



55

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“MANUAL DE TÉCNICAS
INMUNOHISTOQUÍMICAS PARA
DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA”**

280304

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

NÉSTOR ISRAEL ROMERO GUTIÉRREZ

ASESOR: M. V. Z. GERMÁN ISAURO GARRIDO FARIÑA

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



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).

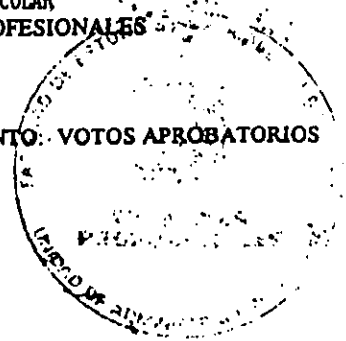
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Manual de Técnicas Inmunohistoquímicas para Diagnóstico e
Investigación en Medicina Veterinaria y Zootecnia"

que presenta el pasante: Néstor Israel Romero Gutiérrez
con número de cuenta: 9460683-4 para obtener el TÍTULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de enero de 2000

PRESIDENTE	<u>MSc. Raúl A. Mar Cruz</u>	
VOCAL	<u>MYZ. Víctor Leyva Grado</u>	
SECRETARIO	<u>MYZ Germán Isauro Garrido Farfán</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MYZ. Francisco Morales Alvarez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MYZ. Sergio Waldo Tello</u>	

DEDICATORIA

Para mi familia que siempre ha sido y seguirá siendo un gran apoyo en las realizaciones de mis metas.
Gracias papas y hermanas por ese apoyo y confianza que siempre me han brindado.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor de tesis M.V.Z. Germán Garrido Fariña, quién me ayudó a realizar este trabajo.

A la UNAM. Que me dio la oportunidad de estudiar una licenciatura, esperando pronto se resuelvan los problemas que actualmente enfrenta.

En general doy las gracias a todos mis profesores de la UNAM; quienes con su paciencia y sabiduría supieron transmitirme sus conocimientos.

A todos los académicos del Hospital Veterinario de Toluca, por su confianza, por creer en mí y compartir sus conocimientos.

¡MIL GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE.

RESUMEN	1
OBJETIVOS DE LA TESIS	3
MATERIAL Y METODO	4
INTRODUCCIÓN	5
• Clasificación de la Inmunidad	6
• Anatomía del sistema inmune	7
• Células que participan en las reacciones inmunitarias	9
• Inmunoglobulinas	17
• Regulación de la respuesta inmunitaria	20
• Mediciones de la respuesta inmunitaria humoral	21
• Historia de la inmunohistoquímica	23
• INMUNOHISTOQUÍMICA	24
Clasificación de los métodos inmunohistoquímicos	26
Consideraciones de la inmunohistoquímica	27
Técnicas inmunohistoquímicas:	
Método directo de anticuerpos fluorescentes	30
Método indirecto de anticuerpos fluorescentes	33
Método ABC (Complejo Avidina-Biotina)	35
Método de fosfatasa alcalina	38
Método de Inmunoperoxidasa	41
Método de la proteína A del Staphylococcus (SpA)	44
Anticuerpos:	
Endoteliales	46
Epiteliales	47
Específicos	47
Filamentos intermedios	48
Hematopoyéticos	51
Hormonales	55
Inmunoglobulinas	57
Microorganismos	57
Neoplasias, asociados a	58
Neuroendócrinos	59
Neuronales	59

	Oncogenes	60
	Proteínas asociadas al ciclo celular	62
	Proteínas extracelulares	62
	Receptores Hormonales	63
RECOMENDACIONES		64
APÉNDICE		65
REFERENCIAS		69

RESUMEN.

Hoy en día el conocimiento de la inmunología se ha hecho imprescindible para la comprensión completa de muchas enfermedades. El empleo de cultivos celulares y microcirugía han proporcionado información de la célula. Las células pueden observarse directamente in vivo o después de la fijación. La observación in vivo se facilita por el uso de colorantes. La citoquímica consiste en la identificación y localización de los componentes químicos de la célula. Como puntualizara R.R. Bensley, uno de los fundadores de la citología moderna.- "la finalidad de la citoquímica es la de descubrir, dentro de los exiguos confines de la célula, esa organización química tan misteriosa y fugaz que es la base de la vida". Un sistema inmunitario funcionalmente normal supone una defensa activa frente a elementos extraños, tales como agentes microbianos patógenos, macromoléculas tóxicas y hasta cierto punto, células del propio organismo que hayan experimentado transformación neoplásica. La inmunohistoquímica se basa en la detección de antígenos mediante anticuerpos. Los antígenos son en general, moléculas celulares como las proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos que al ser inyectados en otro animal activan los linfocitos y producen anticuerpos específicos. Una molécula pequeña llamada hapteno cuando es acoplada a una molécula más grande también puede comportarse como un antígeno y así estimular a la elaboración de anticuerpos. Cada anticuerpo esta compuesto por polipéptidos, dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas, y la especificidad para las determinantes antigénicas depende de la variabilidad de la secuencia de aminoácidos en el sitio de unión. La inmunohistoquímica tiene dos métodos.- a) **Métodos directos:** Son aquellos en el que el anticuerpo intreractúa con el antígeno tisular. En los años 50 Alberto Coons conjugó IgG con un colorante fluorescente como la fluoresceína, lo que permitió la detección directa del complejo en el tejido por medio del microscopio de fluorescencia. Hay otros métodos directos como el de ferritina, además de los métodos que utilizan enzimas como peroxidasa y b) **Métodos indirectos:** Puesto que, en general, los métodos directos tienen baja sensibilidad, la interacción antígeno-anticuerpo se amplifica mediante la introducción de un segundo

anticuerpo marcado. Esta segunda interacción puede observarse por fluorescencia, radioautografía o microscopía electrónica. La patología quirúrgica tiene su base de trabajo en la morfología, sin embargo existen estructuras que nos son visibles en la microscopía óptica convencional, por lo que se ha recurrido a diversas técnicas para ampliar el espectro de la visión del patólogo a través del microscopio óptico. La histoquímica y ahora la inmunohistoquímica permiten demostrar y observar estructuras con mayor facilidad, disminuyendo el grado de subjetividad y optimizando el trabajo que desarrolla el patólogo. El presente trabajo se enfoca a presentar el procedimiento de técnicas inmunocitoquímicas dirigido a investigación y diagnóstico, esperando que la información contenida sirva como referencia para el desarrollo de técnicas individuales que permitan optimizar el trabajo del lector. La introducción que contiene el escrito se espera que sirva como material de apoyo para los alumnos de la materia de Inmunología Veterinaria y materias relacionadas con el área, tratando de mostrar un resumen básico de la producción de anticuerpos.

OBJETIVOS DE LA TESIS.

- **Proporcionar la metodología y el soporte teórico básico necesarios para realizar las principales técnicas de inmunohistoquímica.**
- **Recopilar información reciente sobre el método de realización de las pruebas inmunohistoquímicas para familiarizar a estudiantes de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como a técnicos y profesionales interesados.**
- **Presentar la importancia de las pruebas inmunohistoquímicas como herramienta de trabajo para la detección de estructuras que normalmente no se encuentran con técnicas convencionales.**

MATERIAL.

1. Libros.
2. Revistas.
3. Memorias.
4. Computadora.
5. Cámara fotográfica.

MÉTODO.

Se realizó una recopilación bibliográfica sobre el tema, la cual fue interpretada y procesada para obtener un escrito que fuera de lo general a lo particular con el fin de proporcionar la información básica para la comprensión y el desarrollo de algunas pruebas inmunocitoquímicas.

INTRODUCCIÓN.

INMUNOLOGÍA, una palabra ignorada mucho tiempo por el gran público hasta principios de 1980, cuando aparece una nueva enfermedad caracterizada por fiebre, infecciones, problemas cutáneos, adelgazamiento y con una evolución trágica (SIDA), el que proyecta a un primer plano términos tan ajenos como "linfocitos CD4", "seropositividad", nos recuerda que existen anticuerpos y demuestra que una "deficiencia inmune" es fatal y exige que se sepa todo sobre inmunología para llegar lo antes posible a diagnósticos y tratamientos eficaces (45).

La ciencia de la inmunología es relativamente de reciente aparición. Edward Jenner (1779-1823) fue el primero en establecer una metodología para inmunizar a los humanos contra la viruela; unos años mas tarde, Louis Pasteur (1822-1895) establece los fundamentos científicos de la inmunización al utilizar microorganismos atenuados. El término inmune (del latín *immunis*), que se refería a los individuos que estaban exentos de gravámenes, fue adoptado para señalar que una persona o animal no podía volver a sufrir nuevamente una enfermedad. De esta manera la inmunología se desarrolló alrededor de la posibilidad de proteger al huésped por medio de vacunas o antisueros, a humanos y animales de la invasión de microorganismos externos (agentes infecciosos, químicos y cualquier sustancia extraña para el huésped) que causan la enfermedad del individuo. En las últimas décadas, este concepto ha sido modificado por los inmunólogos al encontrar que los mismos recursos que utiliza el organismo para protegerse de los agentes externos también los usa para mantener el orden celular interno. Para que se ejerzan esas diferentes actividades, es necesario que exista en el organismo un sistema biológico capaz, no solo de discriminar *lo propio* de *lo ajeno*, sino también *lo normal* de *lo anormal* (6,9,10,14,19,42,44).

Este sistema ha de conservar la memoria de sus conocimientos y de sus encuentros. Asimismo, ha de seleccionar las informaciones que recibe, memorizarlas, decidir las acciones que se deban realizar o no en

todos los puntos del organismo. Estas acciones tendrán que discernir la existencia o la ausencia de peligro. Tal sistema de informaciones, de almacenamiento, de memoria y de acciones no está localizado en ningún órgano, no tiene centro ni periferia, está en continuo movimiento en el cuerpo. Se denomina *Sistema inmune* (4,5,17,28).

Hoy en día el conocimiento de la inmunología se ha hecho imprescindible para la comprensión completa de muchas enfermedades. No solo es preciso conocer cada vez más el amplio abanico de procesos en los que subyacen mecanismos inmunológicos, sino que también se necesita información sobre las células del sistema inmunitario, sus interacciones y sus mecanismos efectores (1,28).

CLASIFICACIÓN DE LA INMUNIDAD.

Se denomina inmunidad a todos aquellos procesos fisiológicos que hacen capaz a un animal de reconocer sustancias extrañas, ya sean propias o externas, y de eliminarlas, neutralizarlas o metabolizarlas. La inmunidad se ha dividido de la siguiente manera:

1. Inmunidad natural o innata.- Comprende todas aquellas defensas inespecíficas con las que cuenta un individuo en forma espontánea; no depende de una previa exposición a un agente extraño y prevalece bajo cualquier circunstancia.
2. Inmunidad adquirida.- Depende de la exposición previa del organismo a un agente extraño y del subsecuente reconocimiento y respuesta hacia éste, es una respuesta específica. La inmunidad adquirida puede ser natural activa, natural pasiva, artificial activa y artificial pasiva (4,5,28).
 - Natural activa.- Puede ser temporal o duradera, y ocurre después que el individuo sufrió una infección.
 - Natural pasiva.- Es temporal y se refiere al paso de anticuerpos de la madre al producto.
 - Artificial activa.- Es variable en su duración y ocurre después de la vacunación.

- **Artificial pasiva.**- Es temporal y ocurre cuando se aplica suero hiperinmune, en donde los anticuerpos fueron formados en otro animal (28).

ANATOMÍA DEL SISTEMA INMUNE.

El sistema inmune en conjunto se conoce como Sistema Retículo Endotelial (SRE) y esta formado por los órganos y tejidos con capacidad fagocítica; también se le conoce como sistema linforetículo-plasmocitario.

Los órganos linfáticos se han dividido por su estructura, función, dependencia de la estimulación antigénica y tipos de células que residen, en:

1. Órganos linfáticos primarios.
2. Órganos linfáticos secundarios.
3. Órganos linfáticos terciarios.

Los órganos linfáticos primarios se caracterizan por ser linfoepiteliales, desarrollarse en forma independiente del estímulo antigénico e involucionar en la pubertad por efecto de los sexicorticosteroides. En las aves los órganos linfáticos primarios son la Bursa o Bolsa de Fabricio para los linfocitos B, y el Timo para los linfocitos T (17,25,28).

En el caso de los mamíferos, los órganos linfáticos primarios son la médula ósea para los linfocitos B y el Timo para los linfocitos T. En particular para los rumiantes se ha observado que las placas del tejido subepitelial del intestino pueden funcionar como órganos linfáticos primarios para los linfocitos B (17,25,28).

La maduración de la médula ósea se realiza del borde donde se encuentran las células precursoras hacia el centro donde se congregan los linfocitos B maduros. El Timo es un órgano linfoepitelial que se

encuentra en el pecho a nivel del mediastino anterior; está formado por lobulillos que a su vez están divididos en corteza y médula (25).

Los órganos linfáticos secundarios, estructuralmente son linforeticulares, están constituidos por una cápsula, corteza y médula. Su funcionalidad y el número de células dependen de la estimulación antigénica; están representados básicamente por los linfonodos y el bazo (17,25).

Los linfonodos son importantes, porque se encuentran distribuidos estratégicamente en todo el organismo para filtrar la linfa, con la linfa reciben a través de los vasos aferentes que son vertidos en la corteza: antígenos, complejos inmunes, células en "velo" (células presentadoras de antígeno "CPA") y en general macrófagos y linfocitos provenientes de zonas inflamadas (25,28).

En la corteza del linfonodo se localizan los folículos o centros germinales que son cúmulos de linfocitos B y por esta razón a la corteza se le conoce como zona B; por debajo de la corteza se encuentran las células dendríticas. En la médula se localizan los linfocitos T, por esta razón se le conoce como zona T (25).

Las células dendríticas son importantes como CPA para los linfocitos T en las respuestas primarias, también funcionan como reservorios de antígeno y son fundamentales para la preservación de la memoria inmunológica; al estimular constantemente en forma moderada a los linfocitos T de memoria (17,25,18).

Los linfonodos además de recibir linfocitos por los vasos linfáticos aferentes, también los reciben vía sanguínea mediante la capilarización del vaso hemático a nivel de la corteza, en este sitio tiene un endotelio cuboidal por lo que se le conoce como vénula con endotelio alto (VEA). Las VEA son importantes, ya que expresan moléculas de adhesión específicas (adhesinas) que son reconocidas por los linfocitos de memoria en el proceso conocido como ecotaxia; que permite el regreso

de los linfocitos al sitio donde fueron inicialmente estimulados (6,17,25,28).

Al interactuar las moléculas de adhesión del endotelio con las selectinas o receptores de ecotaxia de los linfocitos; éstos se unen a la célula endotelial y mediante el proceso conocido como emperipoyesis, pasan de la luz del vaso sanguíneo atravesando el citoplasma de la célula endotelial cuboidal hacia el parénquima del linfonodo (25).

El bazo es otro órgano linfático secundario, está constituido por: pulpa blanca, zona marginal y pulpa roja. La pulpa blanca tiene una zona periarterial rica en linfocitos T, la zona periférica y los folículos son ricos en linfocitos B. Los cordones de Billroth están formados por células reticulares y macrófagos que capturan y eliminan partículas extrañas y eritrocitos viejos, proceso conocido como hemocateresis. La zona marginal es importante por su captura de partículas circulantes y el ingreso de linfocitos circulantes al parénquima del bazo (17,25).

Los órganos linfáticos secundarios son importantes porque reúnen las características microambientales y celulares, para que se realicen eficientemente todas las interacciones celulares para la inducción de la respuesta inmune (6,17,25).

Los órganos linfáticos terciarios son la piel, el intestino y el pulmón; se caracterizan porque hospedan principalmente a linfocitos de memoria (28).

CÉLULAS QUE PARTICIPAN EN LAS REACCIONES INMUNITARIAS.

La capacidad de la unidad molecular de fagocitar y utilizar nutrientes fue crítica para la supervivencia. A medida que se desarrollaron organismos más complejos, éstos pasaron a depender de la digestión extracelular para la energía, a la par que desarrollaban una población de células especializadas, con capacidad para internalizar

partículas; estas células fagocitarias constituían una defensa contra microorganismos invasores (30).

Sin función inmunitaria, la muerte por enfermedad infecciosa sería inevitable. Para conseguir la eliminación de un antígeno, el sistema inmune ha de reconocer las conformaciones moleculares extrañas y posteriormente, ha de llevar a cabo su eliminación. Para conseguir esto ha desarrollado sus funciones básicas: reconocimiento molecular, amplificación, memoria y una serie de mecanismos efectores (4,5,30).

La respuesta inmune la integran dos componentes importantes, uno relacionado con las respuestas inmunes inespecíficas y el otro con respuestas específicas (4,5,6,17). Las primeras se median a través de los sistemas fagocíticos y del complemento. El sistema fagocítico se compone de neutrófilos, monocitos y macrófagos que realizan la fagocitosis inespecífica, digestión y eliminación de antígenos del cuerpo. El sistema del complemento lo integran alrededor de 20 proteínas séricas distintas desde el punto de vista químico e inmunitario, que interactúan entre sí, con anticuerpos y membranas celulares. Estas interacciones generan varias actividades biológicas, como quimiotaxis o emigración direccional de neutrófilos, incremento de la fagocitosis y lisis de bacterias, virus, células infectadas por virus y células tumorales (17).

El componente específico de la respuesta inmune son los linfocitos. La parte específica del sistema inmunitario se divide en dos componentes distintos desde el punto de vista funcional: el sistema inmunitario humoral, integrado por linfocitos B, y el mediado por células compuesto por linfocitos T (17). Aunque las células más importantes en la inmunidad tienen origen linfoide, hay otras que también desempeñan un papel importante (4,45).

Células fagocitarias.

Macrófagos (fig. 1).

Los fagocitos mononucleares están distribuidos por todo el cuerpo. Incluyen tanto a los monocitos de la sangre como a los fagocitos

tisulares. Funcionan en la inmunidad específica e inespecífica. Su función primaria en esta última consiste en sacar y destruir las bacterias, células dañadas, células neoplásicas, material coloide y macromoléculas. La fagocitosis se estimula ante la presencia de anticuerpos y algunos componentes del complemento. Los macrófagos, además de sacar este material, también secretan sustancias importantes en las respuestas inmunitarias específicas, incluyendo componentes del complemento, lisozima, enzimas, interferón, interleucina 1 y prostaglandinas (4,5,17).

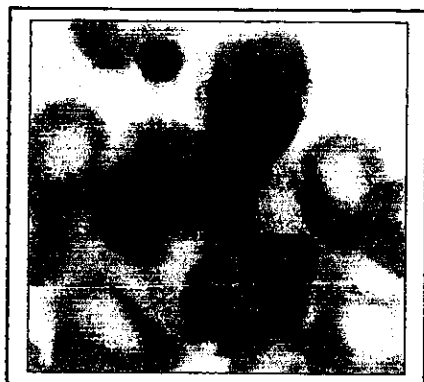


Fig. 1. Macrófago de un perro, observar la forma arriñonada del núcleo y su tamaño en comparación con un linfocito (tinción de Writte, 400x)

La característica más importante de los macrófagos es su capacidad para la pinocitosis de moléculas solubles y para la fagocitosis de partículas. Ciertos tipos poseen, además, la capacidad de procesar el material extraño y presentarlo a los linfocitos inmunocompetentes, también son capaces de responder a estímulos externos procedentes de linfocitos activados, siendo importantes células efectoras en las reacciones célulomediadas (4,5,45).

Los antígenos son degradados por enzimas lisosomales, una pequeña parte de éstos (aproximadamente 10%), sólo será degradado parcialmente, persistiendo en la membrana celular o en vacuolas especiales, inaccesibles a los lisosomas. Algunos antígenos no degradados pueden ser liberados de forma eventual, pero la mayoría son depositados en la membrana en estrecha proximidad a moléculas del sistema principal de histocompatibilidad. Tal asociación de moléculas facilita la señal

requerida para las células T para el reconocimiento efectivo de antígenos (antígeno de superficie asociado a proteína).

Los macrófagos sintetizan y secretan gran cantidad de sustancias, las cuales se agrupan en tres categorías:

1. Productos participantes en procesos defensivos, como los componentes del complemento y el interferón.
2. Enzimas capaces de afectar a proteínas extracelulares, importantes en la producción de inflamación, tales como hidrolasas, activadores de plasminógeno y colagenasa.
3. Factores que modulan la función de las células de su entorno. Tales como la Interleucina 1 ó Factor activador de linfocitos, factor activador de linfocitos B. También secreta otro factor que activa la médula ósea, para la producción de células inflamatorias (6,17).

La principal función de los macrófagos en la inmunidad específica es la presentación de antígenos. Las sustancias extrañas son digeridas y destruidas pero algún material permanece en la superficie que puede estar expuesta a los linfocitos reactivos. En virtud de que los macrófagos presentan actividad inmunitaria específica, a menudo constituyen el componente principal de algunas reacciones inflamatorias; en particular de aquellas que se relacionan con la inmunidad mediada por células (IMC) (17,25)

Neutrófilos (Fig. 2A - 2B) y Eosinófilos.

Metchnikoff (1901) fue el primero en describir la actividad fagocitaria del neutrófilo como similar a la motilidad y al proceso de alimentación de organismos monocelulares. Los neutrófilos funcionan en forma similar a macrófagos en la inmunidad inespecífica, en la que su principal acción es fagocítica con remoción y destrucción de sustancias extrañas. Los neutrófilos tienen poca función en la inmunidad específica excepto como participantes en la respuesta a una reacción inmunitaria (30,38)

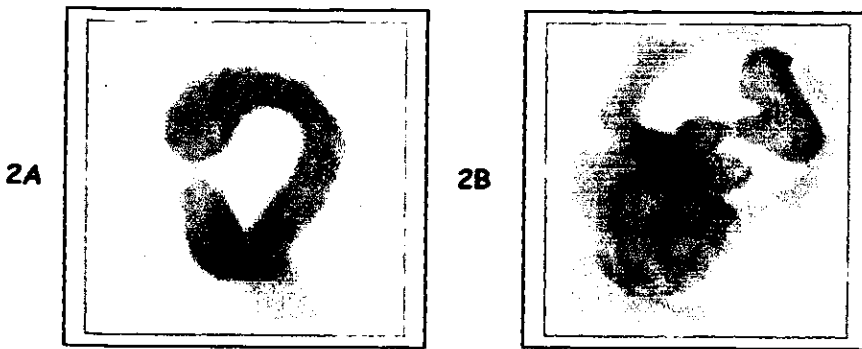


Fig. 2A Neutrófilo de perro en su forma juvenil con el núcleo en banda y **2B** neutrófilo de perro con su núcleo segmentado, indicativo de madurez aumentado 400 veces.

Los eosinófilos no tienen una función importante en la respuesta inmunitaria primaria, pero cumplen un papel importante en la neutralización de los efectos de los factores inflamatorios liberados por las células cebadas en una respuesta secundaria (30,38).

Células linfoides (Fig 3).

Son células que tienen la capacidad de reaccionar en forma específica con un antígeno y elaborar productos celulares. Su origen se remonta a las células pluripotenciales del saco vitelino, hígado y médula ósea en el feto y médula ósea del adulto. El sistema linfoide consta de dos compartimentos, uno central y otro periférico, el central está compuesto de médula ósea, timo y bolsa de Fabricio (en aves). El compartimento linfoide periférico incluye linfonodos, bazo y tejido linfático intestinal (17,28,38).



Fig. 3. Linfocito de perro, en una tinción de tipo Romanowsky es muy fácil confundirlo con metarrubricitos (400 x)

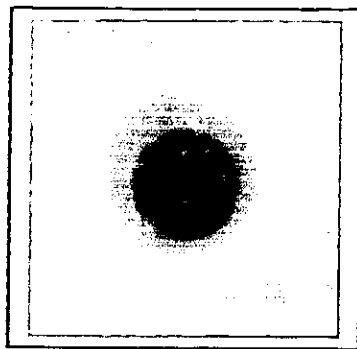


Fig. 4 Metarrubricito (forma inmadura de un eritrocito)

Existen dos tipos de linfocitos inmunorreactivos. Los linfocitos B son formados en médula ósea o su tejido equivalente en aves, y son las progenitoras de las células encargados de la producción de inmunoglobulinas para antígenos específicos después del estímulo antigénico. Las dos inmunoglobulinas principales que participan en la respuesta inmune sistémica son IgG e IgM. Cuando se presenta un antígeno ante la célula B apropiada en el nódulo linfático periférico, ésta se activa para dividirse y formar una gran población de células B con especificidad para el antígeno en particular (expansión clonal). La mayor parte de estas células B se transforman después en células plasmáticas, que producen y secretan inmunoglobulinas. Un pequeño número de células B no se diferencian en plasmáticas, pero persiste como células de memoria. A medida que el antígeno se aclara en la circulación, se detiene la expansión clonal y el título de los niveles de anticuerpos decae en forma lenta. Si el animal se expone a este antígeno particular una vez más, la célula de memoria reconoce que tuvo contacto en el pasado y se origina una respuesta secundaria de anticuerpos o anamnésica. Esto se caracteriza por una producción rápida de anticuerpos, en cantidades superiores y con una persistencia más larga (4,5,6,17,39).

El tejido linfoide en relación con mucosas produce un anticuerpo especializado, IgA secretora, que se produce en la luz de varios órganos mucosos (Fig. 4). La IgA secretora es muy importante para la protección local de varias mucosas en todo el cuerpo, como son el tracto respiratorio, gastrointestinal, glándula mamaria, y tracto urogenital (17).

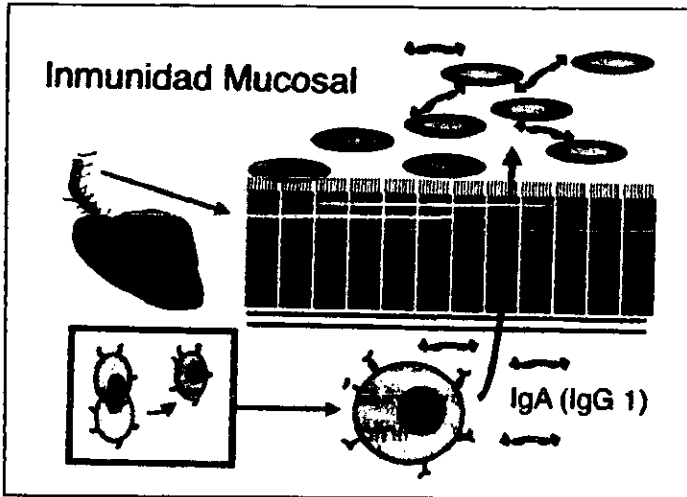


Fig. 4 La producción de la IgA secretora en la luz de las mucosas protege contra agentes extraños para evitar su penetración al organismo.

Los linfocitos T se encargan de la inmunidad mediada por células y pasan un periodo de su desarrollo en el timo. Después de la estimulación antigénica, las células T también presentan expansión clonal que forma una gran población de células T específicas para el antígeno y células de memoria. Las células T actúan de dos maneras. Actúan en forma directa sobre células blanco como "asesinas" y células T citotóxicas o en forma indirecta al secretar varias citocinas (linfocinas). Además de participar en la eliminación de células anormales, también desarrollan una serie de funciones esencialmente relacionadas con la regulación inmunitaria; hay células T cooperadoras que participan en el inicio de una respuesta inmune y T supresoras que participan en la terminación de la misma (4,17).

Los linfocitos T cooperadores inducen la producción de anticuerpos por las células plasmáticas y en las reacciones de base celular con otras células T, son también inductoras de las células supresoras y citotóxicas. Pueden identificarse serológicamente por la presencia en su superficie del marcador CD4 (definido por un anticuerpo monoclonal). Los linfocitos T citotóxicos y T supresores participan en la destrucción de células infectadas por virus ó anormales así como en la supresión de las respuestas inmunes. Ambos tipos celulares también expresan en su membrana un marcador específico, el CD8 (17,30,38).

Existe una cantidad pequeña de linfocitos T que no presentan marcadores en su membrana. Entre ellas se incluyen las denominadas células K (Killer) y las células NK (natural Killer). Las células K se caracterizan por expresar en su membrana receptores para la fracción Fc de la IgG, con lo que puede fijarse a las células cubiertas por anticuerpos, que serán destruidas a continuación. Este fenómeno se denomina citotoxicidad dependiente de anticuerpo (4,5,9,17).

Las células NK pueden, de forma similar, unirse y destruir algunos tipos de neoplasias y células infectadas por virus (6).

Las células originadas en la médula ósea (o su equivalente), pasan por una serie de etapas de su desarrollo hasta convertirse en un linfocito B, al cual le es entregado un antígeno específico para producir y secretar un tipo de inmunoglobulina. Las células que llegan al timo se dividen con rapidez pero no bajo la influencia de un antígeno. La mayor parte de los linfocitos T que llegan al timo mueren ahí (apoptosis) y sólo sobreviven 5-25%, que después abandonan la glándula. Al dejar el timo, los linfocitos T colonizan tejidos linfoides secundarios. En cuanto a la morfología, es imposible diferenciar entre un linfocito T y uno B. En la tabla 1 se resumen las características usadas para diferenciarlos (1,10,19).

Tabla 1. Diferencias entre Linfocitos B y Linfocitos T.

Característica	Linfocito T	Linfocito B
Receptores de superficie para:		
• Eritrocitos extraños	+++	-
• Antígenos	+++	+++
• Fragmento Ig Fc	+	+++
• Complemento 3b	-	+
Distribución tisular	Paracorteza de linfonodos, vaina periarteriolar, bazo, sangre	Corteza de linfonodos, folículos del bazo.
Secreción de Ig	-	+
Memoria	-	+++
Inmunidad mediada por células	+	-
Tolerancia	Duradera	Temporal

INMUNOGLOBULINAS.

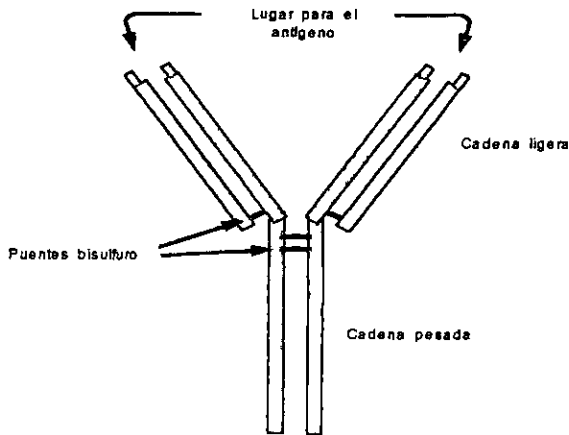
Los anticuerpos (inmunoglobulinas) son proteínas complejas producidas por células plasmáticas como consecuencia de una interacción entre los linfocitos B sensibles a los antígenos y un inmunógeno. Se conocen 5 clases diferentes de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Al parecer IgG, IgM, IgA, IgE se encuentran en todas las especies animales, mientras que la IgD solo se encuentra en el hombre, en el pollo y en los animales de laboratorio. Una vez producidas, las inmunoglobulinas tienen la capacidad de reaccionar en forma específica con el antígeno que indujo su producción (11,12,22,23,24).

Todas las clases de inmunoglobulinas tienen la misma unidad estructural básica. Este monómero consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que se mantienen unidas por puentes de disulfuro. Cada clase de inmunoglobulina tiene una cadena pesada químicamente diferente, mientras que las cadenas ligeras son

idénticas sin tomar en cuenta el tipo de cadena pesada al cual se encuentren unidas. Las cadenas pesadas y ligeras de una especie animal son idénticas para todos los animales de la misma especie, pero hay poca similitud entre las diferentes especies (1,9,19).

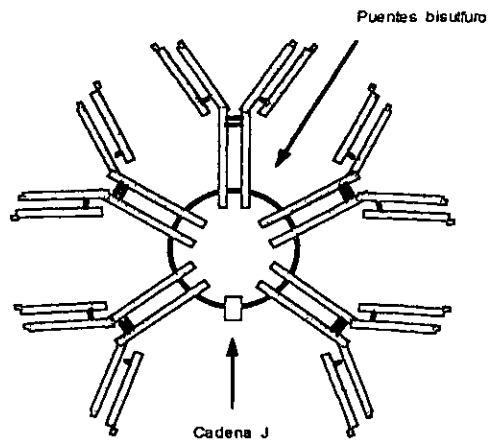
La inmunoglobulina más abundante en el suero es la IgG. Su molécula es un monómero que consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, con un peso molecular aproximado de 145 000 Daltons. Ésta inmunoglobulina puede escapar con facilidad de los vasos sanguíneos. La IgG aporta la mayor parte de la inmunidad contra los agentes infecciosos por su capacidad de estimular la fagocitosis y activar el complemento mediante la aglutinación de partículas antigénicas, y por la precipitación de antígenos solubles. También tiene la capacidad de neutralizar a los virus (1,10,17).

La IgM es la inmunoglobulina más grande, tiene un peso molecular aproximado de 750 000 Daltons. Es un pentámero que consta de 5 monómeros, cada uno de los cuales contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Estos monómeros están unidos por puentes disulfuro en una disposición circular, mientras que un pequeño polipéptido llamado cadena J, une dos de las unidades. Esta es la inmunoglobulina más importante que se produce tempranamente en la respuesta inmunitaria primaria y en menor cantidad que la IgG en la respuesta secundaria. Aunque hay una concentración relativamente baja, es más eficaz que la IgG en la opsonización, fijación del complemento, neutralización del virus y aglutinación. Por su gran tamaño, la IgM está limitada al sistema vascular y tiene poca actividad protectora en los líquidos tisulares y secreciones corporales (10,17,26).



Modelo simple de una molécula de IgG

La inmunoglobulina A se produce en concentraciones altas en el tejido linfóide del intestino, sistema respiratorio y aparato genitourinario. Es la inmunoglobulina más importante en las secreciones externas. Suele producirse en la forma de un dímero que consta de dos unidades unidas por una cadena J. En las secreciones tiene una porción secretora que la protege de la actividad enzimática. Esta inmunoglobulina no activa la cascada del complemento por la vía clásica ni puede actuar como opsonina. Tiene la capacidad de aglutinar partículas antigénicas y neutralizar virus y puede activar al complemento por la vía alterna. Se considera que su principal acción es prevenir la adherencia de los antígenos a las superficies corporales (1,25,28).



Estructura molecular de una IgM

La IgE cuyo sitio sobresaliente de producción es el epitelio del sistema respiratorio y aparato digestivo, se une con facilidad a las células cebadas y basófilos, teniendo la capacidad de adherirse a los tejidos y de iniciar una reacción anafiláctica. Es una inmunoglobulina típica de cuatro cadenas, con un peso molecular de 196 000 Daltons. La IgE tiene una porción Fc que le permite unirse a las células cebadas y basófilos. Junto con un antígeno, la IgE regula la liberación de sustancias biológicamente activas de estas células (1,5,25,28).

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA.

Entre las distintas células del sistema inmunitario tienen lugar tres interacciones de carácter regulador:

1. La activación de células T cooperadoras, mediante el antígeno presentado por los macrófagos.
2. La diferenciación de células B, mediante células T cooperadoras, para la producción de anticuerpos.

3. La activación de mecanismos supresores para restringir las respuestas mediadas, tanto por células como por anticuerpos (26,28).

En general cuando un antígeno entra al cuerpo, algunas moléculas son acarreadas por linfocitos o vasos sanguíneos a los linfonodos, aquí los antígenos comienzan un contacto con linfocitos B pequeños los cuales reaccionan transformándose en células plasmáticas, éstos sintetizan y secretan anticuerpos. Los anticuerpos secretados por células plasmáticas en tejidos linfoides circulan en el plasma sanguíneo y entonces tienen acceso a todas las partes del organismo incluyendo el sitio original de la introducción del antígeno. La combinación de un anticuerpo con un antígeno, comúnmente resulta en la neutralización de la toxicidad o patogenicidad de este último (19).

MEDICIONES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL.

Las pruebas que se utilizan para descubrir y medir la respuesta inmunitaria humoral se dividen en tres grupos: 1) Pruebas de anticuerpos primarios que miden en forma directa una reacción entre un antígeno y un anticuerpo, 2) pruebas de unión secundaria, que miden in vitro las consecuencias de la combinación de antígeno y anticuerpo, y 3) pruebas de unión terciaria, que miden las consecuencias in vivo de las combinaciones de antígenos y anticuerpos (9,15,16).

Pruebas de unión primaria.

Los antígenos y anticuerpos se combinan en forma reversible para formar complejos inmunitarios. Las pruebas primarias permiten que los reactivos se combinen y después se mide la cantidad de complejos inmunitarios formados. En las pruebas de unión primaria uno u otro de los reactivos está marcado. Después de efectuarse la reacción, los complejos inmunitarios se separan del material no unido y se mide la cantidad de material marcado en el complejo inmunitario (9,15,16).

Pruebas de unión secundaria.

Las pruebas de unión secundaria son reacciones de dos fases. La primera etapa es la unión del antígeno y el anticuerpo; la segunda depende, en gran parte, del estado físico del antígeno. Si el anticuerpo se combina con un antígeno en solución, el resultado es la precipitación. Si el anticuerpo se combina con una partícula antigénica ocurrirá aglutinación (15,16,28).

Pruebas terciarias.

Estas pruebas se llevan a cabo en sistemas vivos. El ejemplo clásico es la prueba de neutralización, que mide la capacidad de un anticuerpo, cuando se mezcla *in vitro* con un antígeno vivo, para neutralizar su actividad biológica. Los anticuerpos para los virus suelen demostrarse por este método, que se conoce como neutralización viral (9,15,16,28).

HISTORIA.

Uno de los principales métodos para estudiar la célula viviente es el empleo de cultivos celulares (10,14).

Desde que en 1912 Alexis Carrel pudo hacer crecer explantes de tejidos durante varias generaciones, la técnica de cultivo tomo importancia notablemente (14).

Las células pueden observarse directamente in vivo o después de la fijación. La observación in vivo se facilita por el uso de colorantes, los cuales pueden ser básicos (azul de metileno) o ácidos (eosina) (10,14).

La microcirugía es otro de los métodos que ha contribuido considerablemente al conocimiento de la célula. Esta se basa en la introducción de micropipetas, microagujas, microelectrodos, etc en las células y tejidos, con ayuda de aparatos especiales que permiten el movimiento controlado de estos instrumentos bajo el campo del microscopio (14). Con este instrumento se efectúa:

1. La disección y extracción de partes de células y tejidos.
2. La inyección de sustancias.
3. La medida de variables eléctricas.
4. El injerto de partes de una célula en otra y así sucesivamente.

También se han usado haces de láser para producir daño en regiones localizadas de la célula, e inclusive se somete a los tejidos a técnicas de centrifugación para separar los organelos de las células (10,14).

Citoquímica.

La citoquímica consiste en la identificación y localización de los componentes químicos de la célula. Como puntualizara R.R. Bensley, uno de los fundadores de la citología moderna "La finalidad de la citoquímica

es la de descubrir, dentro de la célula, esa organización química que es la base de la vida" (14).

En su estudio se siguen tres líneas principales:

- Separación de fracciones celulares y su investigación por técnicas bioquímicas convencionales.
- Aislamiento de pequeños trozos de tejido y aun de células para su análisis con micrométodos y ultramicrométodos.
- Métodos de coloración citoquímica.
- Métodos basados en parámetros físicos.

Este propósito involucra el estudio de los cambios dinámicos en la organización citoquímica durante los distintos estadios funcionales.

Un sistema inmunitario funcionalmente normal supone una defensa activa frente a elementos extraños, tales como agentes microbianos patógenos, macromoléculas tóxicas y, hasta cierto punto, células del propio organismo que hayan experimentado una transformación neoplásica (9,28,36).

INMUNOHISTOQUÍMICA.

La inmunocitoquímica se basa en la detección de antígenos mediante anticuerpos, pero es estrictamente aplicable cuando el objeto de interés en el estudio son estructuras celulares o intracelulares (6,13).

La mayor parte de los anticuerpos corresponde a la clase de inmunoglobulina G (IgG), que se encuentra en la fracción de gammaglobulina del suero sanguíneo. La IgG tiene un peso molecular de 145,000 a 156,000 Daltons y una conformación de "Y". Este no es el único tipo de Inmunoglobulina, sin embargo, es la que representa una mayor importancia en las pruebas inmunohistoquímicas (1,14,28).

Desde el punto de vista de la inmunocitoquímica la molécula de IgG tiene tres características importantes:

1. Tiene 2 sitios finales del segmento Fab, los cuales son capaces de unirse a un determinante antigénico; por lo que la molécula de anticuerpo es bivalente.
2. El segmento Fc de la molécula de IgG es común a todas las especies animales y en la mayoría de las veces no se combina con antígenos.
3. Las inmunoglobulinas son macromoléculas y como tales son capaces de producir anticuerpos cuando son inyectadas en diferentes especies animales. Esto nos da la producción de anti-anticuerpos (anti-gamaglobulinas) las cuales son importantes para las reacciones inmunocitoquímicas. Como un antígeno, la IgG puede tener diferentes sitios antigénicos por lo que puede ser capaz de unirse a más de una molécula de anticuerpo (28).

Los métodos inmunohistoquímicos han sido empleados para las investigaciones biológicas o de campo y desde hace poco tiempo se han empleado regularmente en el diagnóstico patológico. (9,15,28,34).

Lechago, Sun y Weinstein (1979), describieron un método para la visualización simultánea de dos antígenos en la misma sección de tejido, por la combinación de la técnica de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia. También se mencionan otros métodos que hacen posible lo anterior, son no menos de 6 métodos basados en tres técnicas: autorradiografía, inmunoenzimáticas e inmunofluorescencia (36,37).

Definición.

La inmunocitoquímica es una técnica que sirve para identificar los constituyentes celulares o tisulares de alto peso molecular que se comportarán como antígenos, por medio de interacciones antígeno-anticuerpo en donde el sitio de unión del anticuerpo se identifica por el marcaje directo del anticuerpo o por el uso de un método de marcado secundario (9).

El fundamento de la inmunohistoquímica es la detección de antígenos expresados en las células (ya sea en su membrana, en el citoplasma o en el núcleo), mediante anticuerpos específicos marcados con un complejo enzimático (avidina-biotina-peroxidasa o fosfatasa alcalina-estreptoavidina), que cuando se expone a un sustrato en presencia de un cromógeno, el sitio de reacción antígeno-anticuerpo puede ser visualizado a través del microscopio óptico (2,3,8,32,34).

La patología quirúrgica tiene su base de trabajo en la morfología, sin embargo existen estructuras que no son visibles en la microscopía óptica convencional, por lo que se ha recurrido a diversas técnicas para ampliar el espectro de la visión del patólogo a través del microscopio óptico. La histoquímica y ahora la inmunohistoquímica permiten denotar y observar estructuras con mayor facilidad, disminuyendo el grado de subjetividad y optimizando el trabajo que desarrolla el patólogo (13,31,35).

Clasificación de los métodos inmunohistoquímicos.

La inmunohistoquímica tiene dos métodos:

1. **Métodos directos:** Son aquellos en el que los anticuerpos interactúan con el antígeno tisular. En los años 50 Coons conjugó las IgG con un colorante fluorescente como la fluoresceína, lo que permitió la detección directa del complejo en el tejido por medio del microscopio de luz ultravioleta (fluorescencia). Hay otros métodos directos como el de ferritina, además de los métodos que utilizan enzimas como la peroxidasa (9,14).
2. **Métodos indirectos:** Puesto que, en general, los métodos directos tienen baja sensibilidad, la interacción antígeno-anticuerpo se amplifica mediante la introducción de un segundo anticuerpo marcado. Esta segunda interacción puede observarse por fluorescencia, radioautografía o microscopía electrónica (9,14).

CONSIDERACIONES DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

La técnica de inmunohistoquímica ha sido utilizada para la investigación y desde aproximadamente hace 20 años se utiliza para el diagnóstico patológico. Varios son los métodos que se han desarrollado para la visualización de los antígenos, entre ellos, los más utilizados son el método avidina biotina y el de fosfatasa alcalina (18,27,37,39)

□ PREPARACIÓN DE LAS LAMINILLAS

Las laminillas deberán de ser previamente tratadas con algún adhesivo tisular (poli-L-lisina o silano) ya que de lo contrario podría desprenderse la muestra debido al tratamiento al que es sometida la laminilla. No se recomienda utilizar adhesivos proteínicos (como la gretina), ya que podría existir reacciones cruzadas y observarse tinción de fondo que afecta la tinción específica (2,9).

□ FIJACIÓN E INCLUSIÓN

Se han probado diferentes tipos de fijadores para el estudio inmunohistoquímico, y son divididos en fijación por coagulación y fijación por intercambio. Los fijadores por coagulación conservan bien la inmunorreactividad de las proteínas grandes como las inmunoglobulinas, los filamentos y los receptores, pero no conserva las proteínas pequeñas por lo que los aldehidos (formaldehído y glutaraldehído) han probado ser mejores fijadores ya que preservan la estructura e inmovilizan los antígenos. El fijador más utilizado es el formol al 10%, amortiguado a un pH de 7.4 (se ha visto que el rango de pH puede variar de 4.0-7.0). Es importante recordar que los tejidos no deben de ser sobrefijados ya que esto causará deterioro de los determinantes antigénicos (6-12 horas de fijación es óptima para la mayoría de los tejidos).

La inclusión de tejidos en parafina se realiza en forma usual, teniendo especial cuidado de regular la temperatura de la parafina y de la platina a menos de 60°C, ya que de lo contrario los anticuerpos se desnaturalizan. Es importante que los cortes sean desparafinados totalmente ya que la parafina puede interferir la reacción antígeno-anticuerpo (8,20,21,29).

Los huesos y otros tejidos duros pueden descalcificarse con las técnicas habituales o se puede emplear ácido nítrico al 5% durante una hora. Los mejores resultados se han visto con la utilización de EDTA con etanol o con ácido acético o fórmico al 10%. Hay que recordar que los huesos antes de ser descalcificados deberán de estar bien fijados (9,18,21,29).

❑ **HIDRATACIÓN.**

No se deberá dejar secar la laminilla, ya que para que se lleven a cabo todas las reacciones siguientes es necesaria el agua (2,3,9).

❑ **RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA QUÍMICA.**

Debido a los procesos de fijación e inclusión en ocasiones el antígeno no puede ser detectado debido a la formación de puentes de hidrógeno. En esos casos pueden utilizarse recuperadores antigénicos, los cuales son sustancias químicas o enzimáticas que provocarán la destrucción de estos puentes devolviéndole sus características antigénicas (32,33,41,43).

❑ **BLOQUEO ENZIMÁTICO**

Debido a que la peroxidasa y la fosfatasa alcalina son enzimas que se localizan en casi todos los tejidos, es necesario bloquearla para evitar reacciones inespecíficas. El bloqueo se lleva a cabo a través de su utilización con un sustrato específico. La peroxidasa es bloqueada con peróxido de hidrógeno y la fosfatasa alcalina con levamisol (3,9,28,33,44).

□ DETECCIÓN

El método avidina biotina (ABC) utiliza para la detección del antígeno presente en el tejido, un anticuerpo específico (primer anticuerpo), posteriormente se agrega un anticuerpo anti IgG el cual está previamente biotinilado (anticuerpo secundario), la biotina se une al complejo enzimático (avidina-peroxidasa o estreptoavidina-fosfatasa alcalina) el cual va a actuar con el cromógeno aplicado (Nueva fucsina o rojo intenso) pudiendo observarse la reacción en el microscopio óptico como una positividad de color café ocre o rojo respectivamente (7,23,24,39,46).

TECNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

□ MÉTODO DIRECTO DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

Estos métodos inmunohistoquímicos son los más antiguos y simples que existen. Un antígeno conocido en un frotis de tejido es localizado por medio de la combinación con moléculas fluorescentes marcadoras. Esta técnica tiene varios inconvenientes por lo que no es muy utilizada. Primero es necesario identificar y purificar un anticuerpo tanto como sea posible. El suero obtenido debe ser marcado por medio de la conjugación de la proteína con un colorante fluorescente, el marcador más utilizado es el isotiocinato de fluoresceína el cual se une por enlaces covalentes al aminoácido lisina de los anticuerpos. Los fluorocromos se unen a todo tipo de proteínas presentes en el suero, no sólo a los anticuerpos. El material proteico del suero debe ser por lo mismo removido ya que puede ser capaz de manchar los tejidos, esto se puede llevar a cabo por uno o los tres métodos siguientes:

- Dialisis.
- Columna de afinidad.
- Tratamiento en carbón activado.

Otros fluorocromos también son utilizados. El grupo reactivo es usualmente isotiocinato, sulfonil clorhídrico o diclorotriazinil y varios reactivos derivados de la rodamina B. Finalmente el suero es concentrado y ahora este antisuero marcado esta listo para ser utilizado (18,27,35).

Desarrollo.

1. Se utilizan tejidos fijados por inmersión en paraformaldehido al 4% en solución amortiguadora de fosfatos (SAF), pH 7.4, a 4 C.
2. Efectuar cortes del tejido de 8µm de grosor.
3. Colocar en laminillas tratadas con algún adhesivo (poli-L-lisina o silano); dos cortes del tejido en estudio (uno servirá como control negativo y uno como problema) y un corte de un tejido positivo (control positivo).

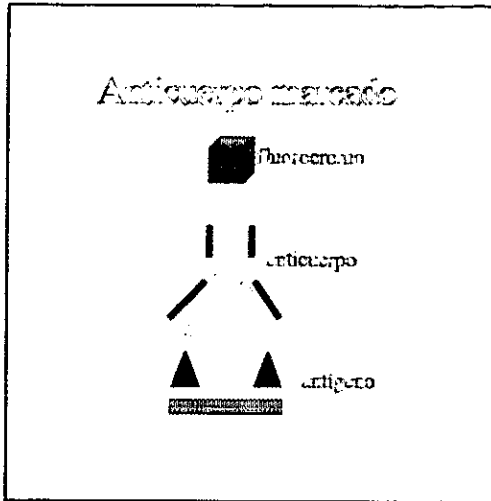


Fig. 5. Esquema general del método directo de anticuerpos fluorescentes.

4. Lavar con SAF durante 5 minutos ó con solución salina fisiológica (SSF).
5. Aplicar el suero marcado en una dilución 1:8 en SSF
6. Incubar en una cámara húmeda durante 1 hora
7. Lavar con SSF
8. Contrastar con Algún colorante como hematoxilina, si así se desea
9. Montar la preparación inmunofluorescente en una mezcla de glicerol y solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4-7.6 para preservar la intensidad de la fluorescencia
10. Cubrir.
11. Observar en un microscopio de luz ultravioleta.

El principal inconveniente de este método de anticuerpos fluorescentes es que no es posible identificar antígenos presentes en bajas concentraciones en un tejido. Hay dos razones para esta carencia de sensibilidad:

- El proceso de conjugación con un fluorocromo causa bloqueo en los sitios de combinación de algunas moléculas de anticuerpos. La posibilidad de que el marcador se fije al sitio de combinación del anticuerpo amenta si la concentración del marcador es baja, sin

embargo, estas concentraciones bajas de grupos fluorescentes provocará una baja fluorescencia a la observación. Se recomienda que un antisuero marcado ideal contenga cerca de 10 fluorocromos unidos a cada molécula de IgG.

- Una molécula de anticuerpo marcado se combina con cada sitio de determinante antigénico en el tejido. Si la concentración de antígeno en el tejido es baja, la densidad de unión de los anticuerpos marcados posiblemente no sean suficientemente altas para permitir su detección bajo microscopía. En otros métodos es posible la acumulación de grandes cantidades de marcador en cada sitio de unión antigénica por lo cual ahora se emplean éstos con mayor frecuencia (19,34).

❑ MÉTODO INDIRECTO DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

Con el método indirecto es posible identificar cada antígeno o anticuerpo en el tejido. El reactivo común para este tipo de procedimientos es un anti-anticuerpo marcado fluorescentemente (anticuerpo secundario) contra un anticuerpo primario. Esto se logra al unir un anticuerpo primario al sitio de unión del antígeno del tejido. La fracción Fc de las inmunoglobulinas unidas pueden funcionar como antígenos, por lo cual, es posible producir un suero anti-inmunoglobulina por la inyección en otra especie animal de gama-globulinas del suero de la especie de la cual se obtuvo el anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario puede ser marcado por un pigmento fluorescente. Al final el anticuerpo secundario marcado se une a la fracción Fc de la inmunoglobulina unida al antígeno del tejido haciendo posible su detección (18,19,27,34).

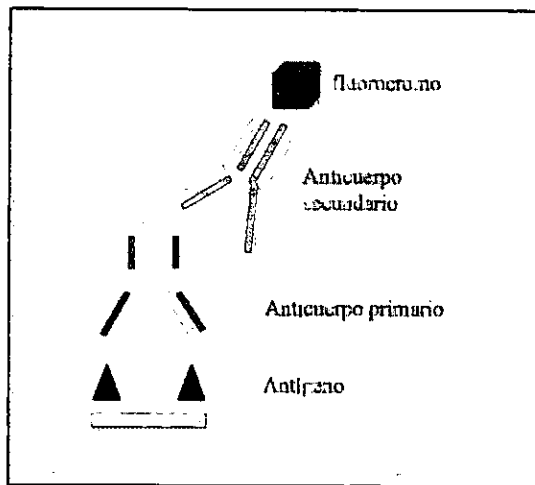


Fig.6. Esquema general del método indirecto de Anticuerpos fluorescentes.

Desarrollo.

1. Se utilizan tejidos fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7.4, a 4 grados centígrados
2. Efectuar criosecciones de 8µm de grosor.

3. Colocar en laminillas tratadas con algún adhesivo (poli-L-lisina o silano); dos cortes del tejido en estudio (uno servirá como control negativo y uno como problema) y un corte de un tejido positivo (control positivo). El control negativo se puede obtener obviando el paso número 5.
4. Lavar con PBS durante 5 minutos.
5. Incubar los cortes con anticuerpos primarios a una dilución de 1:20 ó 1:50 (monoclonales, no marcados), durante 30-60 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Este es llamado suero primario.
6. Lavar con PBS durante 5 minutos o SSF 3 cambios.
7. Incubar durante 30-60 minutos con un suero secundario (anti IgG), fluoresceinado, diluido en PBS (1:10 y 1:40).
8. Lavar la laminilla con solución salina fisiológica 3 cambios
9. Contrastar el tejido con Hematoxilina hasta obtener el contraste deseado
10. Lavar con agua corriente
11. Se pueden montar en un medio de glicerol amortiguado.
12. Cubrir
13. Observar con microscopio de luz ultravioleta.

Por medio de esta técnica podemos demostrar la presencia de pequeñas cantidades de antígeno en el tejido. Esta técnica es superior al método directo por 2 razones:

- No es necesario marcar el suero primario. El suero secundario puede ser obtenido comercialmente y es potencialmente mejor para la detección de una infinidad de antígenos.
- El sitio del determinante antigénico se multiplica. Esto es porque el anticuerpo primario sin marcar se une a este sitio, consecutivamente más de una molécula del anticuerpo fluorescente del suero secundario son capaces de fijarse a cada molécula de anticuerpo primario. Por esto las técnicas inmunohistoquímicas indirectas son más sensibles que las directas (19,27,34,37).

□ MÉTODO Complejo Avidina- Biotina (ABC).

El método ABC fue desarrollado por Hsu y sus colaboradores en 1981. Este método aprovecha la gran afinidad que tiene la avidina para unirse a cuatro moléculas de biotina y el complejo de tres peroxidadas unidas a la avidina.

El cromógeno utilizado como revelador en este método es el DAB (permanente) o el AEC (acuoso); la reacción positiva es de color ocre la cual puede variar de intensidad y estar localizada en el núcleo, en el citoplasma o en la membrana (20).

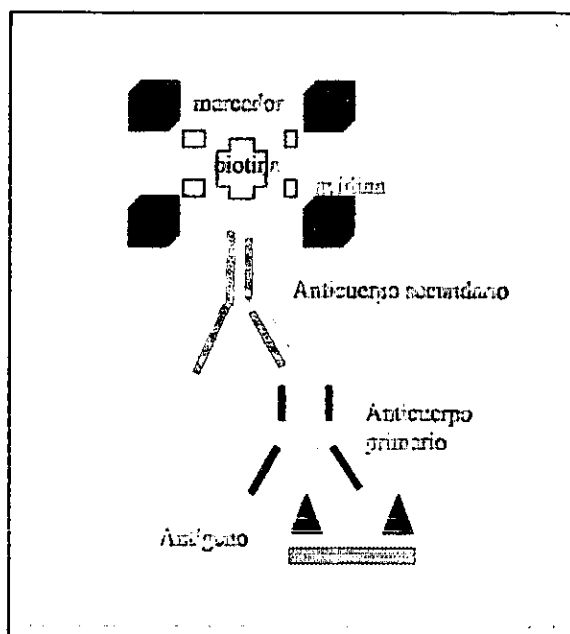


Fig. 7. Esquema general del método ABC

Desarrollo.

1. Se utilizan tejidos fijados en formol amortiguado al 10% durante 24-48 hrs. e incluidos en parafina.
2. Cortar en microtomo a 2-6 μ m

3. Colocar en laminillas tratadas con adhesivo (poli-L-lisina o silano); dos cortes del tejido en estudio (uno servirá como control negativo y uno como problema) y un corte de un tejido positivo conocido (control positivo)
4. Desparafinar las laminillas con los cortes en el horno a 60°C durante 30 minutos.
5. Hidratar de la siguiente forma:
 - Xilol durante 2 minutos (2 veces)
 - Alcohol absoluto durante 2 minutos (2 veces)
 - Alcohol del 96° durante 2 minutos (2 veces)
 - Agua común 3 cambios
 - Agua destilada durante 2 minutos
6. Recuperador antigénico (a las que lo requieran),
 - Antigen-retrival 2 tiempos de 6 minutos c/u en horno de microondas a alta temperatura o en estufa durante 40 minutos a 98°C. Se utiliza siempre en casos de receptores de estrógenos y de progesterona.
 - Citrato de Sodio al 0.1M, 2 tiempos de 6 minutos c/u en horno de microondas a alta temperatura o en estufa durante 40 minutos a 98°C
 - Tripsina 5-20 minutos a temperatura ambiente o a 37°C según el anticuerpo
7. Enfriar hasta temperatura ambiente
8. Lavar con PBS (pH 7.6) durante 5 minutos
9. Bloquear peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 3% en metanol durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.
10. Decantar
11. Lavar con PBS durante 5 minutos
12. Separar el tejido con el marcador PAP Pen
13. Adicionar, suero normal (bloqueador de proteínas) e incubar 10 minutos
14. En el corte problema y en el control positivo se agrega el primer anticuerpo. Se incuba en una cámara húmeda durante 45 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (en el refrigerador). Algunos anticuerpos necesitan más tiempo de incubación de acuerdo al lote, tales como:

- CD15, CD30, Estrógenos, Progesterona, (90-120 minutos)
 - Ki-67, bcl-2, PCNA (60 minutos)
- 14^o. Simultáneamente se le agrega al corte negativo, suero control negativo.
 15. Decantar
 16. Lavar con PBS a chorro
 17. Lavar en PBS durante 6 minutos
 18. Adicionar a todos los cortes el 2^o anticuerpo (anticuerpo biotinilado) e incubar 20 min.
 19. Lavar con PBS durante 6 minutos.
 20. Adicionar el complejo enzimático (avidina-peroxidasa) e incubar 20 minutos.
 21. Lavar con PBS durante 6 minutos
 22. Agregar el cromógeno DAB [Tetraclorhidrato de Diaminobezidina]
 23. Observar al microscopio hasta obtener en el control positivo la reacción requerida
 24. Decantar en una solución de hipoclorito de sodio al 5% para inactivar el cromógeno
 25. Poner en agua destilada
 26. Contrastar con Hematoxilina de Mayer hasta obtener el contraste adecuado
 27. Lavar con agua común
 28. Virar con agua caliente o con agua amoniacal
 29. Deshidratar de la siguiente forma:
 - Pasar a alcohol del 96° durante 2 minutos (2 veces)
 - Pasar a alcohol absoluto durante 2 minutos (2 veces)
 - Pasar a xilol durante 2 minutos (2 veces)
 30. Cubrir.

❑ MÉTODO DE FOSFATASA ALCALINA.

Este método puede ser usado cuando se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales (12,13,26).

Los reveladores utilizados en este método son New Fucsina (permanente) o Fast Red (acuoso). La reacción positiva será de color rojo la cual puede variar de intensidad y estar localizada en el núcleo, en el citoplasma o en la membrana (3,9,11,33,37,39).

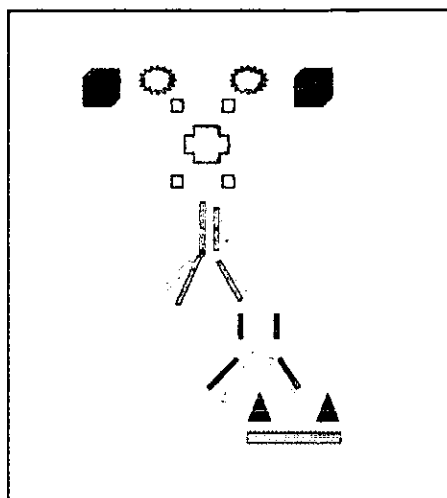


Fig. 8. Esquema general del método de fosfatasa alcalina

Desarrollo.

1. Se utilizan tejidos fijados en formol amortiguado al 10% durante 24-48 hrs. e incluidos en parafina.
2. Cortar en microtomo a 2-6 μm
3. Colocar en laminillas tratadas con algún adhesivo (poli-L-lisina o silano); dos cortes del tejido en estudio (uno servirá como control negativo y uno como problema) y un corte de un tejido positivo (control positivo)

4. Desparafinar las laminillas con los cortes en el horno a 60°C durante 30 minutos.
5. Hidratar de la siguiente forma:
 - Xilol durante 2 minutos (2 veces)
 - Alcohol absoluto durante 2 minutos (2 veces)
 - Alcohol del 96° durante 2 minutos (2 veces)
 - Agua común 3 cambios
 - Agua destilada durante 2 minutos
6. Recuperador antigénico (a las que lo requieran),
 - Antigen-retrival 2 tiempos de 6 minutos c/u en horno de microondas a alta temperatura o en estufa durante 40 minutos a 98°C. Se utiliza siempre en casos de receptores de estrógenos y de progesterona.
 - Citrato de Sodio al 0.1 molar 2 tiempos de 6 minutos c/u en horno de microondas a alta temperatura o en estufa durante 40 minutos a 98°C
 - Tripsina 5-20 minutos a temperatura ambiente o a 37°C según el anticuerpo
7. Enfriar hasta temperatura ambiente
8. Lavar con PBS durante 5 minutos
9. Separar el tejido con el marcador PAP Pen
10. Adicionar suero normal (bloqueador de proteínas) e incubar 10 minutos
11. En el corte problema y en el control positivo el primer anticuerpo. Se incuba en una cámara húmeda durante 45 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (en el refrigerador). Algunos anticuerpos necesitan más tiempo de incubación de acuerdo al lote, tales como:
 - CD15, CD30, Estrógenos, Progesterona, (90-120 minutos)
 - Ki-67, bcl-2, PCNA (60 minutos)
- 11°. Simultáneamente se pone en el corte negativo, suero control negativo.
12. Decantar
13. Lavar con PBS a chorro
14. Lavar en PBS durante 6 minutos
15. Adicionar a todos los cortes el 2º anticuerpo (anticuerpo biotinilado) e incubar 20 min.

16. Lavar con PBS durante 6 minutos.
17. Adicionar el complejo enzimático (fosfatasa alcalina-estreptovidina) e incubar 20-30 min.
18. Agregar el cromógeno (New Fucsina)
19. Observar al microscopio hasta obtener en el control positivo la reacción requerida
20. Decantar en una solución de hipoclorito de sodio al 5% para inactivar el cromógeno.
21. Poner en agua destilada
22. Contrastar con Hematoxilina de Mayer hasta obtener el contraste adecuado
23. Lavar con agua común
24. Virar con agua caliente o con agua amoniacal
25. Deshidratar de la siguiente forma:
 - Pasar a alcohol del 96° durante 2 minutos (2 veces)
 - Pasar a alcohol absoluto durante 2 minutos (2 veces)
26. Dejar reposar durante 20-30 minutos
27. Cubrir

□ MÉTODO DE INMUNOPEROXIDASA.

Este método inmunohistoquímico utiliza tejidos fijados e incluidos en parafina, que da una reacción permanente y cuyos resultados pueden observarse con un microscopio de luz ordinario. En esta técnica el anticuerpo se marca con la enzima peroxidasa y se hace aparente, al tratarse con peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina (DAB), por medio de un pigmento color café tabaco que aparece en los sitios de reacción. Para aumentar la intensidad de la reacción Sternberg y cols crearon una molécula compleja, la peroxidasa antiperoxidasa (PAP) (2,22,36,39,40).

La técnica más común utiliza un anticuerpo primario no marcado, un anticuerpo secundario o puente inmunológico y la molécula de PAP. Como resultado se logra que en cada sitio antigénico se depositen 3 moléculas de peroxidasa, lo que provoca un efecto de incremento de la reacción. De este método hay muchas variantes como el sistema biotina-avidina, la proteína A del Estafilococo, combinación de 2 o más enzimas marcadoras, uso de anticuerpos monoclonales, etc. (35).

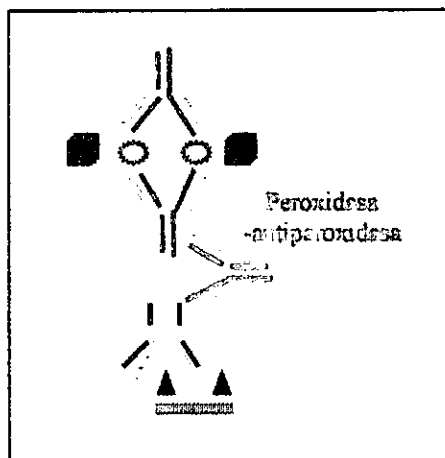


Fig 9. Esquema general del complejo PAP

Desarrollo.

1. Se utilizan tejidos fijados en formol amortiguado al 10% durante 24-48 hrs. e incluidos en parafina.

2. Cortar en microtomo a 2-6 μm
3. Colocar en laminillas tratadas con algún adhesivo (poli-L-lisina o silano); dos cortes del tejido en estudio (uno servirá como control negativo y uno como problema) y un corte de un tejido positivo (control positivo)
4. Desparafinar de un día para otro en estufa a no más de 60°C.
5. Terminar de desparafinar en xilol y etanol.
6. Incubar en metanol absoluto con peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear la actividad de peroxidasa endógena.
7. Rehidratar en:
 - Etanol absoluto 2 minutos (2 veces)
 - Etanol al 95% durante 2 minutos (2 veces)
 - Agua bidestilada, desmineralizada y estéril durante 2 minutos.
8. Recuperador antigénico a las que lo requieran,
 - Antigen-retrival 2 tiempos de 6 minutos c/u en horno de microondas a alta temperatura o en estufa durante 40 minutos a 98°C. Se utiliza siempre en casos de receptores de estrógenos y de progesterona.
 - Citrato de Sodio al 0.1 molar 2 tiempos de 6 minutos c/u en horno de microondas a alta temperatura o en estufa durante 40 minutos a 98°C
 - Tripsina 5-20 minutos a temperatura ambiente o a 37°C según el anticuerpo
9. Enfriar hasta temperatura ambiente.
10. Colocar en Buffer de fosfatos salino 0.05 M, pH 7.6, con suero normal de carnero al 1%.
11. El paso anterior se puede sustituir exponiendo los cortes directamente a suero normal de carnero 1:20 durante 30 min.
12. Colocar sobre el corte una o varias gotas del suero primario, usualmente preparado en conejo. Se colocan las laminillas en una cámara de incubación húmeda perfectamente nivelada, para que el anticuerpo no se desplace del tejido, la cual se coloca en un refrigerador a 4°C. Se incuba de un día para otro.
13. Lavar los cortes 3 veces en buffer de fosfatos salino con suero normal de carnero al 1%.
14. Agregar una o varias gotas del anticuerpo secundario conocido como

puente inmunológico frecuentemente carnero-anticonejo, cabra-anticonejo ó puerco-anticonejo e incubar 30min en cámara húmeda, a temperatura ambiente.

15. Lavar los cortes 3 veces en buffer de fosfatos salino con suero normal de carnero al 1%.
16. Colocar una o varias gotas de PAP de conejo. Incubar 30min.
17. Lavar los cortes 3 veces en buffer de fosfatos salino con suero normal de carnero al 1%.
18. Exponer los cortes a una solución recientemente preparada de DAB disuelta en buffer de fosfatos salino con peróxido de hidrógeno al 30%. Esto tiene la finalidad de que el peróxido de hidrógeno reaccione con la peroxidasa de la PAP y dar origen a oxígeno que oxide la DAB. La reacción se lleva a cabo en cajas de Petri, sobre fondo blanco y se controla tanto macroscópicamente como al microscopio, para valorar la intensidad de la reacción y detenerla a tiempo. Un revelado adecuado toma de 10-15min.
19. Lavar en agua destilada para detener la reacción y quitar el exceso de DAB.
20. Contrastar con Hematoxilina de Harris, para obtener una tinción nuclear.
21. Aumentar la intensidad de la reacción mediante un baño rápido en una solución al 1% de tetraóxido de osmio.
22. Deshidratar de la siguiente forma:
 - Pasar a alcohol del 96° durante 2 minutos (2 veces)
 - Pasar a alcohol absoluto durante 2 minutos (2 veces)
23. Dejar reposar durante 20-30 minutos
24. Cubrir.

De cada caso se procesan un mínimo de 2 cortes, uno como tejido problema y el otro como testigo negativo. A éste se le agrega suero normal de conejo 1:500 en lugar de anticuerpo primario o el anticuerpo primario correspondiente después de haber sido conjugado con el antígeno específico. Como es natural, para que el resultado sea válido debe haber positividad en el tejido problema y negatividad absoluta en el testigo negativo (19,35).

□ MÉTODO DE LA PROTEÍNA A DEL ESTAFILOCOCO (SpA).

La proteína A del *Staphylococcus aureus* marcada con isotiocinato de fluoresceína es utilizada para detectar anticuerpos IgG en tejidos y superficies antigénicas de las células. Frecuentemente se utiliza para identificar células linfoides. Este método tiene la ventaja de dar mayor especificidad. Además algunos reportes mencionan que no solamente se pueden identificar antígenos de membrana, sino también pueden ser identificados antígenos virales (7,16).

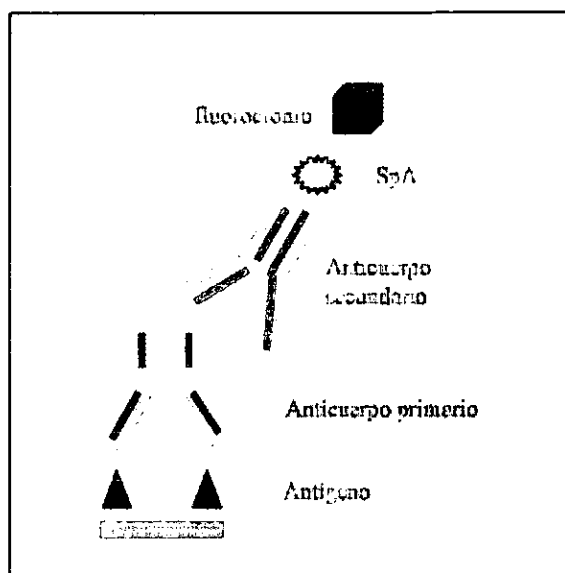


Fig. 10. Esquema general del método de la proteína A del estafilococo

Desarrollo.

1. Se utilizan tejidos fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7.4, a 4 grados centígrados
2. Efectuar criosecciones de 6µm de grosor.
3. Colocar en laminillas tratadas con algún adhesivo (poli-L-lisina o silano); dos cortes del tejido en estudio (uno servirá como control negativo y uno como problema) y un corte de un tejido positivo (control positivo). El control negativo se puede obtener obviando el paso número 5.

4. Lavar con PBS pH 7.2 durante 5 minutos
5. Incubar los cortes con anticuerpos primarios a una dilución de 1:20 ó 1:50 (monoclonales, no marcados), durante 30-60 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Este es llamado suero primario.
6. Lavar con PBS durante 5 minutos o SSF 3 cambios.
7. Incubar durante 30-60 minutos con un anticuerpo fluorescente anti IgG (SpA), diluido en PBS.
8. Lavar la laminilla con SSF 3 cambios
9. Contrastar el tejido con Hematoxilina hasta obtener el contraste deseado
10. Lavar con agua corriente
11. Se pueden montar en un medio de glicerol bufferado.
12. Cubrir

ANTIGENOS

□ ENDOTELIALES

▲ CD-31 [JC/70A]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Proteasas
3. **Tejido Testigo:** Hemangiosarcoma
4. **Células normales:** Células endoteliales, plaquetas, monocitos, granulocitos, linfocitos B.
5. **Células neoplásicas:** Hemangiomas, Hemangiosarcomas, Hemangiopericitomas
6. **Positividad:** Membrana celular y citoplasma (asociado a glicoproteína de membrana de cadena única).

▲ CD-34 [QEnd/10]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Apéndice o cualquier tejido con vasos sanguíneo.
4. **Células normales:** Células endoteliales, Células hematopoyéticas progenitoras (inclusive extramedulares), Sangre periférica después de quimioterapia, Células dendríticas intersticiales.
5. **Células neoplásicas:** Hemangiomas, Hemangiosarcomas, Hemangiopericitomas, Sarcomas de Kaposi, Granuloma piógeno, Tumor fibroso solitario, Tumores del estroma gastrointestinal, Dermatofibrosarcoma protuberans, Leucemia linfoblástica aguda, Leucemia mieloblástica, Síndrome mielodisplásicos. Algunas neoplasias con células mioepiteliales
6. **Positividad:** Citoplasma (asociada a proteína transmembranal glucosilada)

▲ Factor VIII (von Willenbrand's) [BGX016A]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Control:** Apéndice o cualquier tejido con vasos sanguíneos.

4. **Células normales:** Células endoteliales (no en endotelio glomerular y escasamente en los sinusoides hepáticos y esplénicos), Megacariocitos y Plaquetas.
5. **Células neoplásicas:** Hemangiomas, Hemangiosarcomas, Sarcoma de Kaposi.
6. **Positividad:** Citoplasma

□ EPITELIALES

▲ EMA (Antígeno epitelial de membrana) [E29]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de sodio 0.1M, pH 6.0
3. **Tejido control:** Carcinoma de glándula mamaria
4. **Células normales:** Epitelios, Células plasmáticas
5. **Células neoplásicas:** Carcinomas, algunos linfomas (linfoma B y T de células grandes)
6. **Positividad:** Membrana (asociado a glicoproteína transmembranal), citoplasmática

□ ESPECIFICOS

▲ Actina músculo específica [HHF35]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Testigo control:** Apéndice cecal
4. **Células normales:** Células musculares, miofibroblastos
5. **Células neoplásicas:** Neoplasias de origen muscular
6. **Positividad:** Citoplasma (asociado a las bandas Z)

▲ Amilasa pancreática [6105]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Páncreas
4. **Células normales:** Células pancreáticas exócrinas

5. Células neoplásicas:

6. Positividad:

▲ HMB45 (Melanoma) [HMB-45]

1. **Método:** FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Melanoma / angiomiolipoma renal.
4. **Células normales:** Melanocitos
5. **Células neoplásicas:** Melanoma (excepto el melanoma desmoplásico), Angiomiolipoma renal, Tumor de azúcar de pulmón, Linfongoleiomiomatosis, Tumor de células de Hürtle de tiroides.
6. **Positividad:** Citoplasma (melanosomas).

▲ PLAP (Fosfatasa alcalina placentaria) [PL8-F6]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Placenta de 3er. Trimestre
4. **Células normales:** Placenta
5. **Células neoplásicas:** Tumores de células germinales, carcinoma in situ de testículo, seminoma
6. **Positividad:** Membrana

▲ PSA (Antígeno específico de próstata) [ErPr8]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido control:** Próstata
4. **Células normales:** Epitelio secretor y ductal de próstata
5. **Células neoplásicas:** Neoplasias de epitelios secretor y ductal de próstata
6. **Positividad:** Citoplasma

□ FILAMENTOS INTERMEDIOS

▲ Citoqueratina cocktail [AE1 y AE3]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH6.0

3. **Testigo control:** Apéndice cecal
4. **Células normales:** Células epiteliales
5. **Células neoplásicas:** Carcinomas, Adenocarcinomas, Sarcoma sinovial, Sarcoma epiteliode, Condroma
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Citoqueratina de alto peso (1-8) [AE3]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH6.0
3. **Testigo control:** Apéndice cecal
4. **Células normales:** Células epiteliales con queratinas de alto peso
5. **Células neoplásicas:** Carcinomas, Adenocarcinomas, Sarcoma sinovial, Sarcoma epiteliode, Condroma
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Citoqueratina de alto peso (1,5,10,14) [34bE12]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0
3. **Tejido Testigo:** Piel
4. **Células normales:** Células basales de próstata, hígado, piel, glándula mamaria
5. **Células neoplásicas:** Puede hacerse la distinción entre hiperplasia de células basales y carcinoma prostático
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Citoqueratina de bajo peso (9-20) [AE1]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH6.0
3. **Testigo control:** Apéndice cecal
4. **Células normales:** Células epiteliales con queratina de bajo peso
5. **Células neoplásicas:** Carcinomas, Adenocarcinomas, Sarcoma sinovial, Sarcoma epiteliode, Condroma, Mesotelioma, Carcinoma neuroendócrino
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Desmina [33]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Testigo control:** Leiomioma
4. **Células normales:** Músculo estriado esquelético y cardíaco, fibras de Purkinje, algunos vasos sanguíneos
5. **Células neoplásicas:** Rhabdomiosarcoma, leiomiosarcomas.
6. **Positividad:** Citoplasma (asociado a los discos Z)

▲ **GFAP (Proteína fibrilar ácida glial) [6A-5]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Testigo control:** Astrocitoma
4. **Células normales:** Astrocitos, Células endimarias, Células de Schwann, Células satélite y Células gliales entéricas
5. **Células neoplásicas:** Astrocitomas
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Neurofilamentos [NE14]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Nervio periférico y Cerebro
4. **Células normales:** Procesos neuronales (axones, en SNC y SNP), Células ganglionares simpáticas, Células de la médula adrenal
5. **Células neoplásicas:** Neuroblastomas, Gangliomas, Ganglioneuroblastomas, Estesioneuroblastomas, Meduloblastomas, Feocromocitomas, Quimiodectomas, Pinealomas. También se ha encontrado en Carcinomas de células de Merkel, Tumores de las isletas pancreáticas, Carcinoides, Carcinoma de células pequeñas del pulmón.
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Vimentina [V9]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Testigo control:** Apéndice cecal

4. **Células normales:** Células de origen mesenquimal (fibroblastos, células endoteliales, condrocitos, células linfocíticas, histiocitos, células gliales y células musculares)
5. **Células neoplásicas:** Melanomas, Linfomas, Carcinomas de tiroides, riñón, endometrio, ovario y sarcomatoides
6. **Positividad:** Citoplasma

□ HEMATOPOYÉTICOS

▲ CD-3 (Pan-T) [PS1]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o Antigen retriever.
3. **Tejido Testigo:** Apéndice o Amígdala
4. **Células normales:** Linfocitos T
5. **Células neoplásicas:** Linfomas T
6. **Positividad:** Membrana (asociada a los receptores de linfocitos T) y citoplasma (asociada a la unidad épsilon)

▲ CD-4+ (Anticuerpos monoclonales)

1. **Método:** Inmunofluorescencia
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Amígdala, Linfonodo
4. **Células normales:** Linfocitos T
5. **Células neoplásicas:** Linfomas T
6. **Positividad:** Membrana (asociada a los receptores de linfocitos T)

▲ CD-8+ (Anticuerpos monoclonales]

1. **Método:** Inmunofluorescencia
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Amígdala, Linfonodo
4. **Células normales:** Linfocitos T
5. **Células neoplásicas:** Linfomas T
6. **Positividad:** Membrana (asociada a los receptores de linfocitos T)

▲ **CD-15 (Antígeno asociado a granulocitos/células de Reed Sternberg) [LeuM1]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Opcional. Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o Antigen retriever.
3. **Incubación:** 90-120 minutos
4. **Tejido Testigo:** Linfoma Hodgkin
5. **Células normales:** Granulocitos maduros, Macrófagos tisulares (reacción focal citoplásmica). Puede reaccionar con Células epiteliales de estómago, colon, páncreas, glándula salival, glándula mamaria, hígado, vesícula biliar, riñón y epididimo.
6. **Células neoplásicas:** Células Hodgkin y Reed-Sternberg en linfoma de Hodgkin, Linfomas no Hodgkin, Leucemia mieloide aguda, Leucemia monocítica, Leucemia mielomonocítica, Leucemia mielogena crónica, Leucemia linfocítica aguda, micosis fungoide y algunas células de adenocarcinoma (Dx. diferencial de mesotelioma)
7. **Positividad:** Membrana y Aparato de Golgi (asociado al hapteno X (lacto-N-fucopentosa))

▲ **CD-20 (Pan-B) [L26]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Amígdala o Apéndice
4. **Células normales:** Linfocitos B y sus precursores, Cls plasmáticas +/-
5. **Células neoplásicas:** Linfomas B, Leucemia aguda, Leucemia linfocítica crónica.
6. **Positividad:** Membrana (asociado a fosfoproteína)

▲ **CD-21 [1F8]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Tripsina 0.1% en solución sulfato de calcio al 0.1%.
3. **Tejido Testigo:** Amígdala
4. **Células normales:** Linfocitos B, Cls dendríticas foliculares
5. **Células neoplásicas:** Sarcomas de células reticulares, Linfomas centrocíticos y
1. foliculares, leucemia linfocítica crónica de células B
6. **Positividad:** Citoplasma (asociado a receptores C3d del complemento)

▲ **CD-30 [BerH2]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Incubación:** 120 minutos
4. **Tejido Testigo:** Linfoma Hodgkin
5. **Células normales:** Células plasmáticas, Células perifoliculares. Linfocitos B infectados con el virus Epstein-Barr, Linfocitos T infectados con el virus linfotrófico T humano y Macrófagos asociados a granulomas. Timocitos medulares, Células grandes del bazo fetal, Células de páncreas exócrino, Células de Purkinje.
6. **Células neoplásicas:** Células de Reed-Sternbergen en enfermedad de Hodgkin, Linfoma anaplásico de células grandes (Histiocitosis maligna / histiocitosis atípica regresiva), Papulosis linfomatoide, Linfoma cutáneo de células T, Carcinoma embrionario. En algunos carcinomas pancreáticos, salivares, leiomiomas y melanomas.
7. **Positividad:** Membrana (asociada a glicoproteína) y Ap. de Golgi

▲ **CD-45RO [UCHL-1]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Amígdala o Apéndice
4. **Células normales:** Linfocitos T, Linfocitos B marginales, Timocitos y Granulocitos
5. **Células neoplásicas:** Linfomas T (ocasionalmente linfomas B)
6. **Positividad:** Membrana (asociado a proteínas codificadas en el cromosoma 1q31-32)

▲ **CD-68 [KP1]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0
3. **Tejido Testigo:** Nódulo linfático, Hígado
4. **Células normales:** Macrófagos, Mastocitos
5. **Células neoplásicas:** Leucemia mieloide aguda, Linfoma linfocítico de células de pequeñas, Tumor de células granulares, Histiocitosis, Histiocitosis de células de Langerhans, Leucemia de

células peludas. Algunas ocasiones con melanoma, Carcinoma de células renales, Meningiomas y Glioblastomas

6. **Positividad:** Citoplasma (marcador de gránulos lisosomales)

▲ **Kappa [A8B5]**

1. **Método:** ABC o FA

2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o Antigen retriever

3. **Tejido Testigo:** Amígdala

4. **Células normales:** Células plasmáticas y/o linfoides Kappa positivas.

5. **Células neoplásicas:** Linfomas B. Así como en depósitos de inmunoglobulinas en glomerulonefritis

6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Lambda [N10/2]**

1. **Método:** ABC o FA

2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o Antigen retriever

3. **Tejido Testigo:** Amígdala

4. **Células normales:** Células plasmáticas y/o linfoides Lambda positivas.

5. **Células neoplásicas:** Linfomas B. Así como en depósitos de inmunoglobulinas en glomerulonefritis

6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Lambda, TcR1-N24 [6B21A]**

1. **Método:** ABC

2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o Antigen retriever

3. **Tejido Testigo:** Amígdala

4. **Células normales:** Linfoides Lambda positivas.

5. **Células neoplásicas:** Linfomas T.

6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Lambda, WC1-N3 [CACTB32A]**

1. **Método:** ABC

2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o Antigen retriever

3. **Tejido Testigo:** Amígdala

4. **Células normales:** Linfoides Lambda positivas.

5. **Células neoplásicas:** Linfomas T.

6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Lambda CD8 α [BAQ111A]**

1. **Método:** ABC
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o Antigen retriever
3. **Tejido Testigo:** Amígdala
4. **Células normales:** Linfoides Lambda positivas.
5. **Células neoplásicas:** Linfomas T.
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Lambda, WC1-N4 [BAQ89A]**

1. **Método:** ABC
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o Antigen retriever
3. **Tejido Testigo:** Amígdala
4. **Células normales:** Linfoides lambda positivas.
5. **Células neoplásicas:** Linfomas T.
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **LCA, Antígeno común leucocitario (CD-45)[LCA]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Amígdala o Apéndice cecal
4. **Células normales:** Células de origen linfoide, monocitos, macrófagos y granulocitos.
5. **Células neoplásicas:** Linfoma no Hodgkin, Linfoma de Hodgkin
6. **Positividad:** Membrana (asociado a proteínas codificadas en el cromosoma 1q31-32)

□ **HORMONALES**

▲ **ACTH [Policlonal]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Adenohipófisis
4. **Células normales:** Células de la adenohipófisis productoras de ACTH.
5. **Células neoplásicas:** Adenomas pituitarios
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **b-hCG (Gonadotropina coriónica humana, subunidad beta) [D7]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Placenta del 1er trimestre
4. **Células normales:** Células de sinciciotrofoblasto
5. **Células neoplásicas:** Coriocarcinoma (citotrofoblasto o en células gigantes sinciotrofoblásticas), carcinoma embrionario, germinoma y tumor sinus endodermal
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Prolactina [BGX031A]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Hipotálamo
4. **Células normales:** Neuronas de los núcleos hipotalámico, paraventricular y supraóptico del hipotálamo, así como neurohiófis
5. **Células neoplásicas:** Adenomas hipotalámicos e hipofisarios
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **hGH (Hormona del crecimiento) [54/92A2]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Adenohipófisis
4. **Células normales:** Células de la adenohipófisis que producen hGH (somatotróficas)
5. **Células neoplásicas:** Adenoma hipofisario
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **Tiroglobulina [DAK-Tg6]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido control:** Tiroides
4. **Células normales:** Células foliculares de tiroides
5. **Células neoplásicas:** Carcinoma de tiroides
6. **Positividad:** Citoplasma

□ INMUNOGLOBULINAS

▲ IgG [7701]

1. Método: ABC o FA
2. Recuperador: Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0
3. Tejido Testigo: Amígdala
4. Especificaciones: Incubación de Ac primario: 2 horas a 37 grados centígrados
5. Células normales: Células plasmáticas reactivas. También puede observarse en macrófagos, células de Reed-Sternberg sin que indique síntesis intracelular.
6. Células neoplásicas: Linfomas B plasmocitoides, Hiperplasia folicular reactiva, Linfomas foliculares
7. Positividad: Membrana

▲ IgD [NI158]

1. Método: ABC o FA
2. Recuperador: Pepsina a 37°C por 5 minutos
3. Tejido Testigo: Amígdala
4. Especificaciones: Incubación de Ac primario: 2 horas a 37 grados centígrados
5. Células normales: Células plasmáticas reactivas. También puede observarse en macrófagos, células de Reed-Sternberg sin que indique síntesis intracelular.
6. Células neoplásicas: Linfomas B plasmocitoides, Hiperplasia folicular reactiva, Linfomas foliculares
7. Positividad: Membrana

□ MICROORGANISMOS

▲ Citomegalovirus (CMV) []

1. Método: ABC o FA
2. Recuperador: No necesario
3. Tejido control: Tejido infectado por citomegalovirus. (pacientes inmunodeprimidos)

4. Positividad: Nucleo y citoplasma (durante la reproducción viral)

▲ LMP-1 Epstein-Barr virus (EBV) [CS 1-4]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o antigen retrieval
3. **Tejido control:** Ganglio linfático con Linfoma de Hodgkin o con mononucleosis infecciosa
4. **Células neoplásicas:** carcinoma de nasofaringe asociado a EBV, Linfoma de Hodgkin asociado a EBV (no reacciona con linfoma de Burkitt asociado a EBV)
5. **Positividad:** Membrana, citoplasma y perinuclear

▲ Papilomavirus (VPH) [policlonal]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido control:** Tejido infectado por VPH (Condiloma acuminado)
4. **Positividad:** Nucleo y perinuclear (células coilocíticas)

□ NEOPLASIAS, asociados a

▲ Alfa-fetoproteína (AFP) [C3]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario.
3. **Tejido control:** Carcinoma embrionario, Hepatoma, Hígado fetal.
4. **Células normales:** Hepatocitos fetales.
5. **Células neoplásicas:** Carcinomas hepatocelulares, Tumores de saco amniótico, tumores de células germinales +/-
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ CEA (Antígeno carcinoembrionario) (CD66e) [TF3H8-1]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido control:** Carcinoma de colon
4. **Células normales:** Mucosa de colon, células foveolares de la mucosa gástrica

5. **Células neoplásicas:** Adenocarcinoma colónico, gástrico e intestinal. Además se ha observado en carcinomas de glándula mamaria, endometrio, cervix, ovario, pulmón, vesícula biliar y páncreas. (diferencial de adenocarcinoma prostático, tiroideo y de mesoteliomas)
6. **Positividad:** Citoplasma / apical membrana (asociado a la mucina)

NEUROENDOCRINOS

▲ Cromogranina A [LK2H10]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Control:** Apéndice o Páncreas
4. **Células normales:** Gránulos secretores de las células endócrinas (paratiroides, médula adrenal, adenohipófisis, islotes de Langerhans en páncreas, células C de tiroides)
5. **Células neoplásicas:** Carcinoma de células de Merkel, Neuroblastomas, Carcinomas pulmonar de células de avena, Tumores endócrinos pancreáticos, Adenomas hipofisarios, Feocromocitomas, Carcinoma medulares de tiroides
6. **Positividad:** Citoplasma (asociado a los gránulos)

▲ Sinaptofisina [Snp88]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0
3. **Tejido Testigo:** Páncreas (islotes de Langerhans)
4. **Células normales:** Células neuroendócrinas
5. **Células neoplásicas:** Neoplasias neuroendócrinas de origen nervioso y epitelial. No reacciona con melanomas
6. **Positividad:** Membrana

NEURONALES

▲ Enolasa neurona específica (NSE) [M16-N3]

1. **Método:** ABC o FA

2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido control:** Apéndice cecal o Páncreas
4. **Células normales:** Neuronas, Células neuroendócrinas, Células de plexos entéricos, Fibras nerviosas mielinizadas y no mielinizadas, Músculo liso y estriado, Linfocitos T, Megacariocitos, Plaquetas.
5. **Células neoplásicas:** Gangliomas, Paragangliomas, Carcinoma pulmonar de células de avena, Melanomas, Astrocitomas, Oligoastrocitomas, Glioblastomas, Meningiomas, Sarcomas menínges, Schwannomas, Neuroblastoma, Feocromocitoma, Carcinomas neuroendócrinos, Carcinoma de ovario, riñón, glándula mamaria, Seminoma, Cordoma, Leiomiomasarcoma, Rhabdomyosarcoma, Sarcoma alveolar, Linfoma, Melanoma
6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **S-100, proteína [15E2E2]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** No necesario
3. **Tejido Testigo:** Apéndice cecal o nervio periférico
4. **Células normales:** Células gliales, ependimarias, de Schwann, Condrocitos, Células mioepiteliales., Melanocitos, Células de Langerhans, Células reticulares interdigitantes, Músculo estriado, Mesotelio reactivo, Adipocitos.
5. **Células neoplásicas:** Schwannomas, Ependimomas, Astrogliomas, Glioblastomas, Neoplasias de glándula salival, Nevos, Melanomas, Liposarcoma., Histiocitosis de células de Langerhans, Sarcoma de células dendríticas.
6. **Positividad:** Citoplasma y núcleo (proteína transportadora de calcio)

□ **ONCOGENES**

▲ **bcl-2, proteína [100]**

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o antigen retrieval
3. **Tejido testigo:** Linfomas
4. **Células normales:** Tejido linfoide (ausente en células linfoides proliferativas), Linfocitos B pequeños de la zona del manto

5. **Células neoplásicas: Neoplasias linfoproliferativas:** Linfoma folicular (t14-18), Linfomas T y B de alto grado, Linfoma linfoblástico y Linfoma de células grandes anaplásico. (diferencial de hiperplasia folicular)

6. **Positividad:** Citoplasma

▲ **c-erbB-2, oncoproteína [Her2/neu]**

1. **Método:** ABC o FA

2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0

3. **Tejido Testigo:** Carcinoma mamario de conductos

4. **Células normales:** (?)

5. **Células neoplásicas:** Carcinomas de glándula mamaria, ovario, útero y tracto gastrointestinal

6. **Positividad:** Membrana

▲ **Ciclina D1 (bcl-1, proteína) [G124-326]**

1. **Método:** ABC

2. **Recuperador:**

3. **Tejido Testigo:** Linfoma de células del manto

4. **Células normales:** Células en fase G1 del ciclo celular.

5. **Células neoplásicas:** Linfoma de células del manto (t11-14), Tumores mamarios +/-

6. **Positividad:** Núcleo

▲ **p53, Gen supresor de la [D07]**

1. **Método:** ABC o FA

2. **Recuperador:** Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o antígen retrieval

3. **Tejido control:** Tumores anaplásicos

4. **Células normales:** (?)

5. **Células neoplásicas:** Mama, Colon, Ovario, Pulmón, Hígado, Mesenquimales, Vejiga y de origen mieloide etc.

6. **Positividad:** Núcleo

□ PROTEÍNAS ASOCIADAS AL CICLO CELULAR

▲ Ki-67 [Ki88]

1. Método: ABC o FA
2. Recuperador: Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o antigen retrieval
3. Tejido Testigo: Apéndice cecal
4. Especificaciones: Incubación del 1er anticuerpo durante 2 horas
5. Células normales: Células en proliferación (G1, S, G2 y M)
6. Células neoplásicas: Neoplasias con alto índice de proliferación
7. Positividad: Núcleo

▲ PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular) [PC10]

1. Método: ABC o FA
2. Recuperador: Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o antigen retrieval
3. Tejido Testigo: Apéndice cecal
4. Células normales: Células en proliferación.
5. Células neoplásicas: Neoplasias con alto índice de proliferación
6. Positividad: Núcleo (asociado a la proteína nuclear ácida que aparece durante la fase S y es esencial para la síntesis de DNA)

□ PROTEÍNAS EXTRACELULARES

▲ Colágena IV [CIV22]

1. Método: ABC o FA
2. Recuperador: Citrato de Sodio 0.1M, pH 6.0 o antigen retrieval
3. Tejido Testigo: Riñón o cualquier tejido que tenga membranas basales.
4. Células normales: Colágena IV de las membranas basales. En riñón reacciona además con las células mesangiales y con la matriz dentro de los glomérulos.
5. Células neoplásicas: Carcinomas invasores (se denota la pérdida de la m. basal)
6. Positividad: Fibras de colágena

□ RECEPTORES HORMONALES

▲ Estrógenos (ER) [1D5]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Antigen-retrival, Target-retrival o Citrato de sodio 0.1M, pH 6.0. Dos tiempos de 6 minutos de en horno de microondas a alta temperatura ó 40 minutos a 95°C
3. **Tejido Testigo:** Carcinoma de glándula mamaria
4. **Células normales:** Glándula mamaria, Endometrio
5. **Células neoplásicas:** Carcinomas de glándula mamaria, Ca. de Ovario, Ca de endometrio, Ca de tiroides.
6. **Positividad:** Núcleo

▲ Progesterona (PR) [1A6]

1. **Método:** ABC o FA
2. **Recuperador:** Antigen-retrival, Target-retrival o Citrato de sodio 0.1M, pH 6.0. Dos tiempos de 6 minutos de en horno de microondas a alta temperatura ó 40 minutos a 95°C
3. **Tejido Testigo:** Carcinoma de glándula mamaria
4. **Células normales:** Células epiteliales de mama, útero
5. **Células neoplásicas:** Carcinomas mamarios.
6. **Positividad:** Núcleo

RECOMENDACIONES

Este escrito se dirige a todas aquellas personas interesadas en introducir alguna de los métodos antes descritos, ya sea para diagnóstico de enfermedades, identificación de estructuras celulares o investigación; tomando en cuenta que, a cada técnica le corresponde un protocolo general y se puede modificar de acuerdo a la muestra y a las necesidades de cada lector.

Debido a que se presenta un pequeño resumen sobre lo que es la inmunología y las células que integran el sistema inmune, también esta dirigido como material de apoyo para los profesores y alumnos de la materia de inmunología, patología, laboratorio clínico y reproducción.

APÉNDICE

❑ **Formol amortiguado al 10%**

Formaldehído al 37-40% (Q.P).....	100 c.c
Agua destilada.....	900 c.c
Fosfato de sodio monobásico.....	4 g
Fosfato de sodio dibásico (anhidro).....	6.5 g

❑ **PBS (Fosfato salino amortiguado) pH .. 7.6**

Cloruro de sodio (NaCl).....	7.75 g
Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4).....	1.5 g
Fosfato de potasio monobásico ($KHPO_4$).....	0.2 g
Agua desionizada.....	1000 c.c

❑ **Hematoxilina de Mayer**

Agua destilada.....	1000 c.c
Hematoxilina.....	1.0 g
Sodio iodatado.....	0.2 g
Aluminio de amonio o potásico.....	50.0 g
Acido cítrico.....	1.0 g
Hidrato de cloral.....	50.0 g

Se disuelve la hematoxilina en el agua utilizando calor leve si es necesario. Se adiciona el aluminio y se revuelve hasta que se disuelva. Se adiciona entonces el ácido cítrico y finalmente el hidrato de cloral.

Tabla 1. dilución 1:25 en solución al 25% metanol

Ácido cítrico M/10	Fosfato disódico M/5	pH
6.0	14.0	6.5
5.5	14.5	6.6
5.0	15.0	6.8
4.5	15.5	6.9
4.0	16.0	7.0
3.5	16.5	7.1
3.0	17.0	7.2
2.5	17.5	7.3
2.0	18.0	7.4
1.5	18.5	7.5
1.0	19.0	7.7
0.5	19.5	8.0

Tabla 2. Mezcla de sales secas de fosfatos de Sörensen, calculados en base al 1% (M/15)

Na ₂ HPO ₄ (mg)	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (mg)	Na ₂ HPO ₄ (mg)	KH ₂ PO ₄ (mg)	pH
323	677	326	674	6.5
382	618	385	615	6.6
439	561	442	558	6.7
498	502	502	498	6.8
558	442	561	439	6.9
618	382	621	379	7.0
672	328	676	324	7.1
726	274	728	272	7.2
773	227	775	225	7.3
812	188	815	185	7.4
845	155	847	153	7.5
873	127	875	125	7.6
897	103	898	102	7.7
917	83	918	82	7.8
934	66	935	65	7.9
949	51	949	51	8.0

Tabla 3. HCl citrato de sodio bufferado, serie M/100

HCl (cc)	Citrato de Sodio (cc)	pH.
8	42	6.50
7	43	6.60
6	44	6.69
5	45	6.78
4	46	6.88
3	47	6.98
2	48	7.11
1	49	7.25
0	50	7.82

Tabla 4. Buffer de ácido maleico trihidroximetilaminometano de Gomori.

M/1 Acido maleico	M/1 Trihidroximetilaminometano	N/2 NaOH	Agua	pH
5	5	8	32	6.50
5	5	9	31	6.86
5	5	10	30	7.20
5	5	11	29	7.50
5	5	12	28	7.75
5	5	13	27	7.97

Tabla 5. Buffer alcalino de Holmes para sales de Plata.

M/5 H ₂ BO ₃	M/20 Na ₂ B ₄ O ₇ 10H ₂ O	pH
18	2	7.4
17	3	7.6
16	4	7.8
14	6	8.0

M/5 = 12.4 Gm

M/20 = 19.0 Gm

Tabla 6. Fosfatos de Sørensen a dilución de M/10, M/15 y M/200.

KH ₂ PO ₄ ó Na H ₂ PO ₄ H ₂ O (cc)	Na ₃ H PO ₄ (cc)	pH dilución M/10	pH dilución M/15	pH dilución M/200
38	12	-	-	6.51
37	13	-	-	6.56
36	14	-	-	6.61
35	15	-	-	6.65
34	16	-	-	6.68
33	17	-	-	6.72
32	18	-	6.53	6.75
31	19	6.53	6.56	6.79
30	20	6.55	6.59	6.82
29	21	6.58	6.63	6.86
28	22	6.61	6.68	6.91
27	23	6.65	6.72	6.95
26	24	6.70	6.76	7.00
25	25	6.76	6.81	7.05
24	26	6.81	6.86	7.09
23	27	6.84	6.91	7.13
22	28	6.87	6.94	7.16
21	29	6.89	6.96	7.18
20	30	6.91	6.98	7.20
19	31	6.94	7.01	7.22
18	32	6.97	7.03	7.25
17	33	7.00	7.05	7.28
16	34	7.02	7.07	7.31
15	35	7.06	7.11	7.34
14	36	7.10	7.15	7.38
13	37	7.14	7.20	7.41
12	38	7.19	7.24	7.45
11	39	7.24	7.28	7.51
10	40	7.30	7.33	7.59
9	41	7.36	7.40	7.65
8	42	7.42	7.47	7.70
7	43	7.49	7.54	7.75
6	44	7.57	7.61	7.80
5	45	7.65	7.69	7.87

REFERENCIAS

1. ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. Inmunología Celular y Molecular. 2da ed. España. Interamericana-McGraw-Hill, 1995.
2. ARBER DA, WEISS LM; CD15. A review. Appl Immunohistochem 1(1):17-30,1993
3. BACHI CE et al. CD45. A review, Appl Immunohistochem 4(2):73-85,1996
4. BASURTO FJ. Breve Descripción del Proceso Inflamatorio y su Participación en la Respuesta Inmune. Simposium de Enfermedades Infecciosas y Su Prevención en Perros y Gatos. Ayo 1996. México, D.F. U.N.A.M. División de Educación Continua; Holland México y M.E.V.E.P.E.S.
5. BASURTO FJ. Mecanismos de Presentación de Antígenos y su Influencia Sobre el Tipo de Respuesta Inmune. Simposium de Enfermedades Infecciosas y Su Prevención en Perros y Gatos. México 1996. U.N.A.M. División de Educación Continua; Holland México y M.E.V.E.P.E.S.
6. BASURTO, F.J; Efectos de las Subpoblaciones de Linfocitos Sobre la Respuesta Inmune. Simposium de Enfermedades Infecciosas y Su Prevención en Perros y Gatos. Mayo 1996. U.N.A.M. División de Educación Continua; Holland México y M.E.V.E.P.E.S.
7. BIBERFELD P, GHETIE V, SJÖQUIST J. Demonstration and Assaying of IgG Antibodies in Tissues and on Cells by Labeled Staphylococcal Protein A. J of Immuno. Meth. 6: 249-259 1975.
8. BioGenex; Molecular and cellular pathology products, CA, USA, 1998
9. BRANCROFT JD, STEVENS A, TURNER DR. Theory and Practice of Histological Techniques. 3ra ed. Great Britain. Churchill Livingstone, 1990.
10. BRUCE A. et al. Biología Molecular de la Célula. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. 1987.
11. CHANG KL, ARBER DA, WEISS LM. CD30. A review. Appl Immunohistochem 1(4):244-255,1993.
12. CHANG KL, ARBER DA, WEISS LM. CD20. A review. Appl Immunohistochem 4(1):1-15,1996.

13. DAKO. Catálogo internacional, CA, USA, 1998.
14. DE ROBERTIS EDP, DE ROBERTIS EMF. *Biología celular y molecular*. Barcelona, España. El Ateneo S.A, 1987.
15. DICKSON RB, WILLINGHAM MC, PASTAN I. $\alpha 2$ - Macroglobulin Absorbed to Coloidal Gold: A New Probe in the Study of Receptor-mediated Endocytosis. *J. of Cell Biology*, 89: 29-34. 1981.
16. DUBOIS-DALCQ M, MCFARLAND H, MCFARLIN D. Protein A-Peroxidase: A Valuable Tool for the Localization of Antigens. *J. of Histochemistry and Cytochemistry*. 25 (11): 1201-1206. 1977.
17. FELSBURG P. Sistema inmunitario. En: Hoskins J. *Pediatría Veterinaria Perros y Gatos*. México. Interamericana McGraw-Hill, 1993.
18. HENDERSON DC, SMITHYMAN AM. The simultaneous detection of two protein antigens in lymphoid tissues by combining immunofluorescence and autoradiography. *J. Immunol Methods*. 6:115. 1974.
19. KIERNAN JA. *Histological and Histochemical Methods*. Reino Unido. Pergamon press, 1981.
20. KONNO A, et al. Expression of $\gamma \delta$ T cell receptor on caprine globule leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology. Appl Immunohistochem*; 48: 105-112. 1995.
21. LARSSON LI. Tissue preparation methods for light microscopic immunohistochemistry, *Appl Immunohistochem* 1(1):2-16, 1993.
22. LECHAGO J, SUN NC, WEINSTEIN WM. Simultaneous visualization of two antigens in the same tissue section by combining immunoperoxidase whit immunofluorescence techniques. *J. Histochem Cytochem*; 27: 1221. 1979.
23. LEONG ASY, MILIOS J, TANG SK. Is immunolocalization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in paraffin sections a valid index of cell proliferation? *Appl Immunohistochem* 1(2):127-135, 1993.
24. LILLIE RD. *Histopatologic technic and practical Histochemistry*. USA. *Mc Graw Hill*, 1954
25. MARTINEZ SAG. *Anatomía del Sistema Inmune*. Curso de Inmunología en Pequeñas Especies. Auditorio Principado México, D.F. 1997. U.N.A.M.

26. MIKEL UV. Advance laboratory methods in histology and pathology. Armed Forces Institute of Pathology, 1994
27. MONTAÑO JA. Diagnóstico de la Rabia. Simposium de Enfermedades Infecciosas y Su Prevención en Perros y Gatos. México, D.F. Mayo 1996. U.N.A.M. División de Educación Continua; Holland México y M.E.V.E.P.E.S
28. MORILLA GA. Inmunología Veterinaria. 1a ed. México. Editorial Diana, 1989.
29. MULTHAAPT HAB. In situ hybridization and its applicattions. USA. Pennsylvania, 1993.
30. MURPHY P. The Neutrophil. New York, Plenum Medical Book Company, pp 1-5. USA 1976
31. NAISH SJ, et al. Immunohistochemical staining methods, DAKO, CA, USA.1989
32. Novocastra Ltd; Catalogue 1997, NC, Reino Unido, 1997
33. ORTIZ HC, DE LEÓN B, DE LA VEGA G. Utilidad del CD34 en patología quirúrgica. Patología; 35:261-267. 1997
34. PEREZ M, MENDOZA GM, MENA LR, LUNA J, ROMANO PM. Linfocitos Del Útero De La Cabra Adulta: Un Estudio Histológico e Inmunohistoquímico Por Microscopía Con Focal. J. Reprod. Immunol. 17:71-75
35. RODRIGUEZ HA, et al. La inmunoperoxidasa: generalidades y evaluación de 500 casos. Rev. Fac. Med. U.N.A.M. 29(4):155-166. 1986.
36. ROOIJEN NV. Six Methods for Separate Detection of Two Different Antigens in the Same Tissue Section. 6(2): 79. 1979.
37. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios. Inmunohistoquímica, SMPV, México, 1997.
38. STICKLE JE. El neutrófilo: función, trastornos y ensayos, Lo Último en Patología. En Clínicas Veterinarias de Norteamérica. Interamericana-Mc Graw Hill. 5:1023-1031, México 1997.
39. STONE CH, et al; Immunocytochemical evaluation of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 (MIB-1), and p53 in predicting survival primary and metastatic malignant melanoma, Appl Immunohistochem 4(1):25-33. 1996.

40. VAN ROOIJEN N, STREEFKER JG. Autorradiography and immunohistoperoxidase techniques applied to the same tissue section. *J. Immunol Methods*; 10:379. 1976.
41. VASALLO J, et al. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Appl Immunohistochem*, 1(3):213-219. 1993.
42. WEISS LM, ARBER DA, CHANG KL. CD45. A review. *Appl Immunohistochem* 1(3):166-181. 1993.
43. WEISS LM, ARBER DA, CHANG KL. CD68. A review. *Appl Immunohistochem* 2(1):2-8. 1994.
44. WEISS LM. *Hematopathology*. IAP, CA, USA, 1997
45. WOLF HF. *El Cerebro Móvil de la Inmunidad al Sistema Inmune*. 1º ed. México, D.F. Fondo de Cultura Económica. 1997.
46. YOUNG BR, et al. CD31. A immunoespecific marker for endothelial differentiation in human neoplasms. *Appl Immunohistochem* 1(1):97-100. 1993.

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:

Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología.

Laboratorio de Virología Veterinaria.

Biblioteca de la F.E.S.-Cuautitlán

Biblioteca Central de C.U.

Biblioteca de la U.A.E.M.