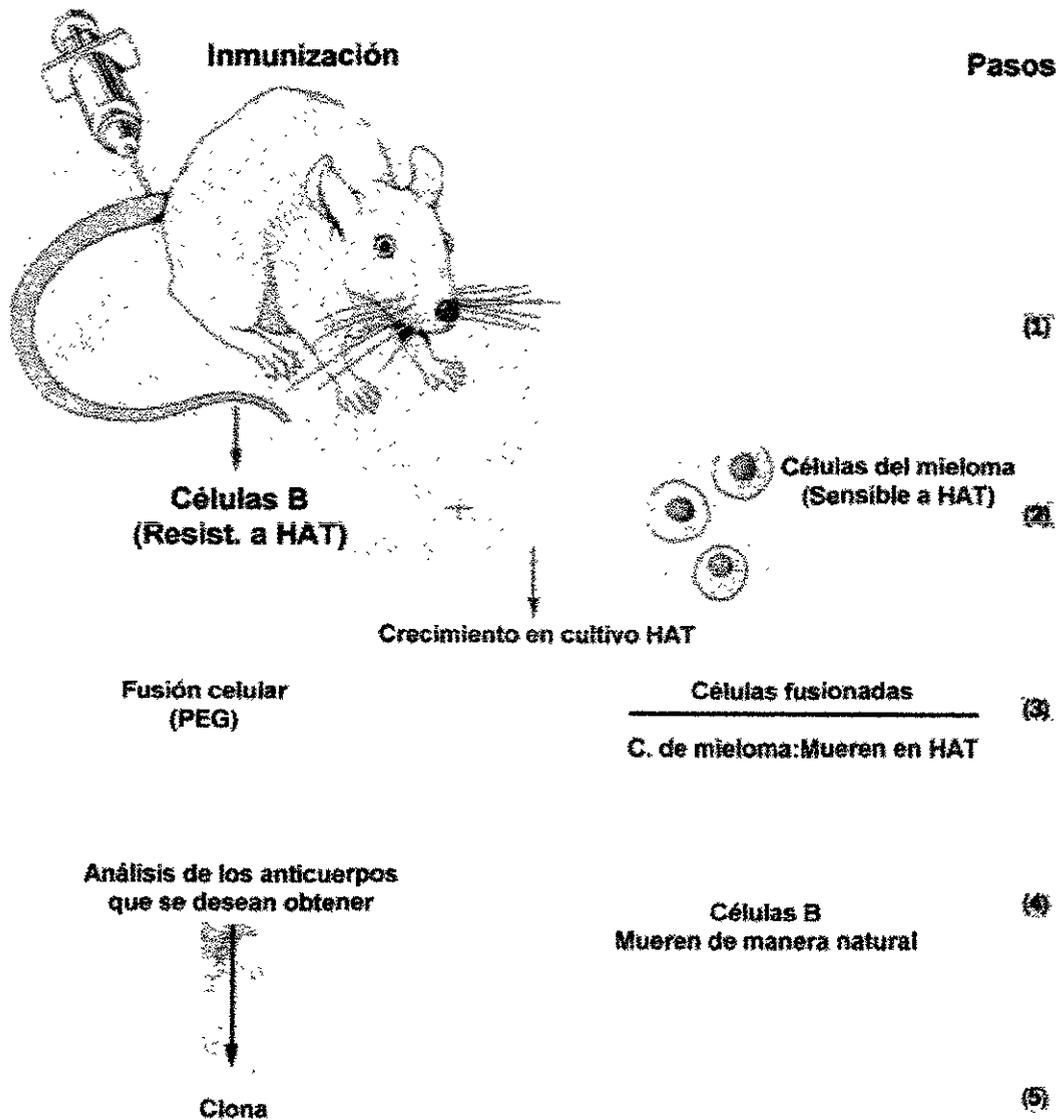


Figura 5

Ventaja de los anticuerpos monoclonales sobre los anticuerpos policlonales:

1. Monoespecificidad (reconoce a un solo epítopo)
2. Inmortalidad. Debido a la fusión de una clona de células plasmáticas productoras de IgG y la progenie de células del mieloma múltiple, la cual genera células híbridas capaces de proliferar y producir el anticuerpo indefinido.

A continuación se mencionarán los pasos para la obtención de anticuerpos monoclonales (fig 1):

1. Se inmunizan animales (generalmente ratones o ratas) con un antígeno.
2. Se fusionan las membranas de las células de bazo (ratón) con una línea celular de mieloma mediante la adición de polietilenglicol (PEG).
3. La mezcla obtenida tras el procedimiento de fusión se inocula en un medio de cultivo que contenga "HAT". HAT es una mezcla de hipoxantina, aminopterina y timidina. La aminopterina es una potente toxina que bloquea una importante vía metabólica. Esta vía puede ser eludida a través de otra vía de derivación si se aporta a las células hipoxantina y timidina. El inóculo contiene células de bazo, células de mieloma y células fusionadas. Las células de bazo mueren de forma natural en el medio de cultivo transcurridas una a dos semanas, mientras que las células de mieloma son destruidas por el HAT. Las células fusionadas sobreviven, ya que están dotadas de la inmortalidad propia de las células de mieloma y, al mismo tiempo, de la vía metabólica de derivación de las células de bazo.
4. Todos los crecimientos celulares son analizados para detectar la presencia del anticuerpo que se pretende obtener; si el resultado es positivo, son clonadas mediante cultivo en placas de tal manera que se pueda separar cada uno de los clones.
5. Así obtienen clones procedentes de una única célula progenitora que son inmortales y producen un anticuerpo monoclonal.

## **7. APLICACIÓN DIAGNOSTICA**

Tal y como se ha expuesto anteriormente, mediante los métodos inmunohistoquímicos se pueden demostrar antígenos localizados en la membrana celular, núcleo, matriz extracelular, etc. El anatomopatólogo cuenta hoy en día con una serie de marcadores inmunohistoquímicos que son de gran ayuda en el diagnóstico patológico. Muchos de estos se emplean sobre todo en el campo de la investigación (Tabla 1).

TABLA 1. MARCADORES MAS USADOS EN PATOLOGIA

Marcador	Tejidos que lo expresan en condiciones normales	Aplicación diagnóstica
Actina	Tejido muscular	Rabdomiosarcomas bien diferenciados
Citoqueratina	Comprende 19 variedades separadas: Tipo I: (ácidas 10-19) epitelios simples Tipo II: (básicas 1-9) epitelios estratificados Tipo I y Tipo II: epitelio transicional de vejiga y pseudo-estratificado pulmonar	Diferenciación epitelial (endodérmico, neuroectodérmico, mesodérmico y germinal). Carcinoma epidermoide, carcinoma faríngeo, adenocarcinomas y carcinoma de células acinares (glándulas salivales).
Desmina	Células maduras del músculo estriado (esquelético y cardíaco) y en músculo liso no vascular.	Tumores musculares estriados Sarcoma alveolar de partes blandas leiomioma y leiomiosarcoma.
Vimentina	Presente en elementos de origen mesenquimatoso (fibroblastos, osteocitos, osteoblastos, condrocitos, y células endoteliales).	Identificación de tumores óseos, linfomas, carcinoma epidermoides, mesotelioma, ameloblastoma y adenoma pleomorfo.
Proteína ácido glio-fibrilar	Presente en el área perinuclear y en los procesos citoplasmáticos de los astrocitos, glia de Bergmann, glia radial (cerebro fetal), y en las células ependimarias y oligodendrogliares.	Gliomas, astrocitomas, adenoma de hipófisis. Identificación de adenoma pleomorfo de glándulas salivales.
Proteína S-100	Proteína específica de las células de Schwann, melanocitos, células de Langerhans y condrocitos.	Diferenciación entre melanoma amelanótico, linfomas y carcinomas. Diferenciación entre melanoma de células fusiformes, carcinoma de células fusiformes e histiocitoma fibroso maligno.
Antígeno epitelial de membrana (EMA)	Proteína aislada de la secreción láctea humana. Localizada en la membrana celular y en el borde apical de la mayor parte de las células epiteliales glandulares.	Identificación de adenocarcinoma (glándulas salivales) Carcinoma epidermoide, carcinoma indiferenciado de pulmón
Antígeno leucocitario común (LCA)	Glicoproteína de membrana característica de los leucocitos (CD45).	Identificación de linfomas. Excepto el linfoma de Hodgkin
Antígeno carcinoembrionario (CEA)	Glicoproteína abundante durante el desarrollo fetal. Localizada en el borde y glucocálix de las células epiteliales (mucosecretoras fetales).	Identificación de adenocarcinomas (glándulas salivales), carcinoma epidermoide, carcinoma de células pequeñas.
HMB-45	Marcador específico, presente en los nevus pigmentocelulares, y en todos los casos de melanocarcinoma.	Diferenciación con tumores indiferenciados metastásicos
Neurofilamentos	Elementos principales de las neuronas.	Neoplasias de origen neural o con diferenciación neuronal: ganglioneuromas, neuroblastomas, meduloblastomas, etc.

## **8. CONCLUSIONES**

La inmunohistoquímica es un método auxiliar en la investigación, ya que nos ayuda a resolver los problemas en el diagnóstico patológico. Además las técnicas inmunohistoquímicas tienen un papel esencial en la elaboración de un plan de tratamiento adecuado y específico de cada padecimiento.

A pesar de que la inmunohistoquímica nos ayuda a determinar la expresión de un antígeno específico, existen muchos factores que influyen en la obtención de resultados confiables, como son: la fijación del tejido, el proceso de inclusión, la naturaleza del antígeno, el anticuerpo empleado (concentración, especificidad y sensibilidad) y el sistema de detección utilizado. La distribución del antígeno dentro de un tejido condiciona la elección del sistema de detección.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Lawrence D. True. **Atlas of Diagnostic Immunohistopathology**, Lippincott Company, 1990. Pag. 1.2-1.31, 2.1-2.9.
2. Elías J M. **Immunohistopathology a Practical Approach to Diagnosis**. ASCP. Press, 1990, pag. 115-120.
3. Anderson's Patology. **Immunohistochemistry and Related Markin Techniques**. Tenth Ed. Volumen 1, 1996, pag. 95.
4. Raimundo García del moral. **Laboratorio de Anatomía Patológica**, 1ª edición, Interamericana McGraw-Hill, 1993, pag. 328,329,334-367,508-518.
5. Daniel. P. Stites et.al. **Inmunología Básica y Clínica**, 8ª edición, Manual Moderno, S.A de C.V, México, D.F. 1996, pag224-230.
6. Ivan Roitt. **Inmunología**, 4ª edición, Harcourt BRACE, 1997, pag. 28.1-28.9.
7. Shauna C. Anderson, Ph.D. **Química Clínica**, Interamericana. McGraw-Hill, México, 1993, pag. 95.
8. Finn Geneser, **Histología**, 2ª edición, Panamericana. S.A., México 1996, pag. 49-51.
9. José M. González de Buitrago. **Tecnología y Métodos de Laboratorio Clínico**, Salvat, México, D.F., 1992, pag. 329-331.
10. Oscar Rojas-Espinosa. **Inmunología**, 1ª edición, Medica Panamericana, México, D.F., 1996, pag. 108-110.
11. Roberk Murray **Bioquímica de Harper**, 21ª edición, Manual moderno., S.A de C.V., México, D.F., 1990, pag. 584, 586, 626.
12. JamesT. Barret. **Introducción a la Inmunoquímica y la Inmunobiología**, Interamericana S.A de C.V. México, D.F, 1989, pag. 11-13.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA