



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**

CARRERA DE BIÓLOGO

**“APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENOS
EN EL DIAGNÓSTICO DE PATOLOGÍAS EN EL
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SXXI.”**

T E S I S
INFORME ESCRITO PARA TITULACIÓN
POR EXPERIENCIA PROFESIONAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
Q U E P R E S E N T A :
FRANCISCO MARTÍNEZ ESPINOSA

ASESOR: M. en C. JORGE HERNANDEZ MONTEZ

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2008



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.

PARA TI...BLANCA
GRACIAS

*ES PORQUE TE AMO
Y NO SOLO POR ESO DEBO
DE DEJAR DE RECONOCER LO IMPORTANTE
QUE ERES EN MI VIDA..*

*PORQUE ERES MÁS QUE UNA COMPAÑERA,
MÁS QUE UNA AMIGA,
POR QUE SABES SER TÚ MISMA
SIN DEJAR DE SER MÍ COMPLEMENTO..*

*GRACIAS POR DARME MOMENTOS
DE FELICIDAD Y DE ENOJO,
PORQUE DE QUE SERVIRÍA AMARTE SOLO
EN LOS BUENOS MOMENTOS..*

*GRACIAS POR COMPARTIR CONMIGO
LA DICHA DE SER PADRES
DE ESTE HIJO TAN ESPECIAL
Y HERMOSO QUE TENEMOS..*

*ES DIFÍCIL SABER CON QUIEN COMPARTIR LA VIDA,
ES DIFÍCIL SABER A QUIEN AMAR EN LA VIDA,
PERO ES MÁS DIFÍCIL PODER LOGRAR
LAS DOS COSAS EN LA MISMA VIDA..*

*GRACIAS BLANCA ESTHER
POR QUE ASÍ ES.....*

TE AMO

RUBÉN, HIJO MIÓ...

Quisiera poder contarte miles de historias fantásticas y reales, darte miles de consejos, saber todas las respuestas a las preguntas que tengas, quisiera poder orientarte en la vida para que tengas una vida buena y tranquila... quiero y espero que dios me preste vida para poder hacerlo de la mejor manera posible, pero déjame decirte amado hijo que aunque ya haga todo esto, solo tu y solamente tu tomaras las decisiones en tu vida, para llevar la vida que tu quieras...

Los primeros tres consejos que puedo darte son:

- Respétate a ti mismo y a los demás
- Estudia que el saber te hará libre
- Vive la vida, que no solo se trata de ganar dinero o ser “alguien” en la vida, sino que seas tú en esta vida...

Te amo querido hijo, se feliz y escucha a tu corazón...

Tú papa

Paquito

AGRADECIMIENTOS

A mi mama por el apoyo, por tu paciencia y amor que siempre me brindaste para seguir estudiando,

A mis hermanos

A mis amigos(as) del pasado y del presente por lo que me enseñaron en la vida, no me olvido de ninguno pero se que si escribo todos sus nombres, la lista siempre estaría incompleta.

A mis maestros de los que siempre aprendí algo

A los compañeros de trabajo que me apoyaron en la realización de mis estudios en especial a la Sra. Ma. Helena y el Sr. Manuel, compañeros de intendencia del laboratorio central del hospital general del CMN "La Raza".

A los médicos patólogos del departamento de anatomía patológica de hospital de especialidades "Bernardo Sepúlveda" del CMN SXXI, en especial a la Doctora Roció Arreola, a la Doctora Luz Maria Gómez por sus revisiones y aportaciones, el Doctor Enrique Blanco y a la Dra. Lourdes Cabrera M. por sus aportaciones...

A los alumnos y compañeros con dudas y en busca de asesoría, ya que he podido por bien enseñar, de los cuales aprendí mucho, en especial a los 8 maras, que más que alumnos los considero mis amigos...

A Dios por que me has dado el libre albedrio de que hacer con mi vida y de vivirla,
Por las bendiciones y las pruebas....gracias

Para Mí:

Se que el camino ha sido difícil, que mucho pensabas en que no lo lograrías o el por que después de tanto tiempo lo has hecho, si no fue en el tiempo y momento que debió ser...

Si no me conocieras, te diría que mucho ha sido parte de un anhelo de lo que Tu ser puede lograr, no es por lo que eres por estudiar o tener un titulo. Nunca ha importando, ni te has sentido sabio o erudito, se que te gusta aprender y estudiar para aplicar estos conocimientos en algo que sea para bien, nunca has creído en la medición de los conocimientos, pues siempre depende de cómo lo midas...

Tu vida te ha enseñado a comprender que se aprende de muchas maneras y en muchos aspectos, pues si dejas uno fuera nunca estarás completo, por lo que ahora quizás puedas entenderlo que esto ha sido un complemento nada mas y que debes continuar aprendiendo, en todos los aspectos de tu vida...

Felicidades Francisco, disfrútalo que sabes que te lo mereces, compártelo con tus seres queridos y sigue adelante en lo que te propongas....

Yo, Francisco

ÍNDICE

<i>ÍNDICE</i>	1
<i>INDICE DE ILUSTRACIONES</i>	3
<i>RESUMEN</i>	6
<i>SUMMARIZE</i>	7
<i>ABREVIACIONES</i>	8
1 INTRODUCCIÓN	2
2 MARCO TEÓRICO	5
2.1 CONCEPTOS BÁSICOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA	5
2.2 INMUNOLOGIA BASICA	6
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS	7
ESTRUCTURA GENERAL DE UN ANTICUERPO Y LOS ANTÍGENOS.	9
CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS	15
2.3 SISTEMAS DE DETECCION	18
ANTICUERPOS	19
ENZIMAS	19
CROMÓGENOS	19
CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE DETECCIÓN	23
2.4 IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS IMHQ EN EL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA	34
3 EXPERIENCIA PROFESIONAL EN DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA	41
3.1 CASOS RESUELTOS	41
3.2 RESEÑA DE ACTIVIDADES	49
ACTIVIDADES GENERALES	50
ESPECIFICAS TINCIONES ESPECIALES	51
INMUNOHISTOQUIMICA E INMUNOFLUORESCENCIA	52
ENSEÑANZA Y CAPACITACIÓN	54
3.3 ESTADISTICAS POR TIPOS DE CASOS	55
APENDICE TECNICO I	59
FACTORES QUE INFLUYEN EN LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS	59
POR TIPO DE MUESTRA	59
TINCION DE FONDO	60
INTERACCIONES HIDROFÓBICAS	60
INTERACCIONES IONICAS	63
ACTIVIDAD ENZIMATICA ENDÓGENA	63
ANTICUERPOS NATURALES Y CONTAMINANTES	64
AVIDINA- BIOTINA ENDOGENA	64
DIFUSIÓN DE ANTIGENOS	65
REACTIVIDAD CRUZADA	66
RECEPTORES FC	66
PROZONE	66
OTROS FACTORES	67

FACTOR HUMANO	67
APENDICE TECNICO 2	70
TEORÍA DE LA ESTANDARIZACIÓN	70
DILUCIONES, SUS MATEMÁTICAS Y SUS PROBLEMAS	73
MÉTODOS DE RECUPERACIÓN	76
TIEMPO DE INCUBACIÓN	77
TEMPERATURA DE TRABAJO	77
TESTIGO	78
ESTABILIZACIÓN DE ANTICUERPOS	78
REACTIVOS USADOS PARA ESTABILIZAR UN ANTICUERPO	78
EJEMPLO DE ESTANDARIZACIÓN	79
APENDICE TECNICO 3	81
MANEJO Y PREPARACIÓN DE LAS BIOPSIAS INCLUIDAS EN PARAFINA	81
PROTOCOLO DE IMHQ	81
PROCEDIMIENTO DE IMF	84
RECEPCIÓN DE LAS BIOPSIAS INCLUIDAS PARA CONGELACION	84
CORTE Y MONTAJE EN CONGELACIÓN	84
PROTOCOLO DE IMF	85
APENDICE TECNICO 4	86
REACTIVOS	86
ADHESIVO PARA PORTAOBJETOS IMF	86
ADHESIVO PARA IMQ	86
AMORTIGUADORES	88
VOCABULARIO	90
BIBLIOGRAFIA	92

INDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1 CÉLULAS SANGUÍNEAS, MOSTRANDO LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNITARIO. OBSÉRVESE EN PARTICULAR LAS CÉLULAS B Y T. TOMADO DE ABBAS, 2002	7
ILUSTRACIÓN 2 ESQUEMA ESTILIZADO DE UN ANTICUERPO MOSTRANDO LAS REGIONES GLOBULARES (SEÑALADOS POR LA FLECHA), POR LAS QUE TIENEN EL NOMBRE DE INMUNOGLOBULINAS. ADAPTADO DE GARCÍA, 1993. 7	
ILUSTRACIÓN 3 CONFIGURACIÓN GENERAL DE UN ANTICUERPO Y UN ANTÍGENO, MOSTRANDO LAS PARTES MAS IMPORTANTES DE INTERACCIÓN ENTRE LOS DOS (DETERMINANTES ANTIGÉNICOS Y SITIOS DE UNIÓN). TOMADO DE SALOMÓN, 1996.....	10
ILUSTRACIÓN 4 CONFORMACIÓN GENERAL DE UN ANTICUERPO EN SUS CADENAS PESADAS (H) Y LIGERAS(L), OBSÉRVESE LA DISTRIBUCIÓN REGIONAL DE SUS REGIONES CONSTANTES (C) Y VARIABLES (V) TOMADO DE ABBAS,2002.....	10
TABLA 1 TIPOS DE INMUNOGLOBULINAS Y SUS ISOTIPOS, TOMADO DE GARCÍA, 1997	11
ILUSTRACIÓN 5 ACCIÓN DE DIFERENTES ENZIMAS SOBRE UN ANTICUERPO, QUE PERMITEN SEPARAR DIFERENTES COMPONENTES, ADAPTADO DE GARCÍA, 1997.....	12
ILUSTRACIÓN 6 DESGLOSE DE UN ANTICUERPO SEGÚN SUS DIFERENTES COMPONENTES Y SUS FRACCIONES, ADAPTADO DE GARCÍA, 1997	12
ILUSTRACIÓN 7 SITIO ACTIVO DE UN ANTICUERPO BASADO EN TEXTO DE DAKO 2006.....	14
ILUSTRACIÓN 8 TIPOS DE SECUENCIAS DE UN DETERMINANTE ANTIGÉNICO O EPI TOPO SEGÚN LOS TIPOS DE CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA QUE PROVOCA LA REACCIÓN INMUNE, MODIFICADO DE GARCÍA, 1997.....	14
ILUSTRACIÓN 9 ESQUEMA GENERAL DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN DIRECTO, CONSTA DE UN SOLO COMPLEJO ANTÍGENO- CROMÓGENO (FLUOROCROMOS O CROMÓGENO); PUEDE SER TAMBIÉN UN METAL COMO EL ORO O PLATA . ADAPTADO DE GARCÍA DEL MORAL, 1993	23
ILUSTRACIÓN 10 ESQUEMA GENERAL DE LOS MÉTODOS INDIRECTOS DE DOS PASOS O TRES. ADAPTADO DE DAKO, 2006.....	24
ILUSTRACIÓN 11 MÉTODO DE IMF DIRECTA OBSÉRVESE QUE SOLO SE REPRESENTA UN FLOUROCROMO DE LOS MÚLTIPLES QUE SE PUEDE UNIR AL ANTICUERPO. ADAPTADO DE GARCÍA, 1997.....	25
ILUSTRACIÓN 12 MÉTODO DE INMUNO ORO DE DOS PASOS, EL MÉTODO DE UN SOLO PASO ES PARECIDO AL DE IMF ADAPTADO DE GARCÍA DEL MORAL, 1997	25
ILUSTRACIÓN 13 MÉTODO DE EPOS, TECNOLOGÍA DE UN SOLO PASO DEBIDO A QUE EL ANTICUERPO Y EL CROMÓGENO ESTÁN UNIDOS A LA MOLÉCULA DE POLÍMERO DEXTRANO , MODIFICADO DE DAKO, 2006	26
ILUSTRACIÓN 14 MÉTODO DE SÁNDWICH MOSTRANDO LA CARACTERÍSTICA DE QUE EL ANTÍGENO SE ENCUENTRA ENCLERADO ENTRE DOS ANTICUERPOS , SOLO FUNCIONA SI EXISTE EN EL TEJIDO EXPUESTO AL ANTÍGENO Y SE HA DESARROLLADO UNA RESPUESTA INMUNE. MODIFICADO DE GARCÍA DEL MORAL , 1993	26
ILUSTRACIÓN 15 MÉTODO DE COMPLEMENTO, OBSÉRVESE QUE EL SEGUNDO ANTICUERPO SE UNE A LA MOLÉCULA DE COMPLEMENTO Y NO AL PRIMARIO. MODIFICADO DE GARCÍA DEL MORAL , 1993	27
ILUSTRACIÓN 16 MÉTODO DE AVIDINA -BIOTINA ES DE TRES PASOS DEBIDO QUE EL COMPLEJO BIOTINA- CROMÓGENO-AVIDINA SE PREPARA EN UN PASO PREVIO A LA APLICACIÓN, EL SECUNDARIO ESTÁ UNIDO BIOTINA, SE HA MODIFICADO LA ILUSTRACIÓN PARA MOSTRAR SOLO UNO DE LOS MUCHOS PUNTOS DE UNIÓN CON BIOTINA Y EL TAMAÑO DEL COMPLEJO, MODIFICADO DE DAKO 2004.....	27
ILUSTRACIÓN 17 MÉTODO CON POLÍMERO DE DEXTRANO CON UN SOLO DE TIPO DE ANTICUERPO MONOCLONAL O POLICLONAL. MODIFICADO DE DAKO, 2006	28
ILUSTRACIÓN 18 MÉTODO DE POLÍMERO DE DEXTRANO EN EL CUAL HAY UNA COMBINACIÓN DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS MONOCLONALES Y POLICLONALES. MODIFICADO DE DAKO, 2006.....	28
ILUSTRACIÓN 19 MÉTODO HAPTENO-ANTI HAPTENO, OBSÉRVESE LA UNIÓN DEL SECUNDARIO A LA MOLÉCULA DE HAPTENO. MODIFICADO DE GARCÍA DEL MORAL, 1997	29
ILUSTRACIÓN 20 MÉTODO DE ESTRAPTIVIDADINA-BIOTINA, OBSÉRVESE LA DIFERENCIA CON EL MÉTODO ABC, EL LUGAR ESTA OCUPADO POR LA ESTRAPTIVIDADINA EN LUGAR DE AVIDINA, CON ESTE CAMBIO SE AVANZO MUCHO EN LA ELIMINACIÓN DE TINCIÓN DE FONDO EN TEJIDOS CON BIOTINA ENDÓGENA , MODIFICADO DE DAKO, 2006.	29
ILUSTRACIÓN 21 MÉTODO DE PEROXIDASA- ANTIPEROXIDASA , EN DONDE EL COMPLEJO SE APLICA COMO UN TERCIARIO, EL ANTICUERPO MAS IMPORTANTE EN ESTE SISTEMA ES EL ANTICUERPO SECUNDARIO O DENOMINADO PUENTE, YA QUE RECONOCE LA ESPECIE EN LA QUE ESTÁN FABRICADO EL PRIMARIO Y EL TERCIARIO. MODIFICADO DE GARCIA DEL MORAL, 1997.....	30

ILUSTRACIÓN 22 SISTEMA APAAP PARECIDO AL ANTERIOR (PAP), SOLO QUE NO ES UN COMPLEJO EL QUE SE APLICA SI NO UN ANTICUERPO QUE RECONOCE AL CROMÓGENO COMO ANTIGENO MODIFICADO DE GARCIA DEL MORAL, 1997.....	30
ILUSTRACIÓN 24 MÉTODO DE HIBRIDO. ES UN SISTEMA QUE UTILIZA UN SECUNDARIO MODIFICADO, ARMADO A CONVENIENCIA, OBSÉRVESE QUE CADA COMPLEMENTO DEL ANTICUERPO HIBRIDO RECONOCE DIFERENTE ANTÍGENO. MODIFICADO DE GARCÍA DEL MORAL, 1997	31
ILUSTRACIÓN 25 FOTO DE PÁNCREAS (400X) SISTEMA <i>ENVISION</i> , HRP Y DAB, EJEMPLO DE MARCAJE CON ANTICUERPO PARA CROMAGRANINA A. EN DILUCIÓN 1:500. OBSÉRVESE MARCAJE GRANULAR CITOPASMÁTICO CARACTERÍSTICO DE ESTE ANTICUERPO. FOTO TOMADA POR EL AUTOR	32
ILUSTRACIÓN 26 FOTO DE TEJIDO TESTIGO (1000X), SISTEMA <i>ENVISION</i> , HRP Y DAB, EJEMPLO DE MARCAJE PARA CITOMEGALOVIRUS EN DILUCIÓN 1:100, OBSÉRVESE SU MARCAJE PRINCIPALMENTE EN NÚCLEO. FOTO TOMADA POR EL AUTOR.	32
TABLA 2. ANTICUERPOS PARA TUMORES POCOS DIFERENCIADOS (COLVIN, 1998).....	37
ILUSTRACIÓN 27 FOTO EJEMPLO DE TINCIÓN CON FLUORESCENCIA, RIÑÓN (400X), ZONA GLOMERULAR, DONDE SE OBSERVA LA TINCIÓN VERDE INTENSA SEÑAL DE DEPÓSITOS DE INMUNOGLOBULINAS (FLECHA AMARILLA, IGA), CONTRASTADA CON AZUL DE EVAN'S, QUE DA UNA COLORACIÓN ROJIZA. CORTESÍA DE LA DRA. M ^ª . DE LOURDES CABRERA MUÑOZ.....	39
FOTOGRAFÍA 1. NEOPLASIA CON PATRÓN DE NICHOS SÓLIDOS (CÍRCULO) (100X) RODEADOS DE PLEXOS VASCULARES (FLECHA) TINCIÓN DE HE. FOTOS CORTESÍA DE LA DRA. ROCÍO L. ARREOLA ROSALES Y DE LA DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ.....	43
FOTOGRAFÍA 2 DETALLE CITOLÓGICO (400X) DE NICHOS CON CÉLULAS GRANDES CON CITOPLASMA CLARO (FLECHA AZUL) RODEADAS POR CÉLULAS FUSIFORMES (FLECHA AMARRILLA) TINCIÓN DE HE. FOTOS CORTESÍA DE LA DRA. ROCÍO L. ARREOLA ROSALES Y DE LA DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ.....	43
FOTOGRAFÍA 3 TINCIÓN CITOPASMÁTICA (100X) CON IMHQ POSITIVA PARA CROMOGRANINA A (1:500) EN LAS ÁREAS DE NICHOS OBSERVADA EN EL HE. FOTOS CORTESÍA DE LA DRA. ROCÍO L. ARREOLA ROSALES Y DE LA DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ	43
FOTOGRAFÍA 4 CÉLULAS NEOPLÁSICAS (100X) CON IMHQ POSITIVA PARA SINAPTOFISINA (1:100). OBSÉRVESE LA TINCIÓN CITOPASMÁTICA. FOTOS CORTESÍA DE LA DRA. ROCÍO L. ARREOLA ROSALES Y DE LA DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ.....	43
FOTOGRAFÍA 5 CÉLULAS NEOPLÁSICAS CON TINCIÓN CITOPASMÁTICA (400X) CON IMHQ POSITIVA PARA ENOLASA NEURONAL ESPECIFICA (ENE, 1: 1000). FOTOS CORTESÍA DE LA DRA. ROCÍO L. ARREOLA ROSALES Y DE LA DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ	43
FOTOGRAFÍA 6 TINCIÓN CON REFERENCIA A FOTOGRAFÍA 2, CON CÉLULAS FUSIFORMES QUE DELIMITAN NICHOS TUMORALES (FLECHA ROJA)(400X) CON IMHQ PARA PROTEÍNA S-100 (1:10 000). FOTOS CORTESÍA DE LA DRA. ROCÍO L. ARREOLA ROSALES Y DE LA DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ	43
FOTOGRAFÍA 7 BAAF DE MEDULA ÓSEA (HE, 400X) OBSÉRVESE LAS CÉLULAS CENTRALES, QUE POR SU FORMA Y CANTIDAD NO SON USUALES EN MEDULA ÓSEA. FOTOGRAFÍA CORTESÍA DEL DR. ENRIQUE BLANCO L.	44
FOTOGRAFÍA 8 BAAF DE MEDULA ÓSEA CON IMHQ POSITIVO PARA CD-117 1:100 (400X) EN EL MISMO GRUPO DE CÉLULAS DE LA FOTOGRAFÍA 7, DETERMINÁNDOSE COMO CÉLULAS MASTOCITICAS, EL PREPARADO LLEGO PARA CITOLOGÍA, POR LO QUE HUBO QUE DESTIÑIR LA MUESTRA Y HACER EL PROCEDIMIENTO DE IMHQ CON TIEMPOS Y DILUCIONES PARA ESTE TIPO DE MUESTRAS. FOTOGRAFÍA CORTESÍA DEL DR. ENRIQUE BLANCO L.	44
FOTOGRAFÍA 9 LECHO DE ULCERA CON CÉLULAS NEOPLÁSICAS (CÍRCULO ROJO), NO SE IDENTIFICA MUCOSA DE YEYUNO (HE, 100X), CÉLULAS. FOTOS CORTESÍA DE LA DRA. ROCÍO L. ARREOLA ROSALES Y DE LA DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ.....	45
FOTOGRAFÍA 10 ACERCAMIENTO A ZONA DE CÍRCULO ROJO DELA FOTOGRAFÍA 9, DONDE SE OBSERVA LAS CÉLULAS CITOTROFOBLASTO Y SINCICITROFLOBLASTO (FLECHA AMARILLA) SIN FORMACIÓN DE VELLOSIDADES (400X) FOTOS CORTESÍA DE LA DRA. ROCÍO L. ARREOLA ROSALES Y DE LA DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ.....	45
FOTOGRAFÍA 11 CÉLULAS DE CITOTROFOBLASTO POSITIVAS PARA HORMONA GONADOTRÓFICA CORIÓNICA EN EL CITOPLASMA (1:1000, 400X) FOTOS CORTESÍA DE LA DRA. ROCÍO L. ARREOLA ROSALES Y DE LA DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ.....	45
FOTOGRAFÍA 12 BIOPSIA DE PIEL POR PUNCIÓN DE PACIENTE CON SOSPECHA DE LUPUS, CON MARCA POSITIVA PARA C3C EN ÁREA ADYACENTE DE LA DERMIS (FLECHA AMARILLA), CARACTERÍSTICA DE ESTA ENFERMEDAD. CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ.....	46
FOTOGRAFÍA 13 BIOPSIA DE PIEL POR PUNCIÓN DEL MISMO PACIENTE DE FOTOGRAFÍA 13 CON SOSPECHA DE LUPUS, MARCA POSITIVA PARA IGG EN ÁREA ADYACENTE DE LA DERMIS (FLECHA AMARILLA),	

<p>CARACTERÍSTICA DE ESTA ENFERMEDAD. CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ.....</p> <p>FOTOGRAFÍA 14 BIOPSIA DE RIÑÓN POR PUNCIÓN CON AGUJA FINA, ZONA GLOMERULAR CON MARCAJE POSITIVO A C3C (FLECHA BLANCA)CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ</p> <p>FOTOGRAFÍA 15 BIOPSIA DE RIÑÓN POR PUNCIÓN CON AGUJA FINA, ZONA GLOMERULAR CON MARCAJE POSITIVO A C1Q (FLECHA BLANCA)CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ</p> <p>FOTOGRAFÍA 16 BIOPSIA DE RIÑÓN POR PUNCIÓN CON AGUJA FINA, ZONA GLOMERULAR CON MARCAJE POSITIVO A IgM (FLECHA BLANCA) CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ</p> <p>FOTOGRAFÍA 17 BIOPSIA DE RIÑÓN POR PUNCIÓN CON AGUJA FINA, ZONA GLOMERULAR CON MARCAJE POSITIVO A IgG (FLECHA BLANCA) CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ</p> <p>FOTOGRAFÍA 18 BIOPSIA DE RIÑÓN POR PUNCIÓN CON AGUJA FINA, ZONA GLOMERULAR CON MARCAJE POSITIVO A IgG (FLECHA AMARILLA), TINCIÓN FOCAL. CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ</p> <p>FOTOGRAFÍA 19 BIOPSIA DE RIÑÓN POR PUNCIÓN CON AGUJA FINA, ZONA GLOMERULAR CON MARCAJE POSITIVO A C3C (FLECHA AMARILLA), TINCIÓN FOCAL. CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ</p> <p>FOTOGRAFÍA 20 ZONA GLOMERULAR CON MARCAJE POSITIVO A FIBRINÓGENO (FLECHA AMARILLA), TINCIÓN FOCAL. CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ</p> <p>FOTOGRAFÍA 21 ZONA GLOMERULAR CON MARCAJE POSITIVO A KAPPA (FLECHA AMARILLA), TINCIÓN FOCAL. CONTRASTE CON AZUL DE EVAN'S, (400X). FOTOGRAFÍA CORTESÍA DE LA DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ</p>	<p>46</p> <p>47</p> <p>47</p> <p>47</p> <p>47</p> <p>48</p> <p>48</p> <p>48</p> <p>48</p>
--	---

RESUMEN

La actividad del biólogo en el área biomédica esta ligada al diagnostico de enfermedades por medio de técnicas de biología molecular, estas técnicas usadas en los departamentos de anatomía patológica son los sistemas de detección de antígenos, comúnmente denominadas inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (IMHQ e IMF), la aplicación de estas técnicas y su valor diagnostico dependen de factores, que van desde los teóricos y técnicos hasta la experiencia del personal a cargo de realizar los procedimientos.

El presente trabajo pretende dar una visión de los aspectos teóricos y técnicos con respecto a la química, física, inmunología, anatomía, histología, histotecnología involucrada, para el dominio de los diferentes sistemas de detección que existen y su aplicación, así como también para la resolución problemas que se presentan en el procedimiento de IMHQ e IMF.

El conocimiento y quehacer profesional del biólogo al realizar los procedimientos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en un departamento de anatomía patológica se ve reflejado en los casos anatomopatológicos que se presentan, en estos se ven reflejadas las posibilidades de aplicación de las técnicas de detección de antígenos, que abarcan biopsias por punción y cortes congelado (riñón y piel), aspirados, extendidos e improntas de tejidos (medula ósea y tejido gástrico), tejidos incluidos en parafina fijados en formol (paraganglioma y coriocarcinoma), citologías, con los diferentes cambios en el método según el tipo de material.

SUMMARIZE

The activity of the biologist in the biomedical area this related to diagnose of diseases by means of techniques of molecular biology, these techniques used in the departments of pathological anatomy are the systems of detection of antigens, commonly denominated immunohistochemistry and immunofluorescence (IMHQ and IMF), the application of these techniques and their value in diagnose depend on factors, that go from the theoreticians and technicians to the experience of the personnel in charge of making the procedures.

The present work tries to give a vision of the theoretical and technical aspects with respect to chemistry, physics, immunology, anatomy, histology, histotechnology involved, for the dominion of the different systems from detection that exist and their application, as well as for the resolution problems that appear in the procedure of IMHQ and IMF.

The knowledge and professional task of the biologist when making the procedures of immunohistochemistry and immunofluorescence in a department of pathological anatomy are reflected in the anatomopatología cases that they appear, in these are reflected the possibilities of application of the techniques of detection of antigens, that include biopsies by puncture and cuts congealed (kidney and skin), inhaled, extended and stamps of weaves (bony marrow and gastric weave), woven including in paraffin fixed to formol (paraganglioma and coriocarcinoma), cytology, with the different changes in method according to the type of material.

ABREVIACIONES

ABC: COMPLEJO AVIDINA BIOTINA

AEC: AMINO ETIL CARBAZOL

AFIP: INSTITUTO PATOLOGIA DE LAS
FUERZAS ARMADAS

ALC: ANTÍGENO LUECOCITARIO COMUN

APAAP: FOSFATASA ALCALINA
ANTIFOSFATASA ALCALINA

BSA: ALBUMINA SERICA BOVINA

C1q_c: COMPLEMENTO UNO QU
COMPLEMENTO

C3_c: COMPLEMENTO TRES
COMPLEMENTO

C4_c: COMPLEMENTO CUATRO
COMPLEMENTO

CAS: COMPLEJO AMPLIFICACION DE
SEÑAL

CD: GRUPO DIFERENCIACION

CMN: CENTRO MEDICO NACIONAL

CMV: CITOMEGALOVIRUS

DAB: AMINO BENZIDINA

DAPI: 4,6-DIAMINO

DIF: DIFERENCIAL

EMA: ANTÍGENO EPITELIAL DE
MENBRANA

EPOS:

F(ab)₂ : FRACCION AB DOBLE

FITC: ISOCIANATO DE FLUORECEINA

GAFP: PROTEINA GLIAL ACIDOFILA
FIBRILAR

HRP: PEROXIDAS DE RABANO PICANTE

Ig : INMUNOGLOBULINA

IMF: INMUNOFUORESCENCIA

IMHQ : INMUNOHISTOQUIMICA

IMSS: INTITUTO MEXICANO DEL SEGURO
SOCIAL

INDIF: INDIFERENCIADO

K: KAPPA

L: LAMBDA

LMP1-EBV: EPSTEIN'S BARR VIURS CEPA
LMP1

LSAB: MARCAJE ESTREPTADIVINA
BIOTINA

ME: MISCROSCOPIA ELECTRONICA

NF: NEUROFILAMENTOS

NK: NATURAL KILLER

PAP: PEROXIDASA ANTIPEROXIDASA

PBS: AMORTIGUADOR DE FOSFATOS

SAB: ESTREPTAVIDINA BIOTINA

1 INTRODUCCIÓN

Se puede definir al desarrollo profesional como todas aquellas actividades y problemas a los que se enfrenta un egresado de cualquier licenciatura en las áreas donde desempeña su trabajo, aplicando en su labor diaria, de manera práctica, los conocimientos adquiridos durante sus estudios para obtener soluciones en dicha actividad.

Para un egresado de la carrera de Biólogo este desarrollo profesional puede abarcar diferentes ramas, que pueden incluir estrategias experimentales o aplicadas, en humanos, plantas, animales o incluso especies extintas, abordando múltiples aspectos de estudio (UNAM, 1980). Por tanto, son diversos los nichos que puede ocupar profesionalmente un biólogo, abarcando las áreas de la educación, de la industria, y en instituciones y otras áreas de gobierno. (Salomón, 1996)

Dentro de todos estos nichos existen los directamente involucrados con las ciencias de la salud (ciencias biomédicas) y dentro de la gran gama de posibilidades, una fracción de ellas corresponden a las aplicaciones dirigidas al diagnóstico de enfermedades o tumores de pacientes, que son comprobados y/o avalados con ayuda de técnicas desarrolladas por la biología molecular.

Entre dichos métodos ocupan un lugar importante los basados en la detección antigénica (mejor conocidos como de *inmuno-localización*), es decir, aquellos que utilizan la reacción antígeno-anticuerpo, referidas comúnmente como inmunohistoquímica (IMHQ) e inmunofluorescencia (IMF) en tejidos fijados y seccionados. Se ocupan como técnicas de apoyo para la diferenciación o la confirmación de patologías en biopsias o piezas histológicas que se reciben en el departamento de anatomía patológica, pues permiten diferenciar de manera específica el tipo de célula de origen y el grado de des-diferenciación de las mismas, sobre todo cuando es difícil hacerlo solamente por criterios morfológicos (García Tamayo, 1997).

En el IMSS, estas técnicas se usan principalmente en los departamentos de patología de hospitales de 3er nivel de atención (IMSS, 2004), y también se realizan en protocolos de investigación en los diferentes laboratorios que para este fin cuentan los cuatro hospitales del Centro Médico Nacional SXXI.

Estas técnicas son llevadas a cabo principalmente por personal técnico denominado histotecnólogo, y el biólogo es un profesional que puede llevar a cabo estas técnicas adecuadamente debido a que está ampliamente involucrado en los aspectos teóricos y prácticos, entiende los conceptos y las características de los materiales y reactivos que se usan, y por tanto, es capaz de estandarizar, ejecutar y optimizar los protocolos correspondientes; esto es importante, pues dicha actividad tiene una gran relevancia en el diagnóstico de los procesos fisiológicos y tumorales en las biopsias recibidas, ya que influyen en la vida de un paciente, al determinar los diagnósticos y posibles tratamientos a seguir por los médicos en los padecimientos o enfermedades que son tratados.

Las técnicas de inmuno-localización han tenido un auge en los últimos años, debido a los avances en la obtención de anticuerpos más específicos, por el avance en los métodos de desenmascaramiento (recuperación) de antígenos en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (procedimiento habitual en el departamento de anatomía patológica), así como a la existencia de nuevos métodos de detección y reactivos bloqueadores de proteínas que ayudan a que se tenga menos tinción de fondo, por lo que se han hecho posible que sean más rápidas, sencillas, repetibles y baratas de realizar. (Dako, 2006)

También se ha avanzado en el uso práctico en el diagnóstico de enfermedades, ya que un sin número de estudios de investigación realizados se ha logrado tener un panorama general de los antígenos expresados en cada una de las patologías más comunes, lo que permiten tener paneles de diferenciación tumoral, así como los antígenos específicos en donde el diagnóstico lo da un anticuerpo que

solo expresan estas enfermedades para su diagnóstico (Colvin, 1995, Bennigton, 1986, Rodríguez, 2005)

A continuación, se presenta una amplia descripción de las actividades relacionadas con mi desarrollo profesional en 8 años de experiencia laboral en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Especialidades del CMNSXXI.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 CONCEPTOS BÁSICOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Los conceptos básicos involucrados en las técnicas de inmunohistoquímica implican varias disciplinas como lo son la inmunología, la física, la química, la histología, etc., aunque se debe entender que se encuentran interrelacionados para optimizar la ejecución de las técnicas de IMF e IMHQ, y así obtener resultados confiables y reproducibles.

El concepto de antígeno-anticuerpo es ampliamente abordado en inmunología y se aplica en múltiples ramas de investigación para estudiar las propiedades y el funcionamiento celular así como las interacciones entre ellas (Abbas, 2002). Asimismo, la aplicación de estas técnicas en los departamentos de patología e investigación en hospitales ha demostrado una gran utilidad, ya que sirven para detectar diferentes estructuras, sustancias específicas, microorganismos y virus en tejidos y células y asociarlos a las enfermedades que padecen los pacientes.

Los resultados obtenidos pueden ser observados a través de algún tipo de microscopio, y para ello, este complejo sistema de localización usa anticuerpos, enzimas y cromógenos.

Así, la inmunología aporta conocimientos sobre las características, propiedades y funciones de los anticuerpos (Abbas, 2002); la histología nos da el conocimiento de los componentes normales y patológicos que conforman los diferentes tejidos (Cormark, 1984; Rubins, 1992) y las sustancias presentes en ellos.

En la física y en la química encontramos los conocimientos sobre las propiedades de los cromógenos para emitir luz fluorescente al ser excitados con luz ultra violeta y las propiedades de la luz para la observación en los microscopios (Rosk, 1995).

La reacción de los anticuerpos (inmunología), con ciertas sustancias llamadas cromógenos (química), que emiten luz fluorescente o reaccionan con enzimas (física, química), puede ser visualizada con el microscopio en cierta ubicación en los tejidos (histología) en los sitios donde esos anticuerpos se unen a los antígenos (nombre técnico dado a las sustancias que producen reacciones inmunológicas y que producen anticuerpos en contra de ellos) de las células o tejidos.

2.2 INMUNOLOGIA BASICA

El sistema inmunitario es el complejo de órganos y células que se ponen en acción para evitar la entrada de microorganismos o agentes extraños al interior del cuerpo y, si es rebasado, desencadenan una cascada de reacciones químicas y se liberan sustancias para neutralizarlos (García, 1997). El sistema inmunitario se compone por dos ramas principales para contrarrestar la entrada de agentes extraños:

1. **INNATA**, se nace con ella:

- ✚ Piel y mucosas
- ✚ Temperatura corporal
- ✚ Oxígeno
- ✚ Enzimas de los tejidos
- ✚ Fagocitosis
- ✚ Células NK
- ✚ Proteínas de fase aguda

2. **ADQUIRIDA**, se va desarrollando como resultado de la exposición al medio ambiente:

- ✚ **Sistema inmunitario mediado por células B**
- ✚ **Sistema inmunitario mediado por células T**

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

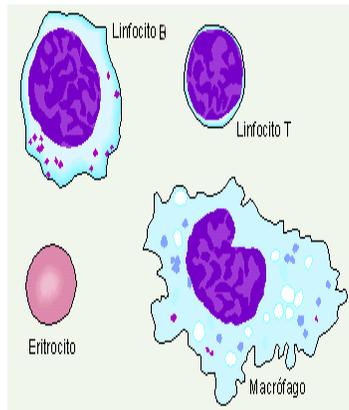


Ilustración 1 Células sanguíneas, mostrando los principales componentes del sistema inmunitario, obsérvese en particular las células B y T. Tomado de Abbas, 2002

El producto del sistema inmunitario mediado por células B es la base en que se sustentan los métodos de detección antigénica o de inmunolocalización.

El componente principal de los sistemas de detección son los anticuerpos: proteínas producidas por las células B del sistema inmunitario en respuesta a un antígeno, o elemento extraño.

Las proteínas secretadas por las células B se denominan **anticuerpos o inmunoglobulinas**, debido a que en su conformación estructural presentan una región repetida en forma de globo.

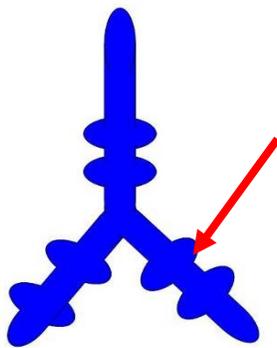


Ilustración 2 Esquema estilizado de un anticuerpo mostrando las regiones globulares (señaladas por la flecha), por las que tienen el nombre de inmunoglobulinas. Adaptado de García, 1993.

Tienen la propiedad de unirse a porciones definidas en los agentes extraños llamados **antígenos**, y poseen extremos con alta variabilidad por lo que pueden unirse a un amplio espectro de moléculas presentes en los agentes frente a los cuales ha respondido el organismo; estos anticuerpos que se secretan por los linfocitos B desatan una cadena de eventos que permiten marcar, fijar y eliminar estos agentes extraños del organismo.

Las células fagocíticas poseen receptores específicos para la fracción constante de los anticuerpos, y la unión de los complejos antígeno-anticuerpo por medio de estos receptores activa a los fagocitos y conduce a su destrucción. (García del Moral, 1993)

En un organismo vivo existen células B en diferentes estados de maduración, cada una presentando receptores de antígenos con una única afinidad y diferentes a los de las demás células, por lo que en conjunto representan una vasta capacidad de reconocimiento, o repertorio inmunológico. En forma simplificada podemos describir que una célula B al ser expuesta a un antígeno al que puede reconocer forman anticuerpos contra ese antígeno y se reproducen rápidamente dando como resultado células hijas, que también producen anticuerpos contra ese antígeno (teoría de la selección clonal); este proceso se da independientemente de que hayan sido reconocidos otros antígenos, por lo que en un organismo vivo hay anticuerpos contra una gran variedad de antígenos al mismo tiempo. (Cormark, 1986). Asimismo, cuando una célula B se ve expuesta al mismo antígeno posteriormente, monta una respuesta más rápida y más efectiva.

Este proceso que ocurre naturalmente, puede ser duplicado con fines clínicos o experimentales; así, si una sustancia en particular. Como la actina humana (filamento intermedio que forma parte de los músculos) es inoculada en un organismo diferente, por ejemplo conejo, éste produce una reacción inmunológica mediada por anticuerpos contra esa sustancia (García, 1997).

Estos anticuerpos pueden ser colectados en el suero del animal inoculado. A los anticuerpos obtenidos de esta forma se les denominan **policlonales**, debido a que provienen de diferentes células B originales y cada una produce un clon diferente que reconocen a la misma sustancia en diferentes epitopos¹ del antígeno; este suero tiene además otros anticuerpos que no son específicos para la sustancia inoculada, y por tanto es conveniente separarlos por algún método de purificación, por ejemplo cromatografía. Como no son totalmente puros, pueden causar problemas en la tinciones de inmuno-histoquímica (Dako, 2006) como la tinción de fondo (Background) (Prophet, 1995).

¹ zonas de proteína, formadas por 6 a 9 aminoácidos, que el anticuerpo reconoce para unirse a las proteínas, a la que son específicos los anticuerpos. Solo reconocen esa zona.

Existe otra forma de obtenerlos a partir de células cultivadas in Vitro. Por ejemplo, el método desarrollado por Köhler y Milstein en 1975, se basa en la fusión de dos tipos de células: células B (productoras de anticuerpos) y células transformadas (inmortales: p. Ej. mielomas de ratón)². Igualmente reconocen un antígeno de interés, pero cada clona es específica para una fracción del antígeno; cada clona puede ser aislada y como se reproduce a partir de una sola célula, la descendencia solo produce un tipo de anticuerpo que se colecta en el medio de cultivo sobrenadante que producen las células; éstos son más puros que los policlonales.

Se les denomina **monoclonales**, por venir de una sola clona de células B. (García del Moral, 1993), producen menos tinción de fondo, son más específicos y se pueden obtener por separados varias clonas para una misma sustancia (diferentes epitopos), por ejemplo: **Anti-Desmina humana/monoclonal, Clona 1A4** y **Anti-Desmina humana/monoclonal, Clona D33** (Marca Dako) reconocen una misma sustancia pero en diferentes epitopos³.

Los anticuerpos obtenidos de cualquiera de las dos formas se han ocupado en los métodos de inmunohistoquímica (IHMQ) e inmunofluorescencia (IMF) porque permiten la detección de moléculas específicas, para demostrar su papel como componentes celulares, o sustancias tisulares, y permiten detectar una posible diferenciación de líneas celulares en cortes histológicos de tejido congelado e incluido en parafina (fijado en formol). Estas técnicas son básicas en la biología general para investigación y en el diagnóstico en histopatología, y se denominan también de inmunolocalización. (Prophet, 1995)

ESTRUCTURA GENERAL DE UN ANTICUERPO Y LOS ANTÍGENOS.

En la figura 3 se ilustra la configuración general de un anticuerpo y sus componentes, y su estructura determina sus propiedades y su capacidad de acción

² Mieloma un tipo de tumor de células plasmáticas existen dos tipos: el tipo no secretante y el tipo secretante de inmunoglobulinas, que producen un solo tipo de inmunoglobulinas.

³ el primero requiere digestión enzimática con proteinasa K para reconocer a su epitopo, la segunda clona debe ser recuperada con amortiguador de citratos (pH 6.0) para reconocer su epitopo.

en el organismo, así como su aplicación en las técnicas IMHQ. Así mismo, son la base para comprender el procedimiento de las técnicas en sus diferentes pasos a seguir, las formas de hacer recuperación de antígenos, los tiempos de incubación, y los sistemas de detección.

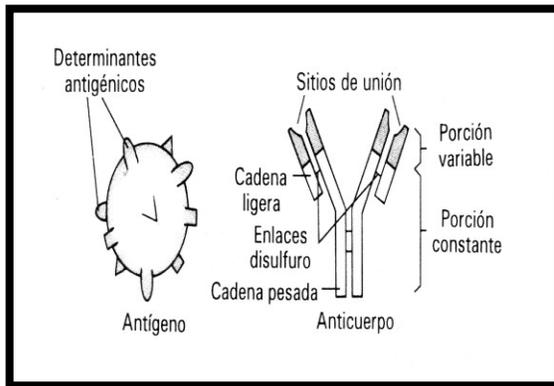


Ilustración 3 Configuración general de un anticuerpo y un antígeno, mostrando las partes mas importantes de interacción entre los dos (determinantes antigénicos y sitios de unión). Tomado de Salomón, 1996

Los anticuerpos constan de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas largas idénticas llamadas cadenas pesadas y dos cadenas cortas idénticas llamadas cadenas ligeras, que son mantenidas juntas por puentes disulfuro y enlaces no covalentes, con lo que así mantienen su estabilidad.

Cada cadena tiene un segmento constante (región C) y otro variable (región V), definidos por la secuencia de sus aminoácidos.

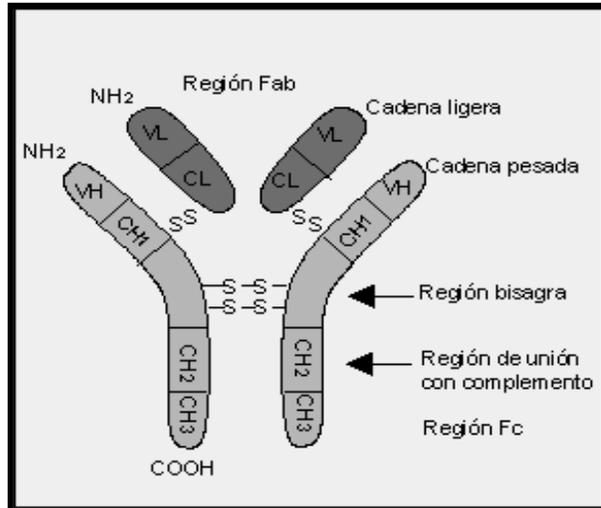


Ilustración 4 Conformación general de un anticuerpo en sus cadenas pesadas (H) y ligeras(L), obsérvese la distribución regional de sus regiones constantes (C) y variables (V) Tomado de Abbas,2002

Se conocen cinco disposiciones constantes, que dan nombre a los tipos de inmunoglobulinas conocidas (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) con pequeñas variaciones dentro cada tipo. Deben sus nombres a la velocidad de desplazamiento con que se mueven en cromatografía. A su vez, existen dos tipos de cadenas ligeras: kappa y lambda.

La cantidad de cada una de la inmunoglobulinas en el suero varía considerablemente, así como su tamaño, en sus variantes y en sus cadenas ligeras, en IMHQ e IMF, la mayor parte de los

anticuerpos monoclonales son **IgG₁ kappa**, debido a que es la que se encuentra en mayor cantidad, es pequeña y causa menor tinción de fondo en las técnicas.

No debe de perderse de vista cuándo se emplean inmunoglobulinas diferentes, pues las características de los anticuerpos usados es de vital importancia, como el Anti-**CD 30** que es una **IgM**: es una molécula más grande y por lo que tiene repercusiones en el tiempo de incubación (2 horas aprox.), debido a que no penetra tan rápidamente como las **IgG** (30 min. aprox.). Si no se toma en cuenta esto, no marcará o será débil el marcaje al ser revelado, pues hay poco anticuerpo unido al antígeno. Esto se explica más adelante en los factores que influyen en la técnica. (vease apéndice tecnico 1)

Tabla 1 Tipos de Inmunoglobulinas y sus Isotipos, Tomado de García, 1997

TIPO DE INMUNOGLOBULINAS	FORMAS	VARIANTES				CADENAS LIGERAS
IgG GAMMA	MONOMERICA	1	2	3	4	KAPPA
IgA ALFA	MONO Y DIMERICA	1		2		
IgM MU	PENTAMERO	NO TIENE VARIANTES				LAMBDA
IgD DELTA	MONOMERICA					
IgE EPSILON	MONOMERICA					



Molécula más usada en departamentos de anatomía patológica

Ilustración 5 Acción de diferentes enzimas sobre un anticuerpo, que permiten separar diferentes componentes, adaptado de García, 1997

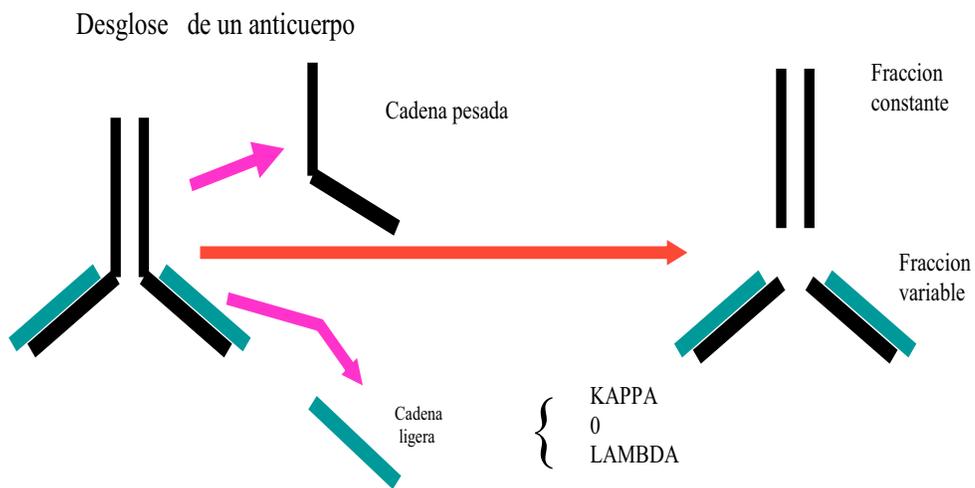
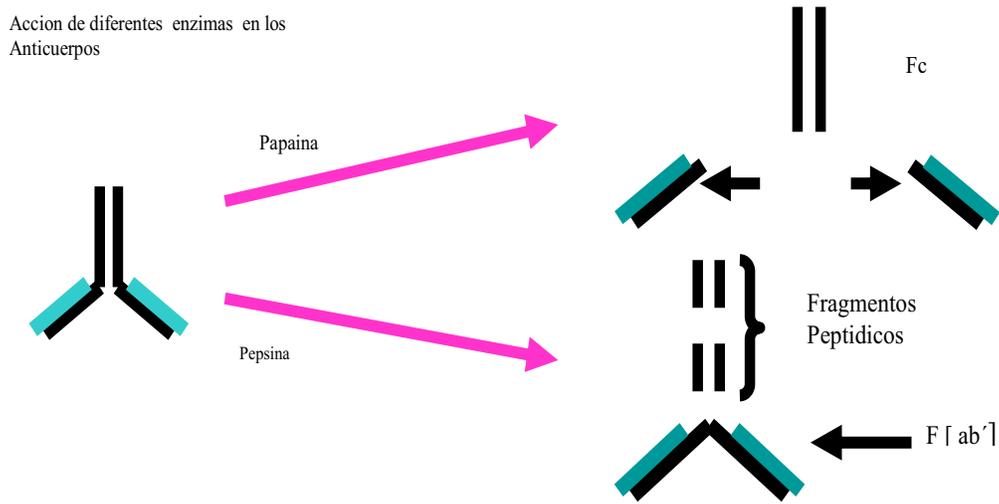


Ilustración 6 Desglose de un anticuerpo según sus diferentes componentes y sus fracciones, adaptado de García, 1997

Por otro lado la secuencia en la región variable es altamente polimórfica, siendo esta región capaz de adoptar la conformación o configuración complementaria del antígeno, que provocó la reacción o respuesta inmunológica. (Salomón, 1996).

La importancia de la región variable de un anticuerpo se entiende al estar al tanto que existen diferentes clonas para una misma sustancia, diferentes epitopos o determinantes. Y que esto influye en la especificidad, velocidad de reacción y desenmascaramiento del antígeno.

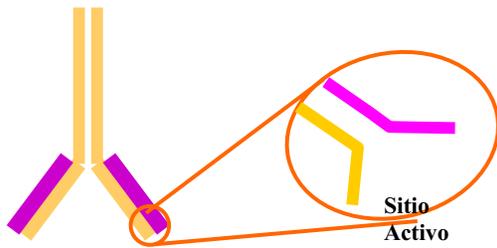
El conocimiento de las diferentes partes que conforman un anticuerpo y sus propiedades (Abbas, 1992) es de vital importancia en las técnicas de inmunohistoquímica. Por ejemplo, en sistemas de detección basados en fracciones variables (F (ab)₂) de un anticuerpo (Dako, 2006), si los tratamientos de recuperación se hacen en una secuencia específica es debido a que se puede afectar la estructura del anticuerpo y provocar que no reconozca al antígeno por desnaturalización del anticuerpo.

Un **antígeno** es cualquier sustancia que es capaz de provocar una respuesta inmune, según García Tamayo son “todas las moléculas (propias o extrañas) que pueden ser reconocidas y contra las cuales está dirigida una respuesta por medio de anticuerpos o citotoxicidad” y para ser denominados así debe cumplir 2 condiciones:

1. Provocar la formación de anticuerpos
2. Que sea capaz de reacciones específicas contra ellos

Si no cumple la primera condición se denomina hapteno. Los haptenos también pueden ser detectados en algunas técnicas de inmuno-localización, ya que unidos a otras moléculas más complejas, denominadas acarreadores, se puede lograr que se produzcan anticuerpos contra ellos (García del moral, 1993).

Ilustración 7 Sitio activo de un anticuerpo basado en texto de dako 2006

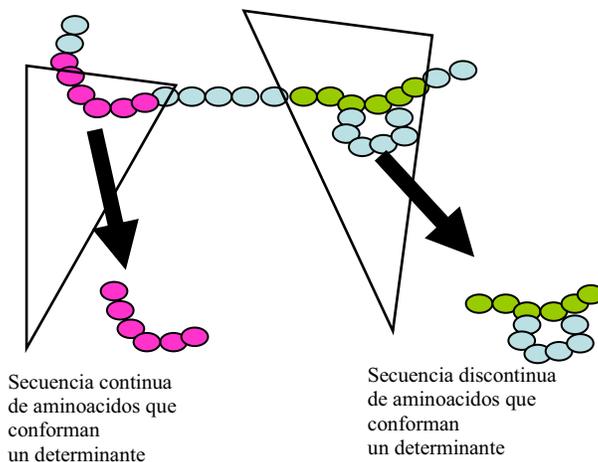


De acuerdo a la estructura de los anticuerpos, solo la fracción denominada sitio activo se une al antígeno y este sitio activo no se une a toda la molécula del agente extraño, sino solamente a una parte de ellos, que se denomina Epitopo o determinante antigénico, los determinantes antigénicos o epitopes son las partes que conforman una porción de

la estructura de un antígeno, puede ser varias o una sola.

El epitopo está conformado de 5 a 7 aminoácidos o monosacáridos según la naturaleza química del antígeno. Los determinantes antigénicos se encuentran en las proteínas, los polisacáridos, los lípidos, los ácidos nucleicos, etc.

Ilustración 8 Tipos de secuencias de un determinante antigénico o epitopo según los tipos de conformación estructural de la proteína que provoca la reacción inmune, modificado de García,1997



Secuencia continua de aminoácidos que conforman un determinante

Secuencia discontinua de aminoácidos que conforman un determinante

Cada anticuerpo que se fabrica es específico para un epitopo en particular, ya que cada célula B que reconoce un epitopo solo puede producir anticuerpos para este epitopo.

Como antígeno puede poseer varios determinantes antigénicos iguales o diferentes, por lo que diferentes células B pueden producir anticuerpos para un mismo epítopo, (García del Moral, 1993) los cuales pueden ser continuos o discontinuos.

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

Los antígenos se pueden clasificar de varias maneras para facilitar el estudio en Inmunología, estos pueden ser por:

- 📌 Origen
- 📌 Naturaleza química
- 📌 Forma de obtención
- 📌 Conformación estérica
- 📌 Distribución
- 📌 Forma de reconocimiento

➤ Origen

Si existen en el organismo o no, se clasifican como:

1. Exógenos : que provienen de afuera del organismo
2. Endógenos: que están en el organismo, formando parte de él.

➤ Naturaleza química

Dependiendo del tipo de molécula en su estructura pueden ser :

1. Proteínas
2. Carbohidratos
3. Lípidos o
4. Ácidos nucleicos

➤ Forma de obtención

Según la forma en que se producen y se usan en:

1. Naturales
2. Artificiales o

3. Sintéticos

➤ Conformación

Según la secuencia de los determinantes antigénicos o epitopos en:

1. continuos
2. discontinuos

➤ Distribución

Es una forma de clasificación diferente que se usa mucho más en los servicios de anatomía patológica, y está basada en su distribución en la naturaleza. Algunos han sido considerados específicos de órganos y/o tejidos, otros han sido restringidos a una sola especie animal.

1. Inespecíficos
2. Específicos

La mayoría de los antígenos asociados a las neoplasias malignas no han son específicos de los tumores sino más bien de las células normales (Biogenex, 1999) en donde se origina la neoplasia, de los cuales se pueden enumerar los siguientes:

- Proteínas asociadas ciclo celular
 - Proteínas señal de transducción
 - Antígenos asociados a proliferación
- Antígenos celulares
- Metabolismo de drogas citotóxicas
- Marcadores endócrinos
 - Hormonas
 - Polipéptidos neuroendócrinos
- Enzimas
- Proteínas de matriz extracelular
- Marcadores hematopoyéticos

- CD, "Cluster Differentiation"
- Marcadores linfoides, mieloides y plaquetas
- Marcadores vascularización
- Grupos sanguíneos
- Inmunoglobulinas y proteínas complementos
- Receptores de hormonas
- Proteínas de regulación de hormonas
- Agentes infecciosos
- Filamentos intermedios
- Neuronales
- Receptores
- Antígenos asociados a tumores
- Proteínas supresores de tumor, apoptosis y oncoproteínas

La distribución también puede estar basados en si son Heterofilos o Heterogénicos, que es la clasificación que se hace cuando son compartidos por células de organismos vivos que pertenecen a especies diferentes (cruza entre especies, por ejemplo: insulina)

Forma de reconocimiento

Otra clasificación del antígeno, que tiene que ver con el procedimiento técnico, se refiere a la parte de recuperación de la antigenicidad, es decir se refiere a la forma de lograr que genere una reacción específica y sea visualizado en un tejido por los métodos de recuperación, en tejidos embebidos en parafina principalmente:

- 👉 Tipo I: son los que nos requieren ningún proceso para ser reconocidos
- 👉 Tipo II: requieren de una leve digestión enzimática para ser reconocidos
- 👉 Tipo III: requieren la fragmentación completa de la molécula para que sus epitopes sean reconocidos.

Un mismo antígeno puede tener una sola o las tres variantes

2.3 SISTEMAS DE DETECCION

Los sistemas de detección son todos los reactivos biológicos y químicos que permiten visualizar una sustancia u organismo, por medio de una zona de marcaje (positivo) para el ojo humano en las células o tejidos, a través de los diferentes tipos de microscopios existentes.

Estos reactivos están divididos en 3 grupos:

- Anticuerpos: primarios, secundarios, fracciones, etc.
- Enzimas: Peroxidasa, AEC, Glucosa Oxidasa.
- Cromógenos: para microscopia de luz, electrónica y fluorescencia.

Del sistema de detección depende, en gran medida, la posibilidad de que se logre una tinción de calidad, específica y rápida, así como también los posibles problemas que se presenten en las mismas. Estos sistemas pueden ser comerciales en forma de kits, en donde se encuentran todos los reactivos a excepción del anticuerpo primario, que generalmente se adquieren aparte.

Si se adquieren por separados los componentes se debe tomar en cuenta, las especies en los que se fabricaron, pureza, concentración, si sirven para tejidos en parafina o congelado, si se necesita recuperación en el caso del primario; de los demás componentes se debe ver que sean para detectar anticuerpo policlonal, monoclonal, universal o que especies reconoce, que cromógeno se usa para visualizar, si es permanente o no en IMHQ y en IMF si es el fluorógeno de acuerdo a los filtros que se tienen en el microscopio de luz ultravioleta. (Véase apéndice técnico 2).

ANTICUERPOS

- Primario: anticuerpo obtenido en una especie (por ejemplo: ratón) para el antígeno a detectar (anti-humano), puede ser monoclonal o policlónal. Pueden ser fracciones de anticuerpo ($F(ab)_2$)
- Secundario: anticuerpo obtenido contra la especie que se obtuvo el primario (por ejemplo : anti-ratón obtenido en cabra)
- Terciario: anticuerpo obtenido para marcar el secundario (anti-especie del secundario).

El uso de uno o más anticuerpos depende del sistema y sus aplicaciones. Existen muchas presentaciones comerciales, pueden ser prediluidos o concentrados y en diferentes cantidades desde 0.2 μ l hasta 1 ml. Estos pueden estar conjugados o no a cromógenos, depende de los pasos del sistema que se quiera utilizar. Lo más importante aquí es la especie que se inocular para la reacción antigénica y con que especie se unen o se puede cruzar, es decir si son heterofilos o no.

ENZIMAS

Las enzimas son sustancias que catalizan las reacciones para acelerarlas. Son los reactivos con los cuales se da la reacción en los IMHQ, con objeto de formar un compuesto coloreado que puede ser insoluble o soluble en ciertos compuestos por lo que puede ser permanente o no.

Ejemplos: Peroxidasa, Fosfatasa Alcalina, Glucosa Oxidasa, Beta-galactasa

CROMÓGENOS

Los anticuerpos también tienen la propiedad de unirse a otras moléculas en regiones específicas de las cadenas proteicas que las conforman, por otro tipo de

interacciones, físicas, químicas y que no son antígenos, estas sustancias se dominan **cromógenos**, marcadoras o trazadoras (cromos = color).

Los cromógenos son sustancias que producen un color al ser expuestos en un medio de incubación o catalizador con otro reactivo, dando como resultado un producto de propiedades y características particulares, que permiten visualizar el lugar de unión que reconocen los anticuerpos mostrando así la ubicación de los antígenos, pueden ser métodos evidenciados por fenómenos físicos o por reacciones químicas, pero ambas emiten un color donde se puede determinar el lugar de unión. Las moléculas que pueden emplearse como cromógenos o trazadoras son de diversos tipos:

- **Complejos enzimáticos** : dos sustancias que reaccionan dando un producto de color
- **Metales**: en solución que se unen a partes de el anticuerpo o a los productos enzimáticos, pueden servir para marcar(microscopia electrónica) o pueden reforzar la coloración o variando el color
- **Sustancias fluorescentes**, sustancias que emiten luz fluorescente al ser expuesta a luz UV de determinada longitud de onda.

Complejos enzimáticos

Los componentes son: la enzima, el substrato y el medio de incubación, la mas conocida y usada es la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) que con diaminobenzidina (DAB) da una colocación café en presencia de peróxido de hidrogeno al 3% en solución acuosa

Metales

Son partículas de diámetro conocido o sales de metales que se agregan a los complejos enzimáticos para reforzar o cambiar color, las partículas de diámetro

conocido se usan mas en microscopia electrónica, pueden ser oro, o plata y se unen al anticuerpo directamente.

Las sales se ocupan para cambiar color de los complejos enzimáticos, el color obtenido depende del cromógeno y de la sal, por ejemplo: los sistemas con HRP (Peroxidasa de rábano picante), si se revela con DAB da un precipitado color café, si se revela con AEC (Amino-Etil-Carbazol) da una coloración roja, si se revela DAB + cloruro de níquel da una coloración azul-grisácea,

Ejemplos: HRP + plata o oro coloidal + Diaminobenzidina (DAB), HRP + DAB + NiCl, HRP +AEC

Fluorocromós

Los fluorocromós son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente. Se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión. Absorben fotones de alta energía procedente de la radiación ultravioleta puesta de manifiesto por la emisión de una radiación luminosa de longitud de onda distinta dentro del espectro visible.(Herman, 1998)

La característica más importante es el color producido, la intensidad y el tiempo de permanencia de la coloración que son factores para el uso o no de alguno de los diferentes cromógenos. (All, 2000)

Otros factores que se deben tomar en cuenta son:

- El espectro de excitación y emisión, y como cambia el color emitido en este espectro, además si este varía con el pH.

Algunos ejemplos de fluorocromós (Rosk,1995):

- FITC: Isocianato de fluoresceína. Se excita con luz azul a 490 nm y emite a 514 nm. Su rendimiento cuántico es 0.5. absorbe luz azul emite verde manzana
- Ficoeritrina. Se excita a 480 nm pero no es su máximo (565 nm) y emite a 578 nm. Absorbe luz verde emite luz rojo-naranja
- PerCP: Proteína Clorofila Peridina. Se excita a 488 nm y emite a 578 nm.
- TRITC: Isocianato de Tetrametil Rodamina. se excita a 540 nm y emite a 570 nm. Absorbe luz azul emite luz roja
- Rojo Texas: Se excita a 596 nm y emite a 615 nm. Emite luz rojo purpura
- Ficocianina: Se excita a 620 nm y emite a 650 nm.
- Aloficocianina: Se excita a 650 nm y emite a 660 nm.
- Tricolor: Se excita a 540 nm y emite a 570 nm.

Hay otro tipo de fluorocromós (Rosk, 1995) para marcar ácidos nucleicos, estos no van unidos a anticuerpos, tiñen los ácidos nucleicos como colorante normales, se usan como contra tinción, ejemplos son:

- Yoduro de Propidio que se excita a 493nm y emite a 630nm,
- Bromuro de Etidio, que para marcar DNA se excita a 480nm y emite a 510 nm y Naranja de Acridina para RNA se excita a 440/470 nm y emite a 650 nm,
- Hoescht 33342 que se excita a 343 nm y emite a 482 nm,
- Naranja de Triazol que se excita a 509 nm y emite a 533 nm,
- DAPI que se excita a 345 nm y emite a 455 nm.

CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE DETECCIÓN

Se puede clasificar según el número de reactivos a utilizar en directo o indirectos, en las enzimas ocupadas para reaccionar o cromógenos a los que va unidos o por el Método de visualización



METODO DIRECTOS



METODOS INDIRECTOS

MÉTODO DIRECTO

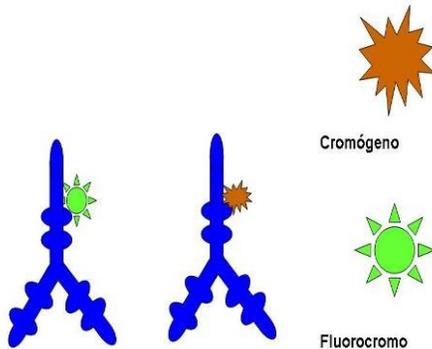


Ilustración 1 Esquema general de un sistema de detección directo, consta de un solo complejo antígeno- cromógeno (fluorocromós o cromógeno); puede ser también un metal como el oro o plata . Adaptado de García del moral, 1993

Los métodos directos utilizan un solo anticuerpo unido o conjugado a un trazador sin otro paso adicional, la reacción se ve directamente sobre la preparación, por ejemplo la inmunofluorescencia. Es de un solo paso, Puede ser de IMF o IMHQ o ME.

Ventajas: rápida, sensible.

Desventajas: algunos anticuerpos pueden causar tinción de fondo, se necesita un anticuerpo por cada antígeno a detectar o con diferentes cromógenos para hacer dobles tinciones.

MÉTODO INDIRECTO

Los métodos indirectos utilizan en un primer paso un anticuerpo sin marcar, un segundo anticuerpo que reconoce al anticuerpo primario como un antígeno, por lo cual se une a él, este anticuerpo secundario está unido o no a un trazador, dependiendo de la técnica (PAP, PAAP, ABC, etc.) si no está unido a un marcador éste se añade en otro paso o en varios.

En el caso de los enzimáticos se hace reaccionar la enzima unida al marcador final dando una coloración específica del sustrato que marca el lugar de unión, por esta serie de pasos se denominan indirectos.

Es de dos o más pasos. Puede ser IMF o IMHQ o ME

Ventajas: mas sensible, permite utilizar un único anticuerpo secundario conjugado a un cromógeno contra varios anticuerpos primarios.

Desventajas: puede tener tinción de fondo por reacciones cruzadas, depende de las especies en que se fabricaron los anticuerpos

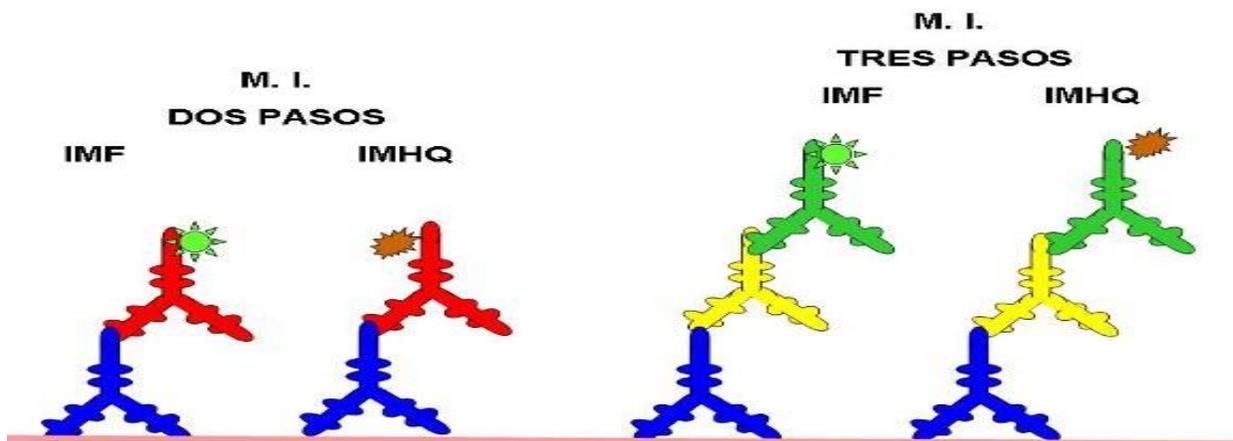


Ilustración 2 Esquema general de los métodos indirectos de dos pasos o tres. Adaptado de Dako, 2006.

DIFERENTES MÉTODOS DE IMF E IMHQ

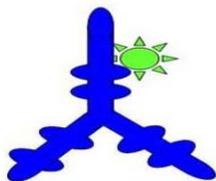


Ilustración 3 Método de IMF directa
Obsérvese que solo se representa un fluorocromo de los múltiples que se puede unir al anticuerpo. Adaptado de García, 1997

Los siguientes sistemas usan método directo:

IMF (Inmunofluorescencia)

Inmunofluorescencia para tejido en congelación, a veces se usa en parafina, se ocupa también en otras técnicas como la citometría de flujo y estudios con microscopio confocal. Es el sistema usado generalmente en los departamentos de anatomía patológica para las biopsias de riñón, hígado y piel.

Ventajas: permite la localización de muy pequeñas cantidades de antígenos.

Desventajas: se puede causar efecto de pozo¹ en cortes muy grueso en tejido de riñón, tinción de fondo cuando las diluciones no están estandarizadas, no se pueden hacer dobles tinciones si se cuenta solo con fluorocromó o un solo diámetro de oro coloidal.

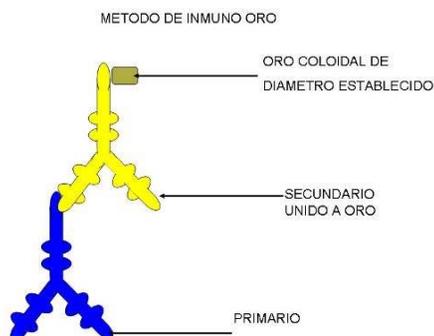


Ilustración 4 Método de inmuno oro de dos pasos, El método de un solo paso es parecido al de IMF Adaptado de García del moral, 1997

INMUNO-ORO

Se usa para casos o investigaciones en el microscopio electrónico de transmisión, el metal que se usa en este método puede variar en diámetro para diferenciar diferentes anticuerpos también se puede hacer con otros metales o inclusive con DAB. Puede hacerse de un solo paso.

Ventajas: es muy sensible, se puede amplificar la señal o dobles tinciones con dos diámetros diferentes de oro.

¹ El efecto de pozo se observa como acumulación de fluorescencia en zonas del tejido pero que no se puede enfocar en un plano del microscopio, es decir se debe hacer un ajuste del micro, por lo que el principal uso en el diagnóstico de patologías del riñón, no se cumple.

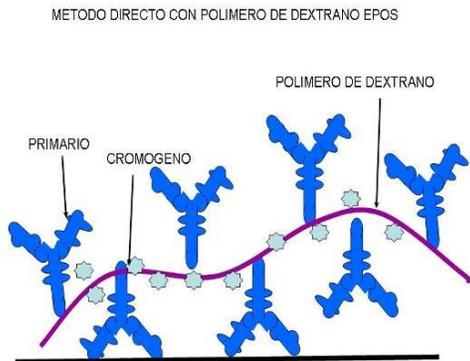


Ilustración 5 Método de EPOS, tecnología de un solo paso debido a que el anticuerpo y el cromógeno están unidos a la molécula de polímero dextrano, Modificado de dako,2006

Desventajas: solo es útil con el microscopio electrónico, si se usa en microscopio de luz se debe amplificar la señal con plata lo cual dificulta la técnica, método muy caro.

EPOS

Sistema de un solo paso para muestras en parafina o congelación que utiliza la tecnología química del dextrano. Es un molécula de un polímero o unido a anticuerpos y cromógenos, todo en una sola molécula.

Ventajas: es un método rápido, sin tinción de fondo

Desventajas: es un método caro debido a que por cada antígeno que se quiera detectar hay que tener un sistema EPOS para este, las tecnología por el tamaño del polímero de dextrano en algunos casos dificulta la penetración a partes de las células, causando tinciones débiles o nulas.

Los siguientes sistemas utilizan métodos indirectos:

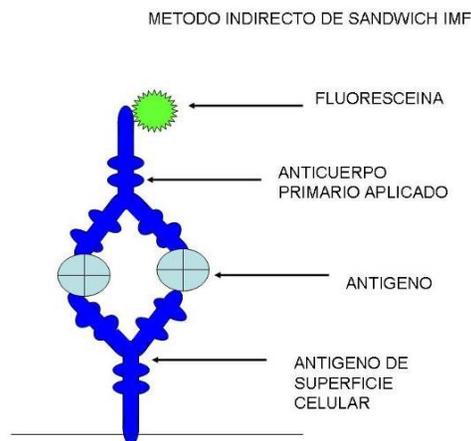


Ilustración 6 Método de sándwich mostrando la característica de que el antígeno se encuentra encerrado entre dos anticuerpos, solo funciona si existe en el tejido expuesto al antígeno y se ha desarrollado una respuesta inmune. Modificado de García del Moral, 1993

IMF SÁNDWICH

Se utiliza para detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas frente a un determinado antígeno en las células plasmáticas de tejido de animales previamente

inmunizados con este antígeno. Usa principalmente cromógenos fluorescentes.

Ventajas: para detectar inmunoglobulinas específicas y la fijación de antígeno por los anticuerpos

Desventajas: solo sirve si el antígeno es previamente expuesto en animales, por lo que su uso en detectar antígenos es mas bien solo en investigación.

IMF COMPLEMENTO

Es un técnica modificada del método indirecto y en ella se el anticuerpo que se emplea en el primer paso ha de ser capaz de fijar el complemento, y que es específico a un antígeno en particular, se añade como fuente de complemento suero fresco de cobaya en una segunda fase, se agrega se incuba con anticuerpo que reconoce una determinada fracción del complemento y este marcado con Fluorocromó. Se usa para saber la capacidad de ciertos anticuerpos de fijar el complemento.

Ventajas: útil en la investigación de las propiedades de los anticuerpos

Desventajas: no se usa en patología de rutina

ABC

Complejo Biotina-Avidina, es un sistema que usa dos anticuerpos, usa un secundario unido a biotina, que se une a un complejo

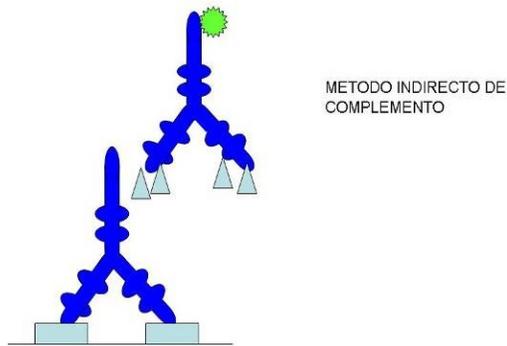


Ilustración 7 Método de complemento, obsérvese que el segundo anticuerpo se une a la molécula de complemento y no al primario. Modificado de García del Moral, 1993

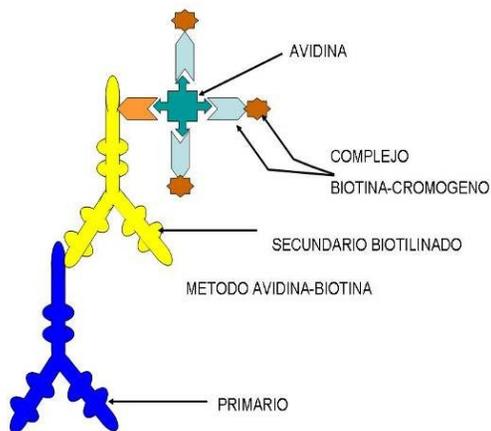


Ilustración 8 Método de avidina_biotina es de tres pasos debido que el complejo biotina-cromógeno-avidina se prepara en un paso previo a la aplicación, el secundario está unido a biotina, se ha modificado la ilustración para mostrar solo uno de los muchos puntos de unión con biotina y el tamaño del complejo, modificado de dako 2004

Avidina + Biotina-Peroxidasa previamente preparado, el cual se une a la avidina en una relación 1:4 (B: A). Este sistema puede causar tinción de fondo en tejidos como el riñón e hígado debido a que estos tienen mucha biotina endógena, por lo que debe usar bloqueadores de proteínas.

Ventajas: mas sensible.

Desventajas: tinción de fondo por biotina endógena, dificultad de preparar el complejo. Mayor tiempo de realización.

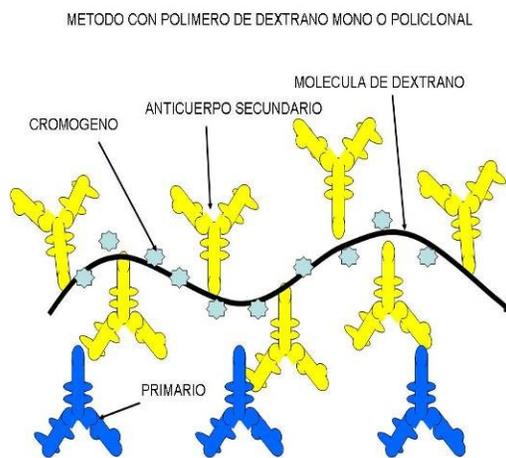


Ilustración 9 Método con polímero de dextrano con un solo de tipo de anticuerpo monoclonal o policlonal. Modificado de dako, 2006

POLÍMERO DE DEXTRANO

Es un sistema cuya tecnología esta basada en un polímero conjugado con anticuerpos secundarios y enzimas, nótese la diferencia del EPOS que son primarios, los secundarios pueden ser monoclonales, policlonales o ambos, y se puede ocupar cualquier enzima de marcaje (DAB, fosfatasa alcalina, etc.), no presenta tinción de fondo, su desventaja es que al ser una molécula grande, no siempre puede penetrar los tejidos con facilidad.

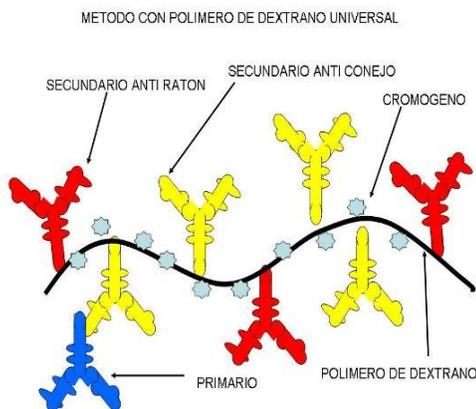


Ilustración 10 Método de polímero de dextrano en el cual hay una combinación de anticuerpos secundarios monoclonales y policlonales. Modificado de Dako, 2006

Ventajas: rápido, poca tinción de fondo por inespecificidad de los anticuerpos

Desventajas: por el tamaño de la molécula es difícil que penetre en algunas zonas celulares, por lo que se debe permear el tejido con detergentes, pero algunos antígenos y son

bloqueados por estos por lo que no se reconocen por el anticuerpo

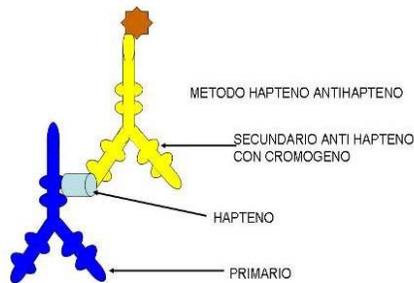


Ilustración 11 Método hapteno-antihapteno, obsérvese la unión del secundario a la molécula de hapteno. Modificado de García del Moral, 1997

HAPTENO-ANTI HAPTENO

Sistema que utiliza una molécula denominada hapteno (véase Pág. 19) que se une a un anticuerpo primario, se usa un secundario que reconoce el hapteno, causa poca tinción de fondo por que el secundario va dirigido al hapteno, no al primario, por lo que pueden usarse de la misma especie animal.

Ventajas: no causa tinción de fondo

Desventajas: la dificultad de tener varios primarios unidos a hapteno

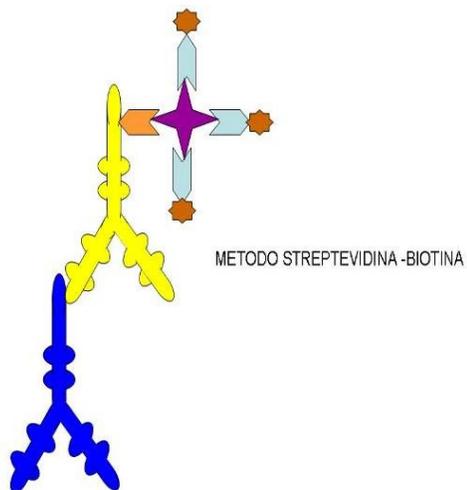


Ilustración 12 Método de estreptavidina-biotina, obsérvese la diferencia con el método ABC, el lugar esta ocupado por la estreptavidina en lugar de avidina, con este cambio se avanzo mucho en la eliminación de tinción de fondo en tejidos con biotina endógena, modificado de Dako, 2006.

SAB (ESTREPTAVIDINA-BIOTINA)

Sistema que utiliza Estreptavidina en lugar de avidina, desarrollado para evitar los problemas causados en los sistemas que usan avidina-biotina, ya que causa menor tinción de fondo debido a que no existe estreptavidina endógena en los tejidos. Puede hacerse en solo paso al mezclar complejo y secundario previamente.

Ventajas: sistema rápido y muy sensible

Desventajas: tinción de fondo.

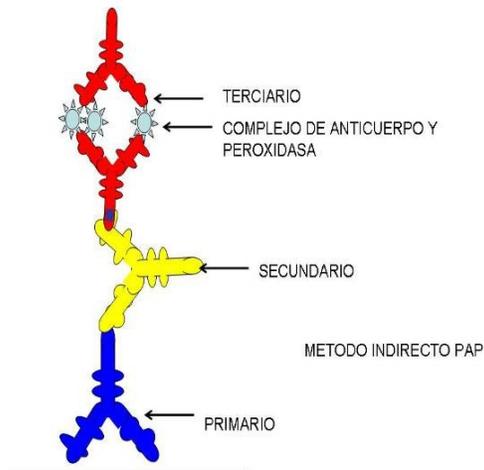


Ilustración 13 Método de peroxidasa- antiperoxidasa , en donde el complejo se aplica como un terciario, el anticuerpo mas importante en este sistema es el anticuerpo secundario o denominado puente, ya que reconoce la especie en la que están fabricado el primario y el terciario. Modificado de Garcia del Moral, 1997

PAP (PEROXIDASA-ANTIPEROXIDASA)

Sistema peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), en donde se aplica un secundario que reconoce al primario y al terciario (el terciario es de la misma especie que el primario) El anticuerpo secundario en este caso se denomina anticuerpo puente; el terciario es un complejo formado por dos anticuerpos que reconocen la peroxidasa, es decir esta encerrada entre los dos anticuerpos. Se puede visualizarse si el terciario se une al secundario.

Ventajas: sensible, utiliza dos especies nada mas, se utiliza un anticuerpo 2ario. como puente.

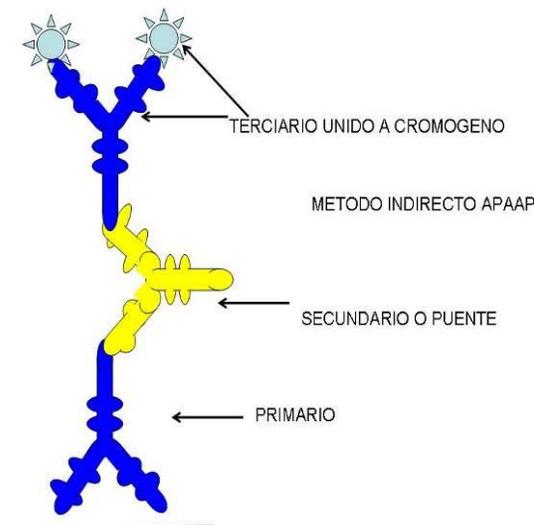


Ilustración 14 Sistema APAAP parecido al anterior (PAP), solo que no es un complejo el que se aplica si no un anticuerpo que reconoce al cromógeno como antígeno Modificado de Garcia del Moral, 1997

Desventajas: tinción de fondo

APAAP

(FOSFATASA ALCALINA – ANTIFOSFATASA)

Sistema denominado antifosfatasa-fosfatasa alcalina (APAAP), en donde se aplica un secundario que reconoce al primario y al terciario (el terciario es de la misma especie que el primario) El anticuerpo secundario en este caso se denomina anticuerpo puente; el terciario es un complejo formado por un anticuerpo unido a la enzima fosfatasa alcalina. Muy útil en

tejidos que tienen mucha biotina endógena, no se recomienda en tejido gástrico.

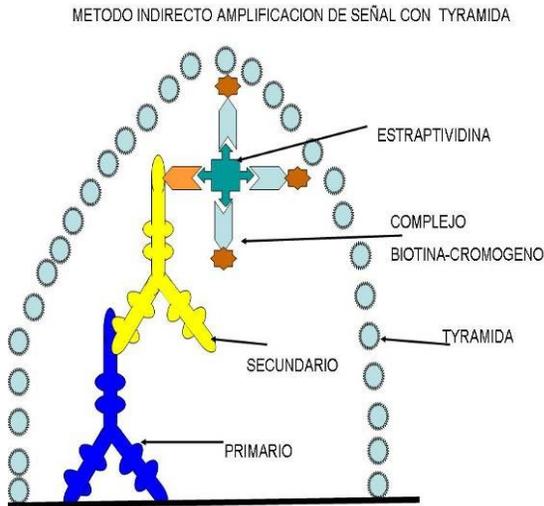


Ilustración 15 Sistema de amplificación de señal con tyramida, se puede aplicar con cualquier sistema que utilice peroxidasa (HRP), incluso hay para fluorescencia, obsérvese la capa que se forma alrededor de punto de unión antígeno-anticuerpo por lo que es mas intensa la coloración con el cromógeno. Modificado de Dako, 2006.

Ventajas: sensible, utiliza dos especies nada mas, se utiliza un anticuerpo 2ario. como puente.

Desventajas: tinción de fondo

CSA (COMPLEJO DE AMPLIFICACIÓN DE SEÑAL CON TYRAMIDA)

Es un sistema que utiliza como anticuerpo secundario fracciones de anticuerpos (F(ab')₂) biotilados, junto con un complejo de amplificación de señal de estraptavidina-biotina-tyramida, que forman un precipitado alrededor de las zonas marcadas por el

primario. Que encapsula la zona de marcaje haciendola mas notoria.

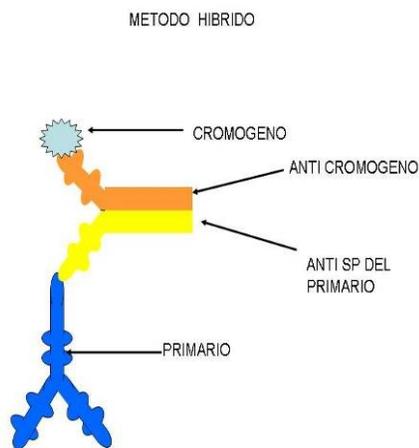


Ilustración 16 Método de híbrido. Es un sistema que utiliza un secundario modificado, armado a conveniencia, obsérvese que cada complemento del anticuerpo híbrido reconoce diferente antígeno. Modificado de García del Moral, 1997

Ventajas: amplifica señales débiles.

Desventajas: no se debe utilizar si hay tinción de fondo, si se usa en diagnostico para biopsias de mama, debido que el diagnostico se basa en intensidad de señal, ya que puede causar falsos positivos

HIBRIDO

Sistema utilizado en investigación en donde se fabrica un anticuerpo contra un antígeno

en particular, el cual se divide en los puentes disulfuro, para separarlo y se une a otra molécula de anticuerpo que es especifica a al cromógeno. Se logra evitar la tinción de fondo, pero es un método muy caro.

Ventajas: no tiene tinción de fondo

Desventajas: método caro, obtención del híbrido complejo y laborioso

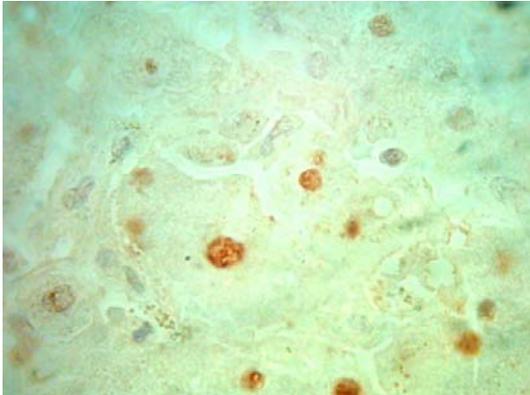


Ilustración 18 Foto de tejido testigo (1000X), sistema *EnVision*, HRP y DAB, ejemplo de marcaje para Citomegalovirus en dilución 1:100, obsérvese su marcaje principalmente en núcleo. Foto tomada por el autor.

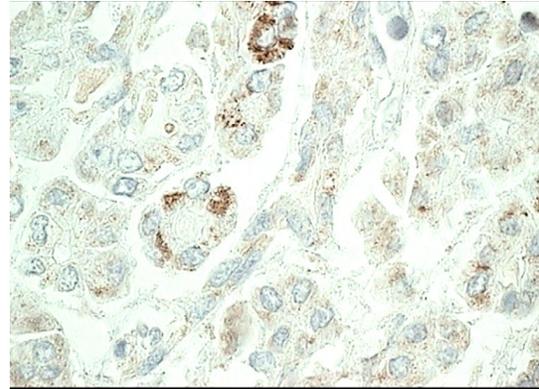


Ilustración 17 Foto de páncreas (400X) Sistema *EnVision*, HRP y DAB, Ejemplo de marcaje con anticuerpo para Cromogranina A. en dilución 1:500. Obsérvese marcaje granular citoplasmático característico de este anticuerpo. Foto tomada por el autor

DOBLES Y TRIPLES O CUADRUPLES TINCIIONES

Se pueden llevar a cabo en cualquiera de los métodos tinciones dobles y triples, en un solo tejido, en donde se siguen las reglas de cruzamiento de los anticuerpos y los cromógenos, teniendo cuidado en las selección de los mismos, aunque existen ya estuches comerciales para realizarlos, estas tinciones se pueden llevar a cabo en cualquier departamento de patología si se cuenta con dos cromógenos distintos.

Cualquier sistema

Diferentes cromógenos (DAB, fosfatasa alcalina, etc.)

Diferentes maneras de revelar un cromógeno o un substrato (DAB, DAB+ClNi, EAC, DAB, AuCl+AgSO)

Se procesan como si fueran individuales y se debe decidir que coloración será para cada antígeno

Dobles tinciones en IMF

Tomar en cuenta los diferentes fluorocromos para manejar longitudes de ondas parecidas, que den diferentes colores, Las especies en las que están fabricados los diferentes anticuerpos para que no ocurra cruza

2.4 IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS IMHQ EN EL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

La aplicación de técnicas **Inmunohistoquímica** (IHQ) e **inmunofluorescencia** (IMF) para la detección de anticuerpos específicos ha transformado en las últimas décadas el diagnóstico en patología quirúrgica y postmortem (Colvin, 1995); y su influencia en el tratamiento específico de pacientes en hospitales de tercer nivel de atención es determinante, como sucede en el Instituto Mexicano del Seguro Social.

Podemos dividir la detección de anticuerpos con fines diagnósticos, en dos grandes grupos:

- La técnica de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica (ICQ)
- La técnica de inmunofluorescencia.

La primera, ampliamente utilizada para establecer la estirpe histológica en los procesos neoplásicos primarios y metastáticos, basada en el reconocimiento de antígenos y anticuerpos, y que requiere un control de calidad estandarizado tomando en cuenta métodos de fijación, proceso de los tejidos y/o células, corte, tinción y finalmente interpretación e informe de resultados; y la segunda (IMF) que hace referencia a la detección de complejos antígeno – anticuerpo en diversos tejidos, que han sido congelados en fresco (sin fijación), y que son indispensables en numerosas enfermedades inmunológicas.

La IMHQ e IMF en el diagnóstico de procesos neoplásicos generalmente malignos, busca principalmente:

1. Establecer el tipo histológico de la neoplasia
2. Determinar el grado de invasión y
3. Elegir el tratamiento específico para cada paciente, de acuerdo a los puntos anteriores.

Estas técnicas permite realizar diferenciaciones de las diversas neoplasias y desde luego detectar agentes biológicos y/o sus productos, asociados a neoplasias o precursores de ellas, como VPH, VHB o VHC, etc., o bien simplemente su participación en procesos infecciosos de difícil diagnóstico o control.

Por ejemplo: las neoplasias podemos clasificarlas en grandes grupos, por patrones morfológicos como:

1. Sarcomas (de células fusiformes, epitelioides, de células pequeñas, etc.)
2. Carcinomas (poco diferenciados o indiferenciados)
3. Neoplasia hematológicas y del tejido linfoide
4. Neoplasias de células germinales
5. Neoplasias vasculares

Pero utilizando inmunohistoquímica podemos precisar si en un sarcoma neurogénico, un angiosarcoma, un rabdomyosarcoma, podemos también diagnosticar un linfoma de Hodgkin o uno de células grandes anaplásico, CD30+, en que cada uno de ellos tiene un tratamiento y pronóstico diferente.

PANELES DE CLASIFICACIÓN DE TUMORES POR IMHQ

El proceso de utilización de los anticuerpos en las técnicas de anatomía patológica, es complejo y depende de muchos criterios, de los cuales sólo el médico patólogo es capaz de hacer un diagnóstico, basado en la información clínica, histológica y morfológica de las diferentes patologías.

Como se menciona anteriormente, las técnicas de IMHQ, tienen como objeto establecer la estirpe histológica de tumores indiferenciados, la subclasificación de tumores de origen diferenciado y la detección de agentes biológicos y/o sus productos asociados a neoplasias.

Para esto, en los departamentos de anatomía patológica se ocupan paneles de anticuerpos, que de acuerdo a los resultados obtenidos se puede saber el origen de los tumores, se le conoce como panel de diferenciación o de caracterización, además existen paneles de subclasificación de tumores de acuerdo al origen marcado por el panel de diferenciación (Colvin, 1995)

Por lo que se puede resumir que los pasos a seguir después de hacer el estudio patológico, basado en la información clínica, histológica y morfológica en la aplicación de las técnicas de IMHQ son los siguientes:

1. Casos en los que el tumor es poco diferenciado
 - Determinación de la estirpe histológica por medio de panel de diferenciación
 - Determinación de la subclase de la estirpe histológica por medio de paneles específicos.

2. Casos en el tumor está diferenciado
 - Determinación de sustancias, productos, subproductos y/o presencia de agentes biológicos asociados a los procesos neoplásicos.
 - Paneles de anticuerpos específicos a las neoplasias.

3. Casos en los que se sospecha origen distinto al sitio del tumor
 - Si se sospecha de metástasis¹ se aplican paneles de anticuerpo específicos a primarios primitivos según la morfología observada.

La bibliografía propone ciertos paneles para la determinar la diferenciación de los tumores y estos pueden variar según quien los proponga (Colvin, 1995; Mark, 2008; Dako, 1992), además que se actualizan por la introducción de nuevos anticuerpos mas específicos para ciertos tumores.

¹ **Metástasis**, proceso neoplásico maligno o infeccioso en una localización secundaria a una lesión primaria, de la cual procede por siembra a distancia

El panel de anticuerpos más comúnmente usado es para diferenciar tumores es: Coctel de Citoqueratinas AE1/EA3, Antígeno Epitelial de Membrana (EMA), Antígeno Leucocitario Común (ALC), Proteína S-100, Vimentina, Desmina.

Se pueden utilizar agregar otros anticuerpos al panel, como proteína glial acidófila fibrilar (GAFP), neurofilamentos (NF), pero esto depende del departamento en donde se utilicen y el tipo de tumor que se sospecha.

Tabla 1. Anticuerpos para tumores pocos diferenciados (Colvin, 1998)

TIPO DE TUMOR	ANTICUERPO	KERATINA	EMA	LCA	PS-100	VIMENTINA	DESMINA
Carcinoma		+	+	-	-/+	-/+	-
Melanoma		-	-	-	+	+	-
Linfoma		-	-	+	-	-/+	-
Sarcoma		-/+	-/+	-	+/-	+	-/+

De acuerdo a los resultados obtenidos para la caracterización del tumor se aplican paneles para la subclasificación de los tumores. Estos paneles son muy variados en el uso y tipo de anticuerpos que utilizan, dependen de la estirpe histológica que se determinó en el panel diferencial y se deben aplicar bajos ciertos criterios (Mark, 2008).

Se deben seguir ciertos algoritmos² que indican las posibilidades de subclasificación de un tumor, el cual depende de la positividad o no a anticuerpos que siguen una secuencia específica para determinar las diferentes expresiones de los tumores estudiados e inclusive se puede determinar si la muestra fue adecuadamente manejada; el problema de estos paneles tan específicos es que si no se dispone de todos estos anticuerpos se puede sesgar el diagnóstico.

² algoritmo: secuencia lógica a seguir para aclarar algo

Pueden ser muy simples o muy complejos, van de acuerdo a el tipo de tumor estudiado y de la capacidad de los departamentos en la adquisición de nuevos o diferentes anticuerpos.

Por ejemplo el departamento de Anatomía patológica del Hospital de Especialidades, no tiene anticuerpos para tumores mamarios, pues casi no llegan casos de este tipo al Hospital y se canalizan a Oncología, ya que el Hospital de Oncología si los tienen; sin embargo en el Hospital de Oncología no posee paneles de anticuerpos para hormonas hipofisiarias, pero que el Hospital de Especialidades si los tiene.

La importancia de hacer la determinación de la estirpe histológica lo más profundamente posible en los tumores indiferenciados, diferenciados y la detección de agentes biológicos y/o sus productos asociados a neoplasias, es que de esta información depende el tratamiento que recibe el paciente

Por otro lado por medio de las técnicas de inmunofluorescencia, la detección de inmunoglobulinas y otros factores como los del complemento, permiten identificar y estatificar enfermedades inmunológicas que afectan frecuentemente piel, riñón, hígado y otros órganos. También se pueden ocupar para detectar agentes infecciosos como en la meningitis bacteriana (Rodríguez; et al, 1990)

Para explicar su utilidad tomemos como referencia el riñón y sus patologías primarias, secundarias e incluso en seguimiento de pacientes trasplantados.

García del Moral (1993) refirió la distribución de los depósitos de complejos antígeno anticuerpo de la siguiente manera:

- Generalizada o difusa: la lesión (depósito de complejos inmunes) afecta a todos o casi todos los glomérulos en la muestra analizada.
- Focal; están afectados sólo algunos glomérulos.
- Global: el depósito afecta todos o prácticamente todos los capilares del glomérulo.

- Segmentaria: es la lesión que sólo afecta algunos capilares o parte de ellos en un glomérulo.

Y según su localización específica dentro del glomérulo, los depósitos de complejos pueden ser:

- Capilares: en la membrana o subendoteliales.
- Mesangiales: entre las asas capilares.
- Capsulares: se localizan en el epitelio de la cápsula de Bowman (cápsula glomerular), extracapilares.
- En la membrana basal de los túmulos renales, y por último
- Vasculares: situados en la pared de arterias, arteriolas y vénulas.

Por su forma y tamaño, se observan:

- En arco o en coma: abrazando un asa capilar completa.
- Granulares: microgranulares, macrógranulares o en agregados.
- Lineales: siguen el trayecto de las membranas basales por formación "*in situ*".
- Impregnación difusa: es el depósito masivo glomerular o intersticial de fibrinógeno, en el curso de neuropatías graves.

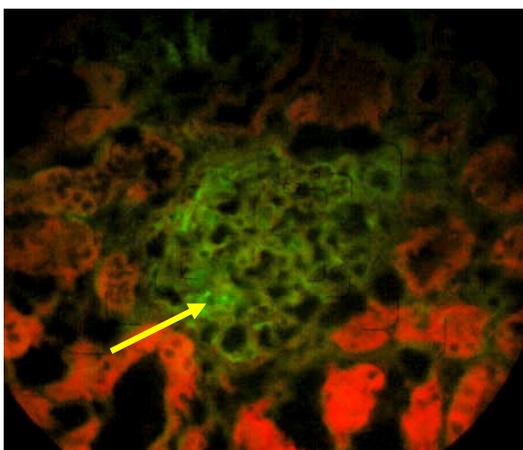


Ilustración 1 Foto ejemplo de tinción con fluorescencia, Riñón (400X), zona glomerular, donde se observa la tinción verde intensa señal de depósitos de inmunoglobulinas (flecha amarilla, IgA), contrastada con azul de Evan's, que da una coloración rojiza. Cortesía de la Dra. M^a. De Lourdes Cabrera Muñoz

Existen numerosas combinaciones de lo antes mencionado, de manera que es posible caracterizar patrones morfológicos de daño glomerular, por ejemplo:

Depósitos difusos, globales y microgranulares de IgG en capilares glomerulares, y de C3 (fracción del complemento), prácticamente son diagnósticos de glomerulonefritis membranosa.

Y depósitos focales, globales o segmentarios y granulares de IgA indican una glomerulonefritis por IgA (vease ilustración 27).

La IMF, que es el apoyo fundamental para el diagnóstico preciso de las diferentes glomerulonefritis, también se utiliza para el seguimiento de pacientes con transplante renal; en enfermedades de la piel como:

- Lupus eritematoso sistémico,
- Vasculitis,
- Lesiones vesiculares o ampollozas, e
- Infecciones.

El uso de las técnicas de IMHQ e IMF en el Departamento de Anatomía Patológica son de gran apoyo y complementan a otras técnicas para el diagnóstico de las diversas patologías que llegan al servicio; sin embargo la obtención de resultados confiables requiere de un gran esfuerzo y la habilidad suficiente para estandarizar los procedimientos, los reactivos y los pasos a seguir en las diferentes circunstancias en la que se presenta la Inmunohistoquímica, pues no puede limitarse a seguir llanamente un protocolo de inmunohistoquímica. Para lograr que las técnicas sean confiables, reproducibles y con calidad, hay una gran cantidad de obstáculos que resolver.

El médico patólogo sólo puede estar seguro del diagnóstico que emite si confía en los procedimientos de IMHQ e IMF que son llevados a cabo en el departamento, que deben estar dentro de las reglas de control y estándares para estas técnicas.

El personal que está a cargo de la realización de estas técnicas debe tener una preparación técnica, profesional y actualizada en las áreas que influyen e intervienen para su realización, ya que el conocimiento de los mismos permite que se logren altos estándares y gran calidad, que influyen y repercuten en los diagnósticos que se emiten basados en estas técnicas.

3 EXPERIENCIA PROFESIONAL EN DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA

3.1 CASOS RESUELTOS

La experiencia profesional en el desempeño de procedimientos en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en el departamento de anatomía patológica, se ejemplifica con los siguientes casos que se exponen a continuación, algunos de ellos son especiales, muy particulares y poco frecuentes, porque son casos de publicación en revistas médicas por los patólogos a cargo del caso.

En estos casos se ven reflejadas las posibilidades de aplicación de las técnicas de detección de antígenos, abarcan biopsias por punción y cortes congelado (riñón y piel), aspirados, extendidos e improntas de tejidos (medula ósea y tejido gástrico), tejidos incluidos en parafina fijados en formol (paraganglioma y coriocarcinoma), citologías diversas¹ ya teñidas; con los diferentes cambios en el método según el tipo de material.

Todo el material expuesto ha sido procesado en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” del CMN SXXI del IMSS por **Francisco Martínez Espinosa** como histotecnólogo adscrito en cargo del área de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

¹ Citología diversas son las citologías de líquidos corporales (orinas, ascitis, pleurales y pericardicos) y biopsias por aspiración con aguja fina (BAAF), líquido cefalorraquídeo que llegan al departamento de anatomía patológica

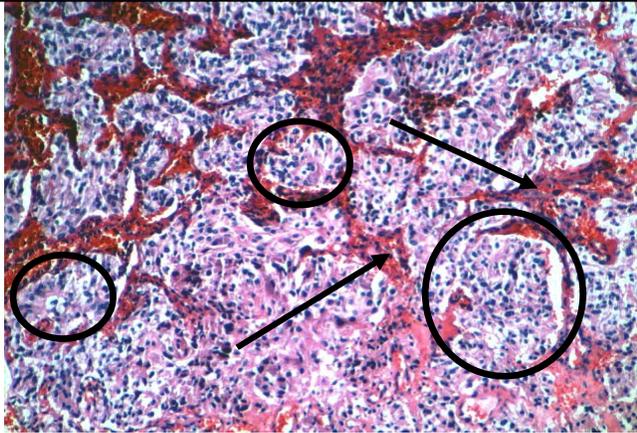
Hospital de Especialidades "Bernardo Sepúlveda "	
CMN SXXI IMSS	
Personal técnico a cargo de las tinciones de Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia :	Histotecnologo Francisco Martínez Espinosa
Caso 1 IMHQ	Médicos patólogos a cargo: <u>Dra. Rocío L. Arreola</u>
B07-5557	<u>Rosales, Dra. Luz María Gómez Jiménez.</u>
Tipo de muestra: pieza quirúrgica vejiga Diagnostico de paraganglioma vesical	

Panel de anticuerpos solicitados inicialmente:

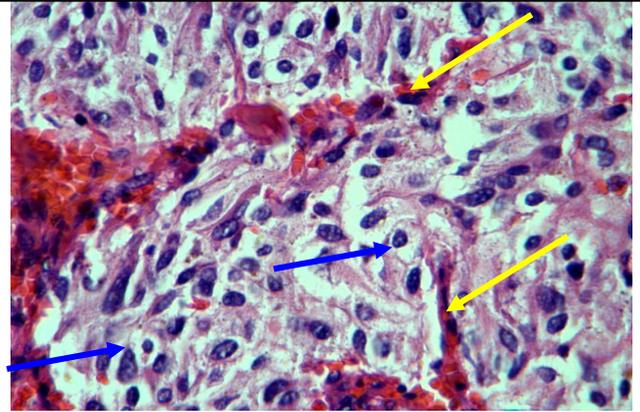
Citoqueratinas coctel	-
Vimentina	-
Actina músculo liso	-
PS-100	+
CD 34	+
Desmina	-

Panel solicitado después:

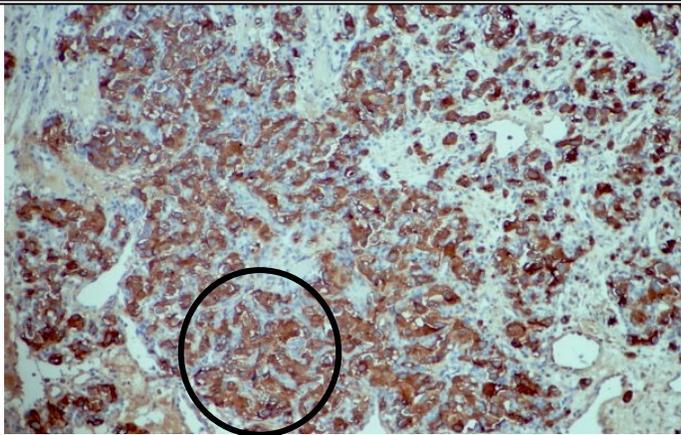
PS-100	+
Cromogranina	+
Sinaptofisina	+
Enolasa neural especifica	+



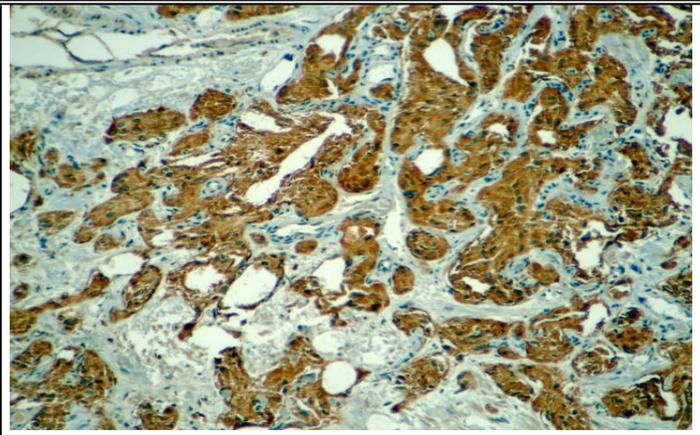
Fotografía 1. Neoplasia con patrón de nichos sólidos (circulo) (100X) rodeados de plexos vasculares (flecha) tinción de HE. Fotos cortesía de la Dra. Rocío L. Arreola Rosales y de la Dra. Luz María Gómez Jiménez



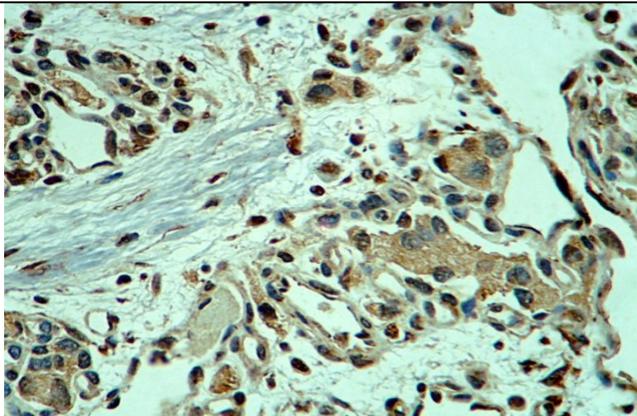
Fotografía 2 Detalle citológico (400X) de nichos con células grandes con citoplasma claro (flecha azul) rodeadas por células fusiformes (flecha amarilla) Tinción de HE. Fotos cortesía de la Dra. Rocío L. Arreola Rosales y de la Dra. Luz María Gómez



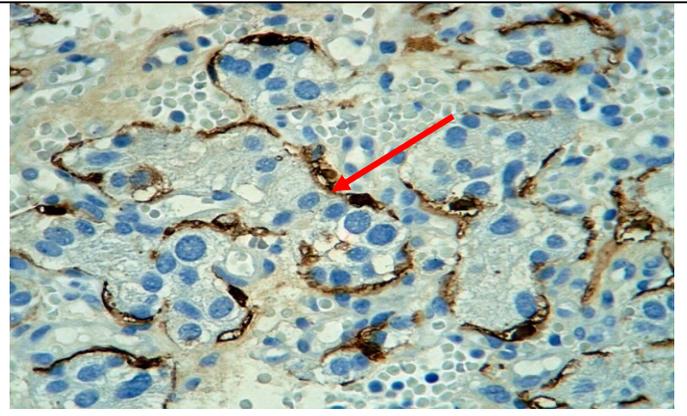
Fotografía 3 Tinción citoplasmática (100X) con IMHQ positiva para Cromogranina A (1:500) en las áreas de nichos observada en el HE. Fotos cortesía de la Dra. Rocío L. Arreola Rosales y de la Dra. Luz María Gómez Jiménez



Fotografía 4 Células neoplásicas (100X) con IMHQ positiva para Sinaptofisina (1:100). Obsérvese la tinción citoplasmática. Fotos cortesía de la Dra. Rocío L. Arreola Rosales y de la Dra. Luz María Gómez Jiménez

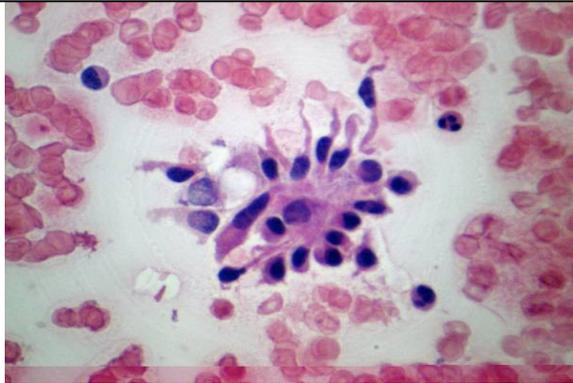


Fotografía 5 Células neoplásicas con tinción citoplasmática (400X) con IMHQ positiva para Enolasa neuronal específica (ENE, 1: 1000). Fotos cortesía de la Dra. Rocío L. Arreola Rosales y de la Dra. Luz María Gómez Jiménez

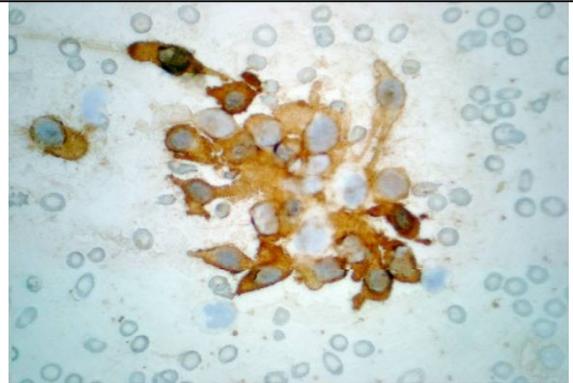


Fotografía 6 Tinción con referencia a fotografía 2, con células fusiformes que delimitan nichos tumorales (flecha roja)(400X) con IMHQ para Proteína S-100 (1:10 000). Fotos cortesía de la Dra. Rocío L. Arreola Rosales y de la Dra. Luz María Gómez Jiménez

Hospital de especialidades "Bernardo Sepúlveda "	
CMN SXXI IMSS	
Personal técnico a cargo de las tinciones de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia :	Histotecnologo Francisco Martínez Espinosa
Caso 2 IMHQ	Médico patólogo a cargo:
B08-139	Dr. Enrique Blanco Lemus
Tipo de muestra: Biopsia de medula ósea y extendido de medula ósea. diagnostico Leucemia Mastocítica	



Fotografía 7 BAAF de medula ósea (HE, 400X)
Obsérvese las células centrales, que por su forma y cantidad no son usuales en medula ósea. Fotografía cortesía del Dr. Enrique Blanco L.



Fotografía 8 BAAF de medula ósea con IMHQ positivo para CD-117 1:100 (400X) en el mismo grupo de células de la fotografía 7, determinándose como células mastocíticas, el preparado llego para citología, por lo que hubo que desteñir la muestra y hacer el procedimiento de IMHQ con tiempos y diluciones para este tipo de muestras. Fotografía cortesía del Dr. Enrique Blanco L.

Hospital de especialidades "Bernardo Sepúlveda "

CMN SXXI IMSS

Personal técnico a cargo de las tinciones de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia :

Histotecnólogo

Francisco Martínez Espinosa

Caso 3 IMHQ

Médico patólogo a cargo:

B07-2438

Dra. Luz María Gómez Jiménez

Tipo de muestra: Biopsia Endoscópica de Yeyuno

Muestra con metástasis de Coriocarcinoma con primario en testículo

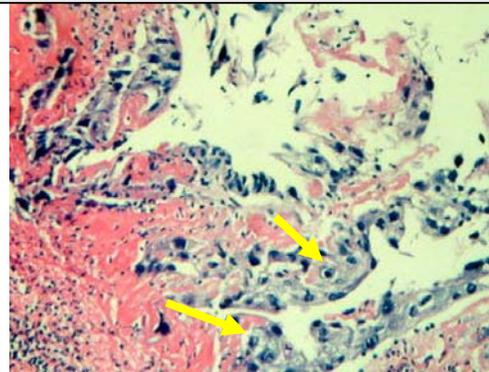
Panel de anticuerpos solicitados:

Hormona Godanotropica Coriónica

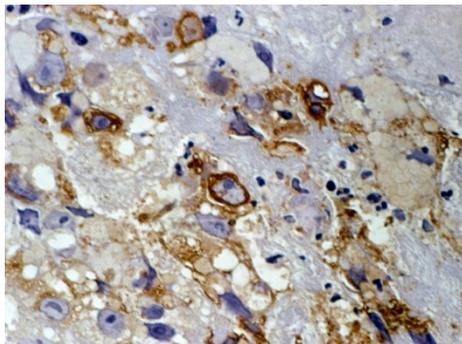
+



Fotografía 9 Lecho de ulcera con células neoplásicas (circulo rojo) , no se identifica mucosa de yeyuno (HE , 100X), células . Fotos cortesía de la Dra. Rocío L. Arreola Rosales y de la Dra. Luz María Gómez Jiménez



Fotografía 10 Acercamiento a zona de circulo rojo dela fotografia 9, donde se observa las células citotroblasto y sinciotroblasto (flecha amarilla)sin formación de vellosidades (400X) Fotos cortesía de la Dra. Rocío L. Arreola Rosales y de la Dra. Luz María Gómez Jiménez



Fotografía 11 Células de citotroblasto positivas para Hormona Godanotropica Coriónica en el citoplasma (1:1000, 400X) Fotos cortesía de la Dra. Rocío L. Arreola Rosales y de la Dra. Luz María Gómez Jiménez

Hospital de especialidades "Bernardo Sepúlveda "

CMN SXXI IMSS

Personal técnico a cargo de las tinciones de
Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia :

Histotecnólogo

Francisco Martínez Espinosa

Caso 1 IMF

Médico patólogo a cargo:

B06-4757

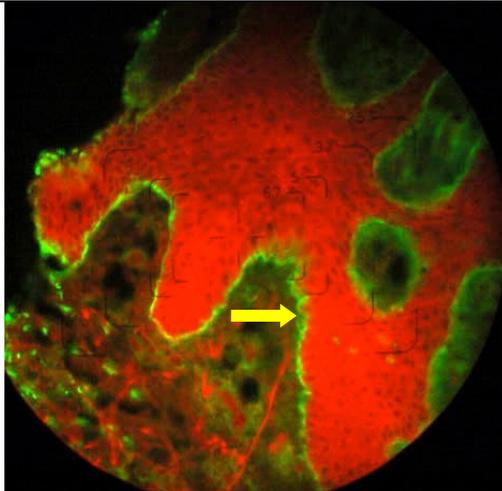
Dra. Lourdes Cabrera Muñoz

Tipo de muestra: biopsia por punción

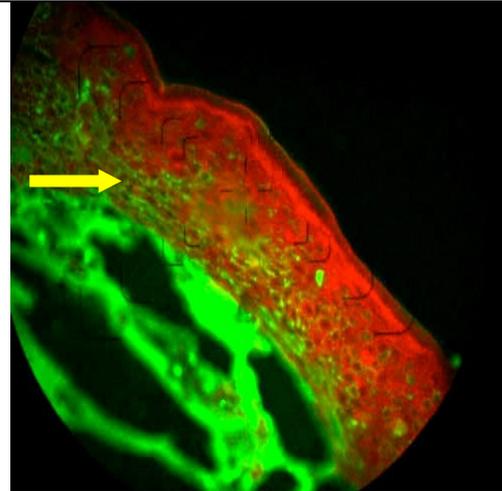
Muestra con diagnóstico lupus eritematoso

Panel solicitado :

IgG	+	C3c	+	IgM	-
IgA	-	C4C	-	C1q	-



Fotografía 12 Biopsia de piel por punción de paciente con sospecha de Lupus, con marca positiva para C3c en área adyacente de la dermis (flecha amarilla), característica de esta enfermedad. Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz



Fotografía 13 Biopsia de piel por punción del mismo paciente de fotografía 12 con sospecha de Lupus, marca positiva para IgG en área adyacente de la dermis (flecha amarilla), característica de esta enfermedad. Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz

Hospital de especialidades "Bernardo Sepúlveda"

CMN SXXI IMSS

Personal técnico a cargo de las tinciones de
Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia :

Histotecnologo

Francisco Martínez Espinosa

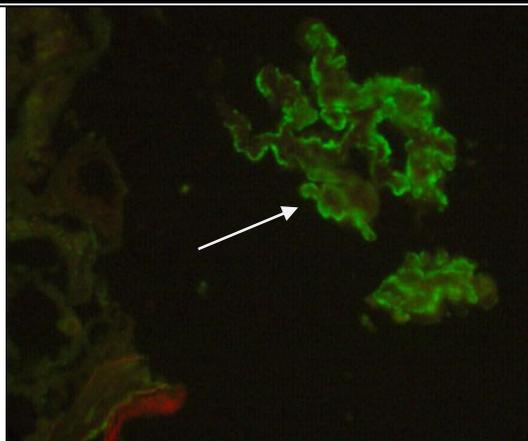
Caso 2 IMF

Médico patólogo a cargo:

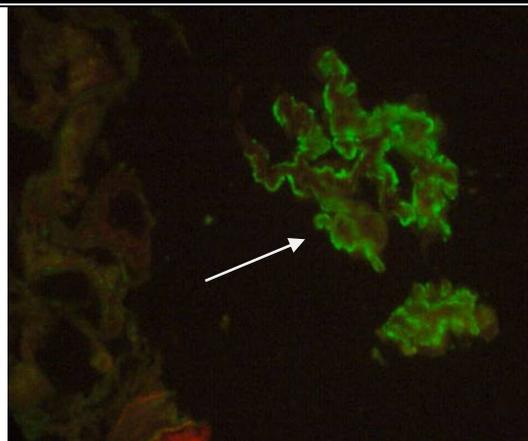
Dra. Lourdes Cabrera Muñoz

B06-5254

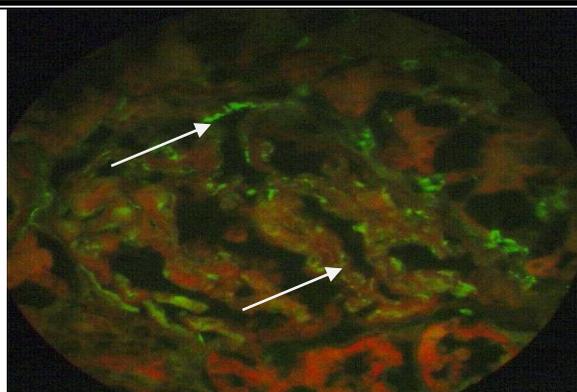
Tipo de muestra: biopsia por aguja fina de riñón con diagnostico glomerunefritis



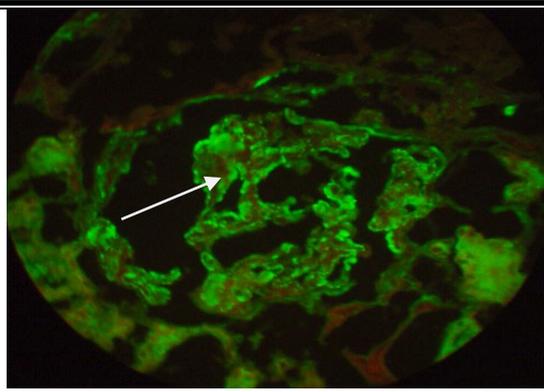
Fotografía 14 Biopsia de riñón por punción con aguja fina, zona glomerular con marcaje positivo a C3c (flecha blanca) Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz



Fotografía 15 Biopsia de riñón por punción con aguja fina, zona glomerular con marcaje positivo a C1q (flecha blanca) Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz



Fotografía 16 Biopsia de riñón por punción con aguja fina, zona glomerular con marcaje positivo a IgM (flecha blanca) Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz



Fotografía 17 Biopsia de riñón por punción con aguja fina, zona glomerular con marcaje positivo a IgG (flecha blanca) Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz

Hospital de especialidades "Bernardo Sepúlveda "

CMN SXXI IMSS

Personal técnico a cargo de las tinciones de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia :

Histotecnologo

Francisco Martínez Espinosa

Caso 1 IMF

Médico patólogo a cargo:

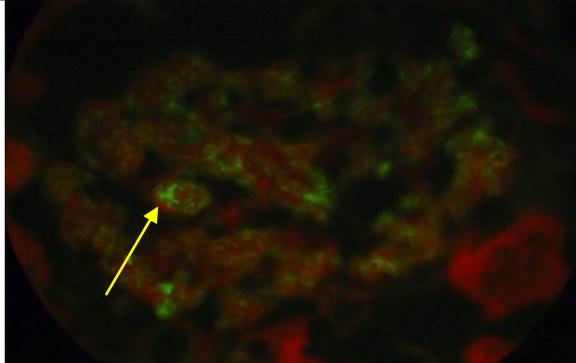
B06-5051

Dra. Lourdes Cabrera Muñoz

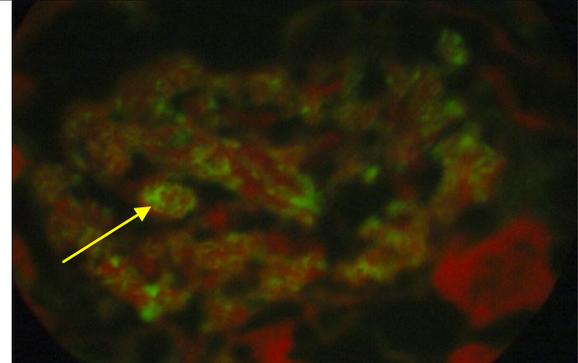
Tipo de muestra: biopsia por aguja fina de riñón con diagnóstico de glomerulonefritis

Panel solicitado :

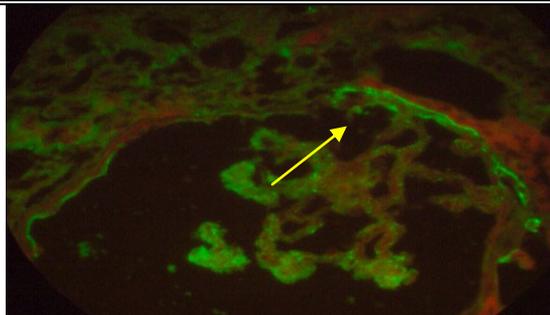
IgG	+	C3c	+
IgA	-	C4C	-
IgM	-	Fibrinógeno	+
C1q	-	Kappa	+



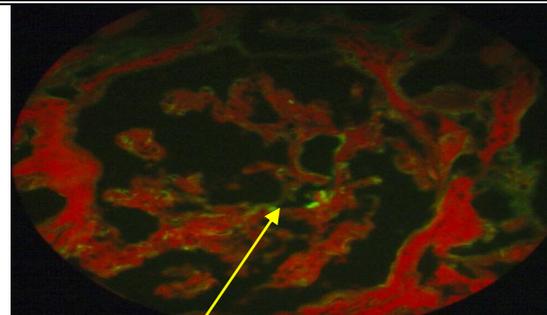
Fotografía 18 Biopsia de riñón por punción con aguja fina, zona glomerular con marcaje positivo a IgG (flecha amarilla), tinción focal. Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz



Fotografía 19 Biopsia de riñón por punción con aguja fina, zona glomerular con marcaje positivo a C3c (flecha amarilla), tinción focal. Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz



Fotografía 20 Zona glomerular con marcaje positivo a fibrinógeno (flecha amarilla), tinción focal. Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz



Fotografía 21 Zona glomerular con marcaje positivo a Kappa (flecha amarilla), tinción focal. Contraste con azul de Evan's, (400X). Fotografía cortesía de la Dra. Ma. De Lourdes Cabrera Muñoz

3.2 RESEÑA DE ACTIVIDADES

Las actividades que se ha llevado a cabo por ocho años en el laboratorio de anatomía patológica al que el autor esta adscrito, tiene una gran importancia para el diagnóstico oportuno de las patologías que sufren los derechohabientes del IMSS, pues tienen que ver con patologías de órganos como el riñón, el hígado, la piel y con pacientes trasplantados de los mismos; las actividades están enfocadas en tres diferentes técnicas ocupadas en la biología y que son consideradas como especializadas dentro de la rutina normal de un laboratorio de este tipo:

- ✚ La tinción de tejidos embebidos en parafina o congelación con colorantes específicos para diferentes componentes ó de organismos patógenos.

- ✚ La técnica de inmunofluorescencia en tejido congelado para riñón, hígado, piel, ganglio y órganos trasplantados en ocasiones se realiza en tejido embebido en parafina

- ✚ La técnica de inmunohistoquímica en tejido embebido en parafina o congelación, para determinar el origen o diferenciar de los tumores encontrados órganos o tejidos extirpados a los pacientes y en estudios exploratorios en las biopsias.

- ✚ Además se ofrece capacitación en estas técnicas a personal extranjero y nacional como profesor titular en un curso de técnicas diseñado por el autor, siendo este del tipo teórico-práctico; también, se realiza la tengo función como profesor en los cursos de formación de técnicos histotecnologos que el instituto imparte.

- ✚ También se da asesoría y apoyo en proyectos de investigación en estas técnicas, cuya función es realizar una correcta selección de anticuerpos y evitar una posible tinción de fondo, sistemas de detección, el manejo de las muestras y los protocolos de estandarización en parafina o congelado, en dobles o triples tinciones en cualquier de las técnicas. Así mismo se brinda el apoyo para resolver las posibles problemáticas que van surgiendo en el desarrollo de la técnica

ACTIVIDADES GENERALES

Entre algunas de las actividades generales se realiza está la preparación de reactivos que se ocupan en los diversos procesos en estas técnicas de laboratorio, esto es de gran importancia para llevar a cabo la preparación de los mismos dada su alta influencia en los resultados de la técnica, los reactivos son los siguientes:

- ✚ Amortiguadores para preparación de anticuerpos y como medios de incubación o lavado, de tipo sencillo o con otros reactivos que faciliten y conserven los anticuerpos.

- ✚ Preparación y aplicación de adhesivos para los portaobjetos, albúmina al 3% para IMF y gelatina-dicromato para IMHQ.

- ✚ Soluciones recuperadoras de antígenos comerciales o preparación para los diferentes métodos como son: recuperador de citratos 0.1 M pH 6.0, Antigen Retrieval (Dako) pH bajo o pH alto 10X, proteinasa K.

- ✚ Bloqueadores de enzimas endógenas y bloqueadores de proteínas para evitar la tinción de fondo en los tejidos, ya sean comerciales o preparados como son: solución de caseína, solución de leche descremada, bloqueador de avidina biotina. etc.

- ✚ Las sustancias reveladoras para los sistemas de detección de anticuerpos, para sistemas sencillos, de dobles ó triple tinciones, o reactivos para el reforzamiento de la tinción con soluciones de metales.

- ✚ Colorantes de contraste para las técnicas de IMF e IMHQ, como son el azul de Evan's hematoxilina y Azul celestino.

- ✚ Medios de montaje acuosos para IIV ,]MEIQ y técnicas de tinción para grasas

✚ También se hace el manejo de los portaobjetos ya teñidos que tiene que ser a 4°C para la IMF hasta el momento de ser analizados.

✚ Se lleva un control de calidad con el manejo de tejido testigo y fecha de elaboración de reactivos para asegurar que las tinciones sean óptimas y que los reactivos se conserven,

✚ Manejo y recepción de muestras de tejido congelado de riñón hígado, ganglio, piel, nervios para inmunofluorescencia (IMF) o microscopia electrónica, el corte de estos al criostato y realizar las pruebas de IMF.

ESPECIFICAS TINCIONES ESPECIALES

Estas tinciones se realizan para diagnosticar patologías específicas o especiales, así como para organismos patógenos que se quiere confirmen su presencia; estas técnicas por su complejidad son difíciles de estandarizar, pero una vez estandarizadas son de gran utilidad para el patólogo:

1. Tinción de impregnación argéntica de Bielchozky para fibras nerviosas, la cual tiene relevancia en varias patologías del sistema nervioso como son atrofias del sistema locomotor por ejemplo. Esta técnica se complementa con la de Luxol Fast blue, que tiñe las vainas de mielina del sistema nervioso.

2. Tinción de Auramina-Rodamina para bacilos de tuberculosis o ácidos alcohol resistentes , que es una técnica de fluorescencia , especifica de muy alta sensibilidad , en casos de pacientes que tienen síntomas pero que no han podido obtenerse resultados por otros métodos.

3. Técnicas de tinción para grasas neutras como la del rojo oleoso en tejido en congelación.

4. Así también realizó otras técnicas de tinción especial¹ de rutina como el PAS, Papanicolaou, Giemsa, Tricrómico de Masson, Rojo sirio-acido pícrico, Gomori, según el tejido y a solicitud del patólogo.

INMUNOHISTOQUIMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

Se realizan las técnicas IMHQ e IMF, así como los protocolos de estandarización para anticuerpos primarios, con el fin de obtener las diluciones apropiadas para las técnicas de IMF e IMHQ; estas pruebas consisten en obtener en tejidos testigos el marcaje de los antígenos por medio de diferentes diluciones de anticuerpo primario con diferentes tratamientos de recuperación, de tiempos y condiciones de incubación en el laboratorio y sistemas de detección.

Se analizan estas pruebas para obtener la mejor visualización (marcaje) de los antígenos buscados y obtener un protocolo que sea confiable y reproducible en los tejidos problemas.

Con las pruebas se asegura que el anticuerpo marque las zonas específicas que debe marcar y se sabe cuanta tinción de fondo produce, así también se logra economizar pues estos reactivos tienen un alto costo y de esta manera rinden más.

Además cada vez que se corre la técnica se debe incluir un testigo para cada antígeno buscado en los tejidos problemas.

Se han estandarizados 100 anticuerpos primarios con estos protocolos en el laboratorio, para diferentes paneles de aplicación, según las diferentes Categorías de anticuerpos que se enlistaron anteriormente (véase Pág. 22-23)

Además se han estandarizado cerca de 20 anticuerpos en los proyectos de investigación a los que se les da apoyo y asesoría (Corona, 2005; Rodríguez, 2005).

¹ Tinciones que se utilizan para demostrar estructuras especiales o sustancias en los tejidos, microorganismos y células.

En promedio hay 200 casos al año en los que se realiza estos protocolos de IMHQ en este tipo en el laboratorio. Cada uno con 5 anticuerpos en promedio por caso.

Las técnicas de inmunofluorescencia se realizan en tejidos congelados (biopsias) y tienen aplicación en patologías como el lupus (eritematoso, sistémico), en la detección de depósitos de inmunocomplejos en riñón para pacientes con síndrome de glomerulonefritis o pacientes trasplantados, en biopsias de piel e hígado para patologías específicas de estos.

El panel que se maneja es el siguiente, con el cual se pueden diagnosticar las patologías de estos órganos:

- Inmunoglobulinas: Ig G, Ig A, Ig I
- Complementos: Clq, C3, C4c
- Otros: Kappa, Lambda y Fibrinógeno que sirve además como control interno para testigo.

Se realizan por método directo, en el cual se colocan tres cortes de tejido en un portaobjetos (véase apéndice técnico 3) con adhesivo circulares con lápiz diamante con el número de biopsia y con la leyenda de el anticuerpo escrito por atrás con lápiz diamante para que facilite verlo al microscopio de fluorescencia y separadas con lápiz DAKO (hidrofóbico), para evitar la mezcla de las soluciones, esto permite usar menos volumen de anticuerpos diluidos. Antes se utilizaba un portaobjetos por corte, utilizando 9 laminillas mas el corte para Hematoxilina-Eosina (HE), ahora solo se ocupan cuatro.

Este proceso se debe a la mejora de las condiciones y realización de las técnicas para aprovechar al máximo los recursos logrando ofrecer a más derechohabientes los servicios con una calidad de atención buena y oportuna, que es una de las premisas del Instituto.

En promedio en el servicio se le realizan alrededor de 350 casos de pruebas de este tipo.

ENSEÑANZA Y CAPACITACIÓN

Ante la necesidad de que el personal conozca las técnicas de IMF e IMHQ, así como por solicitud de personal extranjero que necesita capacitación en éstas, se ha desarrollado un curso teórico-práctico para las técnicas de IMHQ, durante el cual se capacitó a 8 personas de El Salvador (5 técnicos, 3 médicos patólogos) y 18 alumnos en los cursos para formación de histotecnólogos que el instituto realiza para capacitar al personal pan cubrir sus necesidades de personal (Vela, 2004)

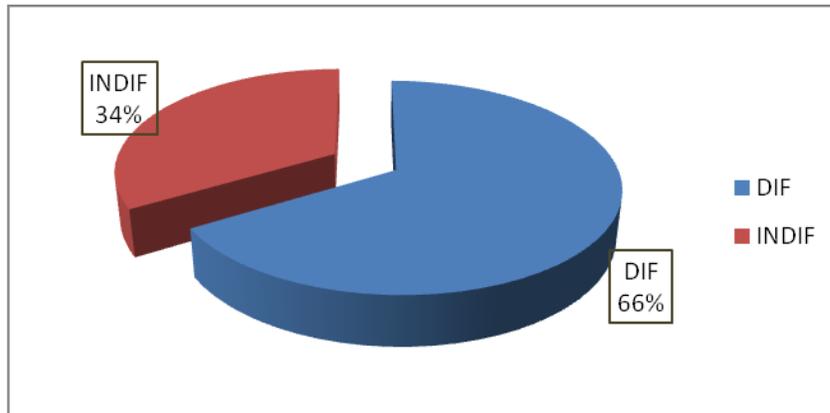
El curso está estructurado de manera que los alumnos comprendan tanto la teoría implicada, como las bases metodológicas de las técnicas, así como la práctica de diferentes métodos y protocolos. Con el objetivo de poder resolver problemas o poder aplicarlos con los reactivos que tengan en sus laboratorios.

Además se impartió un curso al personal del ISSS del El Salvador, el cual ha dado buenos resultados, por lo que se nos invito a impartir una capacitación en técnicas de IMHQ además de incluir técnicas de IMF en Octubre del 2005.

3.3 ESTADISTICAS POR TIPOS DE CASOS

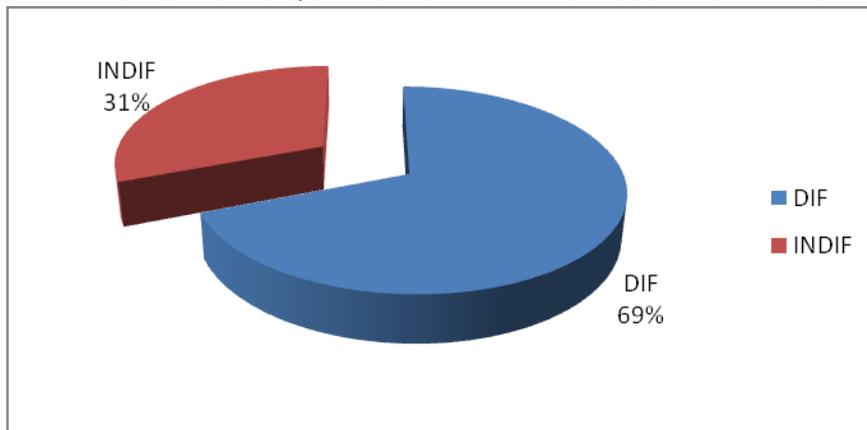
INMUNOHISTOQUIMICA

INMUNOHISTOQUIMICAS DEL AÑO 2005 POR TIPO



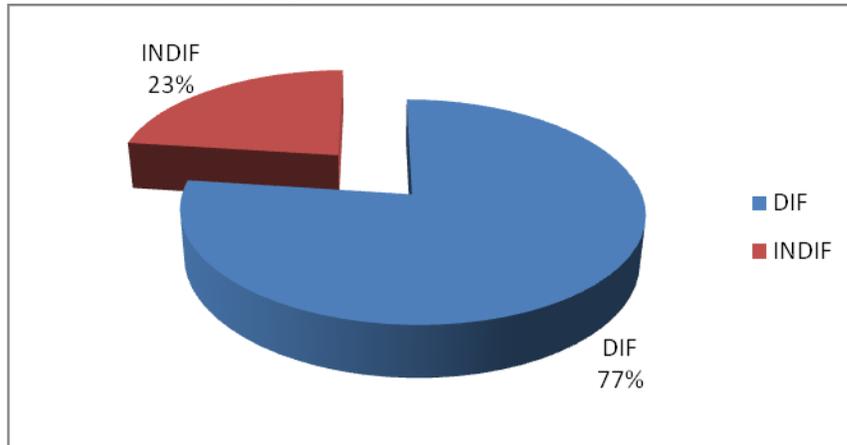
Diferenciados (DIF)	Indiferenciados (INDIF)
87	44
66% de casos en donde se uso la IMHQ como confirmación de diagnostico	34% de casos en donde se uso la IMHQ para determinar la extirpe histológica del tumor

INMUNOHISTOQUIMICAS DEL AÑO 2006 POR TIPO



Diferenciados (DIF)	Indiferenciados (INDIF)
85	38
69% de casos en donde se uso la IMHQ como confirmación de diagnostico	31% de casos en donde se uso la IMHQ para determinar la extirpe histológica del tumor

INMUNOHISTOQUIMICAS DEL AÑO 2007 POR TIPO

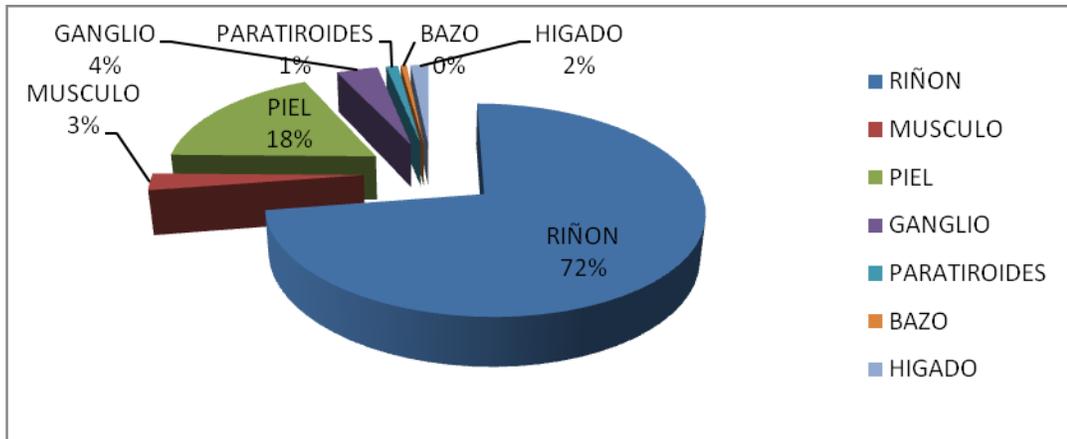


Diferenciados (DIF)	Indiferenciados (INDIF)
74	22
64% de casos en donde se uso la IMHQ como confirmación de diagnostico	31% de casos en donde se uso la IMHQ para determinar la extirpe histológica del tumor

INMUNOFLUORESCENCIA

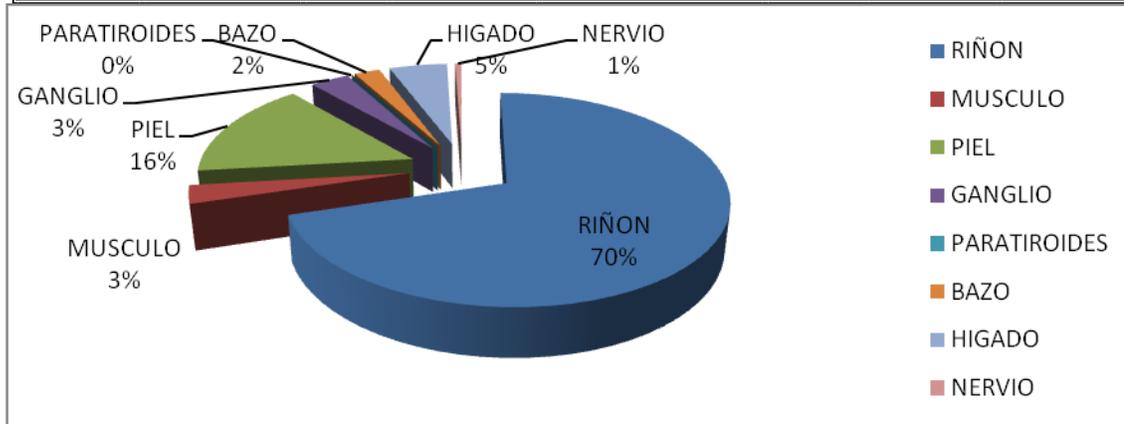
INMUNOFLUORESCENCIAS DEL AÑO 2005 POR ORGANO

BIOPSIAS 2005						
RIÑÓN	MUSCULO	PIEL	GANGLIO	PARATIROIDES	BAZO	HIGADO
135	5	33	7	2	1	3



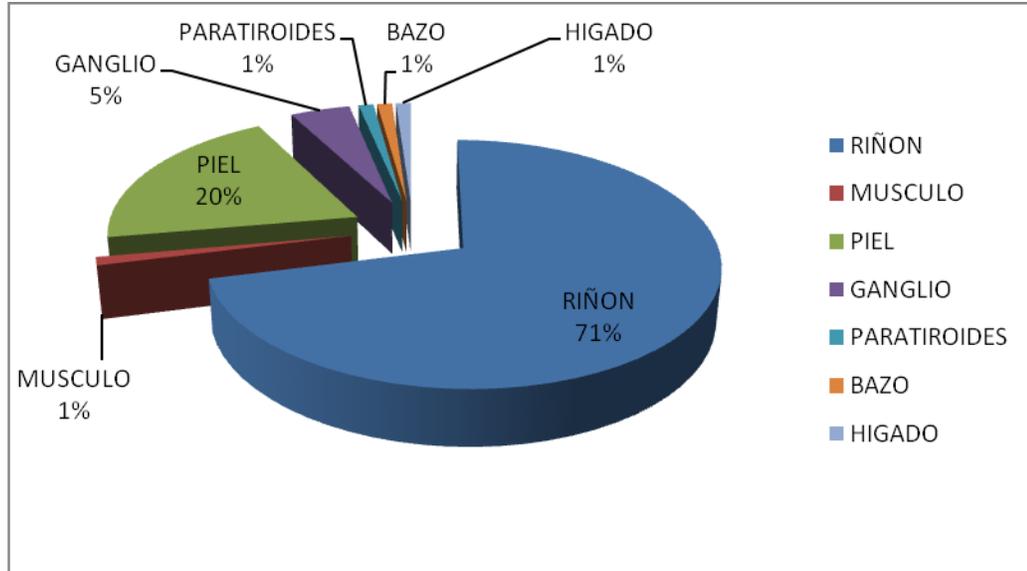
INMUNOFLUORESCENCIAS DEL AÑO 2006 POR ORGANO

BIOPSIAS DEL 2006							
RIÑÓN	MUSCULO	PIEL	GANGLIO	PARATIROIDES	BAZO	HIGADO	NERVIO
123	5	27	6	0	4	9	1



BIOPSIAS 2007						
RIÑON	MUSCULO	PIEL	GANGLIO	PARATIROIDES	BAZO	HIGADO
64	1	18	4	1	1	1

INMUNOFLUORESCENCIAS DEL AÑO 2007 POR ORGANO



APENDICE TECNICO 1

FACTORES QUE INFLUYEN EN LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS

Aunque la utilidad de la inmunohistoquímica en la patología esta probada, también se enfrentan desventajas, debido a que depende, como todo proceso técnico tiene interferencias.

Estas pueden ser muy variadas tanto en la forma de uso de los reactivos, como en las técnicas y protocolos que no han sido probados o estandarizados en los departamentos. Por lo que realizar controles para poder resolver cada uno de los posibles problemas que aparecen en el desarrollo de las mismas (proceso de detección).

El papel que juega el biólogo en este proceso, es sobresaliente debido que es el profesional que puede llevar a cabo con mayor facilidad este tipos de procesos y puede evitar los problemas que se presenten, con el fin de que los resultados de las pruebas sean confiables.

A continuación se presentan todos aquellos factores en donde están involucrados el manejo y tipo de muestra, que pueden provocar interferencia en los procesos de detección antigénica y sus soluciones, así como aquellos factores humanos que hacen que en las técnicas de detección, no se realicen de manera eficiente (DAKO, 2004).

POR TIPO DE MUESTRA

La principal desventaja que se enfrentan los diagnósticos con IMF e IMHQ es la posibilidad de que se presenten **falsos positivos o falsos negativos**.

Un tejido falso positivo es un caso en el cual se observa la identificación inmunohistoquímica del antígeno, sin tenerlo realmente. En caso contrario el falso negativo es el caso en donde el antígeno se encuentra, pero no se detecta por inmunohistoquímica. Este se puede dar debido a varias causas como es la tinción

de fondo y los factores que la provocan, así como el uso y concentración de los anticuerpos primarios y sistemas de detección.

Para resolver esto debe haber controles internos del departamento que consisten en el uso de **tejidos testigos positivos** a los antígenos buscado por los anticuerpos, es decir expresan o se sabe encuentra el antígeno.

La verdadera dificultad radica en encontrar en el testigo positivo algunos antígenos, que son de difícil obtención, como son tejidos infectados por virus y bacterias específicos, como el virus BK, el citomegalovirus, el virus de hepatitis, el Epstein-Barr virus y ciertos tumores que no son frecuentes, como hepatocarcinomas, tumores de ovario o testicular que expresen alfa-1-feto proteína, proteínas de vida corta como p53 que solo se expresa en tumores que acumulan esta proteína.

Sin embargo existen testigos que se encuentran mas fácilmente por que se expresan de manera natural en algunas de las células que conforman el cuerpo humano (Filamentos intermedios, hormonas, etc.).

Muchos de los departamentos de anatomía patológica hacen control de calidad con evaluaciones externas de sus resultados, probando así la fidelidad de los procesos que llevan a cabo.

TINCION DE FONDO

La tinción de fondo es el problema mas común en las técnicas IMHQ e IMF por lo cual se han propuesto varias teorías para explicarlas. El manual de Dako en su versión en ingles hace referencia a las teorías de la tinción de fondo de donde se tomaron las siguientes (Dako, 2004):

INTERACCIONES HIDROFÓBICAS

La hidrofobicidad es una propiedad inherente a la mayoría de las proteínas, esta propiedad tiene por objeto el de no permitir el paso de agua a través de su

estructura por lo que la mantiene alejada, pero es también la que mantiene unidas a diferentes proteínas que conforman una molécula, como por ejemplo: los complejos inmunes.

Esta propiedad es una fuerza natural que le confiere estabilidad a la estructura terciaria de las proteínas, aunque conviene destacar que también hay zonas hidrófilas. Un punto importante es que la hidrofobicidad de las proteínas solubles (anticuerpos) se incrementa por el almacenamiento y da lugar a la agregación, polimerización y conjugación con otras proteínas.

En los tejidos cuando se fija con aldehídos y glutaraldehidos estas uniones se hacen mas hidrofobicas por uniones cruzadas, donde reaccionan los aminoácidos epsilon y alfas de proteínas adyacentes , ya que esta es la función del fijador (precipitar proteínas para que sea mas difícil su descomposición).

Los tejidos que son mas afectados por este tipo de tinción de fondo son:

- Tejido conectivo (colágena, laminina, elastina, proteoglicanos, entre otros)
- Epitelios (Queratinas)
- Adipositos (lípidos)

Las subclases de inmunoglobulinas IgG₂ e IgG₄ son menos hidrofobicas que las IgG₁ e IgG₃.

FORMAS DE EVITAR LA HIDROFOBICIDAD

El tiempo, la temperatura y el pH de fijación son cruciales para evitar el exceso de uniones cruzadas. Es por esto que es uno de los factores que mas se debe controlar.

Se dice que la fijación excesiva se elimina fijando por un tiempo con Bouin, Zenker ó B5. Esto se evita al tener establecido los tiempos de fijación para cada tejido, que en la mayoría de los casos no debe pasar de 24 hrs.

Las interacciones hidrofobicas entre las proteínas del tejido y las moléculas de los anticuerpos esta influenciado por el tipo de iones y su concentración en la solución tampón o amortiguadora.

ANIONES Y CATIONES QUE DISMINUYEN LA HIDROFOBICIDAD:

Aniones: PO_4 , SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3 , SCN^-

Mayor ←————→ Menor

Cationes: NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+}

El cuadro anterior tiene importancia para comprender el por que se usan determinados reactivos en la preparación de los amortiguadores que se usan en IMHQ e IMF, los mas usados en estas formulas son fosfatos mono y dibásico (de sodio y/o de potasio) y cloruro de sodio, en diferentes molaridades y osmolaridades.

Otros métodos que se pueden utilizar es agregar al amortiguador cualquiera de las siguientes sustancias:

- Detergentes (Tween 20, Triton, etc.)
- Etilenglicol

También se puede subir el pH del diluyente (buffer), comúnmente se trabaja en un rango de 7.2 a 7.4 pH, se puede usar el rango de 7.6 a 7.8 por ejemplo.

O utilizar sustancias que se denominan bloqueadores de proteínas, que tienen la función de unirse o bloquear las proteínas que causa la hidrofobicidad:

- Albúmina Serica Bovina (BSA 22%)
- Caseína
- Leche descremada (libre de grasa)
- Estuche comercial de bloqueo de proteínas para Adivina – Biotina

INTERACCIONES IONICAS

Se refiere a las cargas netas que tienen las proteínas en los medios de dilución, que pueden provocar el alejamiento o la unión inespecífica con las sustancias en el tejido por ejemplo:

Las cargas netas de un anticuerpo es de 5.8 a 7.3 (+) y el buffer es de de 7.0 a 7.8, y algunos sitios cargados negativamente como los endotelios y las fibras de colágena, ya que los anticuerpos son positivos, también esta carga negativa se encuentra en el vidrio o el plástico que se utiliza en su almacenaje, por lo que se pierde parte del anticuerpo.

FORMAS DE DISMINUIR LA INTERACCIONES IÓNICAS

La adición de NaCl al 0.1 a 0.5 M al tampón ayuda a disminuir este tipo de interacción, *aunque algunos autores no lo recomiendan para anticuerpos monoclonales* (Dako, 2004).

Uno de los problemas que se presentan con estos dos factores es que al disminuir las interacciones iónicas se aumenta la hidrofobicidad y viceversa.

ACTIVIDAD ENZIMATICA ENDÓGENA

Los organismos vivos utilizan para su metabolismo varias enzimas (Roskoski,1998) dentro de las cuales existe la peroxidasa que interviene en la descomposición del H_2O_2 y es una propiedad común de todas las hemoproteínas como la hemoglobinas (eritrocitos), mioglobina (músculo), citocromo (granulocitos/monocitos) y catalasas (hígado y riñón).

Estas enzimas reaccionan ante la presencia de ciertos catalizadores y sus sustratos, por lo que se ocupa en algunas técnicas histotecnológicas de enzimología (García del moral, 1993), pero en IMHQ es de vital importancia bloquear este tipo de reacción, para que solo reaccione la del sistema de detección y así visualizar la marca del cromógeno del sistema de detección .

Formas de disminuir la AEE

- Se incuba el tejido con H_2O_2 al 3% de 10 a 20 min.
- Agregando azida de sodio al buffer de incubación.
- Utilizar otra enzima como la fosfatasa alcalina (no recomendado para intestino) o esta se elimina exponiendo el tejidos a ácido acético al 20% o ácido peryodico al 2.5 %.

ANTICUERPOS NATURALES Y CONTAMINANTES

Son los que están presentes de manera natural en los antisueros en bajas concentraciones (naturales) que resultan como contaminantes por los métodos de inmunización. Debido a que un agente extraño (antígeno) presenta varios epitopos o por presencia de otros antígenos al mismo tiempo, por lo que son difíciles de eliminar por los medios de separación habituales y muchas veces no interfieren con la especificidad.

- Se eliminan con las diluciones altas o con tiempos de incubación cortos.
- Se pueden agregar bloqueadores de proteínas como paso previo.
 - Nota : En los anticuerpos monoclonales no existe este problema

AVIDINA- BIOTINA ENDOGENA

Se debe a la presencia de la vitamina Biotina y su coenzima presentes en varios tejidos como en el riñón e hígado. Se observa mas en tejido cortado en congelación en criostato.

Esta proteína tiene una gran afinidad para unirse a los anticuerpos y se usa en algunos sistemas de detección como el ABC, Vectastain, etc. Se utiliza ya que la avidina tiene 4 lugares de unión con biotina, y la biotina solo uno, por lo que si no se bloquean los demás lugares pueden interactuar con la presente en el tejido. Además de que en su estructura la avidina tiene varios carbohidratos (10%) que tienden a unirse inespecíficamente.

La biotina tiene la particularidad de unirse al anticuerpo en la zona denominada constante, además de unirse a la enzima peroxidasa o la fosfatasa alcalina, formando un complejo.

Formas de evitar TF A-B

- Se debe incubar los tejidos con soluciones de avidina y después de biotina por 10 a 20 min. con una rango de 0.01-0.1% antes del anticuerpo primario
- Utilizar sistema con *estreptavidina* que no presenta este problema

DIFUSIÓN DE ANTIGENOS

Esta tinción de fondo se debe a que el antígeno a detectar se ha difundido (se infiltra) a otro lugar de donde se encuentra habitualmente, como ejemplo la tiroglobulina (única hormona que se acumula) o por estar presente en el plasma sanguíneo como la cadenas kappa y lambda de las inmunoglobulinas. También puede ser por la digestión llevada a cabo por macrófagos de los antígenos a marcar (virus, bacterias).

Difusión de antígenos soluciones

- Hacer la fijación lo mas pronto posible
- Hacer las diluciones mas altas
- No manipular demasiado los tejidos (apretar), en especial tiroides.

REACTIVIDAD CRUZADA

Es cuando los anticuerpos reconocen su epitopo en otras proteínas del tejido porque son compartidas con ellas o son parecidas en estructura.

- Un ejemplo de esto es el antígeno carcinoembrionario (CEA) con tejido normal
- Los antígenos de los grupos sanguíneos.

Soluciones para la reactividad cruzada

- Se evita seleccionando clones.

RECEPTORES FC

Se debe a los receptores en la membrana de macrófagos, granulocitos, células B y T, para la fracción constante de los anticuerpos. Son más afines las inmunoglobulinas IgG₂ y IgG₃ monoclonales de ratón que a las otras clases de inmunoglobulinas.

Soluciones a RFC

- Estos receptores son solubles en detergentes
- se puede usar fragmentos F(ab')₂,
- selección de los anticuerpos monoclonales.

PROZONE

Un fenómeno denominado prozone, que en inmunohistoquímica consiste en que a altas concentraciones del anticuerpo no hay marca al aplicar el revelador del sistema de detección, provocando así un falso negativo, porque hay la creencia que si no marca anticuerpo contra el antígeno y no hay tinción de fondo debe concentrarse más la dilución del anticuerpo. Pero el verdadero problema de esto es que los anticuerpos forman un complejo cargado que impide que se de la reacción enzimática que da coloración. Es decir hay una gran concentración de anticuerpo unido al antígeno, lo cual forma una capa protectora que impide el revelado.

Formas de corregir prozone

- Se debe diluir más el anticuerpo.
- La estandarización de los anticuerpos es una de las mejores de evitar el prozone, ya que así se prueban diferentes diluciones y condiciones de recuperación (véase apéndice técnica 2), para establecer la dilución de trabajo.

OTROS FACTORES

- Lesión física del tejido
- Tejido seco antes de la fijación
- Fijación incompleta
- Áreas necróticas en el tejido
- Residuos de parafina
- Cortes montados en baños de flotación con gelatina o contaminados

NOTA:

El exceso de contraste puede ocultar la coloración específica, por lo que no se debe utilizar como solución para ocultar la tinción de fondo.

FACTOR HUMANO

Otro de los factores más importante para la realización, calidad y reproducibilidad de las técnicas es el personal que las lleva a cabo, ya que el

conocimiento que tenga el personal sobre las técnicas y la teoría involucrada es de gran ayuda para la mejora de técnicas y tiempos de realización.

Este conocimiento permite decidir que reactivos se pueden usar y que precauciones se deben tomar para los problemas que influyen en la obtención de resultados.

La mayoría de los problemas que se presentan se pueden resolver antes de realizar las técnicas en biopsias de pacientes, siempre y cuando se prueban las técnicas en tejido testigo.

Un protocolo para realizar inmunohistoquímica se puede consultar en cualquier publicación de investigación que haga uso de ella, en libros del tema, en los manuales de casas comerciales o de laboratorio, se trata de pasos a seguir con ciertos reactivos propuestos en cada uno de los protocolos, pero en la experiencia, se sabe que el que funciona es el que cada departamento lleva a cabo y que da resultados, es decir con los reactivos y materiales que hay en cada laboratorio, con los tiempos de incubación, manejo o no de la temperatura, anticuerpos, bloqueadores o no de proteínas, recuperadores y sistema de detección que se tenga a la mano. Es decir hay que adaptar las técnicas a los procesos del departamento de patología en donde uno trabaja, es decir en las condiciones disponibles.

Para ejemplificar esto se puede mencionar que existen muchos y muy variados amortiguadores para llevar a cabo las técnicas de IMHQ, y muchos varían principalmente en la fórmula de los componentes o de uno de los reactivos.

Ejemplo de esto es el amortiguador de fosfato (PBS) a un pH 7.4 y una molaridad a 0.01M, que se ocupa en el departamento de anatomía patológica del hospital de especialidades, que fue calculado, para usar un mínimo de reactivos, pues solo usa 0.9 g de fosfato de sodio dibásico, 0.54 g de fosfato de potasio monobásico y 0.58 g de cloruro de sodio por litro de solución, en comparación de usado en el manual de DAVILAB (Portales, 1997) donde se utilizan 1.48 g de fosfato de sodio Dibásico, 0.43 g de fosfato de potasio monobásico y 7.2 g de cloruro de

sodio por litro de solución, haciendo un gasto mas grande de reactivos y sin evitar problemas de tinción de fondo y prozone.

El hospital de especialidades del instituto salvadoreño del seguro social (ISSS), el amortiguador no se adapto a las condiciones del departamento, por lo que en base al curso que tomaron modificaron la formula y eliminaron el cloruro de sodio de la formula, obteniendo resultados similares a los que se obtienen en el departamento de anatomía patológica del hospital de especialidades CMN SXXI del IMSS.

Uno de los beneficios mas inmediatos e importantes de la inmunohistoquímica llevada a este nivel, es por ejemplo, si se realiza la técnica para cualquiera de las hormonas hipofisarias que el fabricante recomienda en una dilución de **1:50**, con el amortiguador de bibliografía pueden hacerse en algunos departamentos a una dilución de **1:100**, pero en el departamento de HE CMNSXXI se ha logrado que se hagan con una dilución **1:10,000**, siendo evidente que las diluciones que se manejan son mas altas que las recomendadas, sin tinción de fondo y sin el uso de otros reactivos para evitar tinción de fondo, obteniendo este tipo de resultado se permite que se pueden hacer mas estudios, se economiza en los costos, por lo que se benefician a mas de derechohabientes del instituto, por lo que se logra así uno de las principales funciones del IMSS (IMSS, 2004).

Por otro lado los protocolos de IMHQ que se usan van de acuerdo al tipo de antígeno que se quiere demostrar, sin embargo la mayoría de los departamentos usan solo uno, pero existen anticuerpos que se pueden demostrar de varias maneras, como por ejemplo las **citoqueratinas**, el mejor método de recuperación es por medio de digestión enzimático con **proteasa K**, sin embargo también se pueden hacer recuperación con amortiguador de citratos pH 6 o con un recuperador comercial, dando un buen marcaje.

Otros como el **CD 20**, se puede hacer **sin recuperación, con citratos o con recuperador comercial**, la diferencia entre cada procedimiento es el tiempo de incubación y la dilución a la que se usa el anticuerpo primario. La importancia de esto es que si el personal que lleva a cabo estas técnicas y tiene esta información

puede aplicarlas en caso de la falta de algún reactivo, si existe o se sospecha de un mal manejo de la muestra.

APENDICE TECNICO 2

TEORÍA DE LA ESTANDARIZACIÓN

Conocer las características de un anticuerpo es poner en práctica los conocimientos previos que se manejaron. La teoría de la estandarización es un paso previo a las técnicas protocolizadas de los departamentos de anatomía patológica, ya se obtiene así toda la información que se necesita para resolver los problemas de ese anticuerpo en particular.

La información que se encuentra en el inserto que nos provee el fabricante no siempre no da resultado pues es solo una guía de cómo trabaja el anticuerpo, con todos los reactivos del proveedor. Nos da información sobre las características más importantes del anticuerpo, que debe venir con el anticuerpo por parte del fabricante.

Si no se tiene es importante saber como obtener esta información y extrapolarla al anticuerpo en cuestión. **El no tener y no tomar en cuenta esta información es estar ciego, sin saber que no vemos.**

Se debe tomar en cuenta del inserto:

- Clona y tipo de IgG que es el anticuerpo, de que especie y contra que especie fue fabricado, si tiene cruza con alguna especie
- Método de purificación, si fue extraído de liquido por precipitación, electroforesis, purificado por cromatografía o extraído de sobrenadante de cultivo.
- Concentración, cantidad de proteína por mililitro de solución (mg/ml)
- Ambiente en que trabaja, si el tejido o células en donde se aplique debe ser de cortes hechos en :
 - Congelado(cortes en criostato sin fijación o fijados en acetona)
 - Parafina (fijados en formol)
 - Ambos (trabaja en ambos ambientes)

- Método de recuperación propuestos, para que den una mejor señal¹ en los tejidos en parafina:
 - Sin recuperar (no se ve afectado por la fijación)
 - Citratos (se ve ligeramente o moderadamente por la fijación)
 - Enzimas (se debe romper la proteína para exista señal, pues la conformación se vio afectada o el epitopo se enmascara por la fijación)
 - Recuperador comercial propuesto (*Antigen Retrivial, Declere, Trilogy , EDTA*)
- Tiempo de incubación
 - Se propone como un tiempo estimado en el cual el anticuerpo reacciona con el antígeno y haya suficiente uniones para ser visualizadas al revelar el cromógeno, si se trabaja en ambientes fríos se aumenta, si se trabaja en ambientes calurosos se disminuye.
- Sitio o células que marca, en que sitio de la célula marca y tipo de célula neoplásica o normal.
 - Sitios
 - Citoplasmático (interior de la célula, puede o no marcar en núcleo). Por ejemplo: el anticuerpo para cromogranina A, marca gránulos citoplasmáticos sin marcar núcleo, el anticuerpo para el virus de hepatitis B SURFACE marca el citoplasma y en ocasiones el núcleo.
 - Nuclear (marca el núcleo de la célula, puede marcar o no en citoplasma). Por ejemplo: el anticuerpo para el virus de hepatitis B CORE marca núcleos y en ocasiones citoplasma.
 - Extracelular (marca la membrana celular, sin marcar citoplasma o núcleo). por ejemplo: los CD marcan en la membrana celular
 - Células
 - Normal, se expresa en células del tejido en estudio, por ejemplo: citoqueratinas que existen en los epitelios.

¹ Señal, se refiere a la intensidad de la coloración obtenida, que se considera que es proporcional a la cantidad de antígeno reconocido en el tejido.

- Neoplásicas, se expresa en células que no tienen funciones normales, por ejemplo: P53 solo se expresa en células que funcionan mal y lo acumulan
- Que por ciento de casos marca, ya que muy pocos anticuerpos son 100% positivos
- Fecha de caducidad, entre mas cercana es su fecha de caducidad, se espera que sea menos reactivo, pero existen casos de que aun después de varios años de caducos siguen funcionando como nuevos si se mantienen en condiciones optimas (a 4 °C).
- Fabricante, las presentaciones y clonas no son iguales entre diferentes marcas, ni la concentracion
- Testigo, qué tejidos, normales o neoplásicos, se pueden usar como positivos al anticuerpo
- Diluciones de trabajo propuesta por el fabricante, que es la dilución que recomienda para obtener resultados con sus reactivos.

Si se necesita hacer un protocolo con un anticuerpo, pero no se cuenta con esta información, esto se puede resolver si se consigue la información en:

- Insertos de otros fabricantes (Vector, Biogenex)
- Internet, pagina del fabricante generalmente la única opción que no ofrece es la dilución de trabajo ([www. immunoport.com](http://www.immunoport.com))
- Libros y artículos en donde se haya trabajado con el anticuerpo
- Experiencias personales de otros histotecnologos

Teniendo lo anterior se puede estandarizar la técnica por medio de un protocolo que nos llevara a saber nuestra dilución de trabajo y el tratamiento en el departamento.

Este protocolo se debe realizar en “teoría” para cada anticuerpo que se tenga en el laboratorio

DILUCIONES, SUS MATEMÁTICAS Y SUS PROBLEMAS

“Las reglas de las matemáticas son universales, por lo menos en este planeta”

Francisco Martínez

Si se hace extraño porque se empieza por un tema de esta índole (matemático) un protocolo de estandarización es que la experiencia, uno de los problemas que más se presenta es la falta de comprensión o el manejo al hacer cálculos para obtener diferentes diluciones de un anticuerpo y que esto se puede hacer uso de poco material para hacer las pruebas, así al usar las matemáticas de una fórmula nos ayuda a preparar una solución madre.

La solución madre es una solución concentrada de anticuerpo con una dilución 1:10 (proporciones). No es como viene en el frasco del fabricante, ni se toma en cuenta la concentración por mililitro, es una concentración arbitraria, es decir se toma 1 μL de anticuerpo concentrado por cada 9 μL de amortiguador.

Para preparar una cantidad mayor se multiplica este factor por el número más cercano a la cantidad deseada en múltiplos de 100

Sigamos este ejemplo:

Se necesitan 100 μL de solución madre para ensayar varias diluciones por lo que se debe extrapolar la dilución 1:10 a esta se divide

$$100/10=10$$

Por lo que 10 es el factor de multiplicación

$$1 \times 10 = 10; 10 \times 10 = 100$$

Para guardar la relación se aplica la siguiente resta

100-10=90.

Por lo que a 90 μ l de amortiguador se le agregan 10 μ L de anticuerpo y se tiene la solución Madre.

La forma de preparar las diluciones de estandarización se hacen a partir de una solución madre y cuyo cálculo se hace a partir de la formula:

$$V1C1 = V2C2$$

Donde:

- **V1** es el volumen desconocido, es decir el que vamos a calcular
- **C1** es la concentración de sol. Madre (1/10), expresada en numero decimal (0.1)
- **V2** es el volumen que vamos a preparar de anticuerpo en microlitros
- **C2** son las concentraciones o diluciones de trabajo que se van a probar expresadas en decimales.

Diluciones estándar para probar un anticuerpo (expresada en decimales)

Dilución	Expresada en decimales
1:50	0.02
1:100	0.01
1:500	0.002
1:1000	0.001
1:5000	0.0002
1:10000	0.0001

Estos valores se sustituyen en la formula despejando V1, tomando en cuenta por ejemplo que se necesitan 100 µL por cada muestra (es un ejemplo pues lo mínimo para cubrir un tejido):

$$V1 = \frac{V2 C2}{C1}$$

Para una sol 1/100

$$V1 = \frac{(100)(0.01)}{(0.1)}$$

$$V1 = 10 \mu\text{L}^*$$

Para una sol 1/50

$$V1 = \frac{(100)(0.02)}{(0.1)} = 20$$

Para una sol 1/500

$$V1 = \frac{(100)(0.002)}{(0.1)} = 2$$

Para una sol 1/1000

$$V1 = \frac{(100)(0.001)}{(0.1)} = 1$$

Para una sol 1/5000

$$V1 = \frac{(100)(0.0002)}{(0.1)} = 0.2$$

Para una sol 1/10000

$$V1 = \frac{(100)(0.0001)}{(0.1)} = 0.1$$

*Microlitos que se toman de la solución madre.

1:50	20 µL
1:100	10 µL
1:500	2 µL
1:1000	1 µL
1:5000	0.2 µL
1:10000	0.1 µL
total	33.3 µL

Los cálculos demuestran que necesitamos preparar una cantidad menor a 100 µL de sol. Madre por lo que hay que ajustar las cantidades a usar para 40 µL

Ajustando cálculos

Se necesitan 40 µL de solución madre para ensayar varias diluciones por lo que se debe extrapolar la dilución 1:10 a esta se divide

$$40/10=4$$

Que es el factor de multiplicación

$$1 \times 10 = 4; 10 \times 4 = 40$$

Para guardar la relación se aplica la siguiente resta:

$$40 - 4 = 36$$

Por lo que a 36 μL de amortiguador se le agregan 4 μL de anticuerpo y se tiene la solución Madre.

Volumen a tomar de la solución Madre	Adicionar vol. de buffer	Total a preparar
20 μL	80 μL	100 μL
10 μL	90 μL	100 μL
2 μL	98 μL	100 μL
1 μL	99 μL	100 μL
0.2 μL	99.8 μL	100 μL
0.1 μL	99.9 μL	100 μL

MÉTODOS DE RECUPERACIÓN

Son tratamientos que se aplican a los cortes de tejido montados en portaobjetos, para recuperar la antigenicidad de los epitopos

Dado que se considera que con los métodos de fijación del tejido muchos de ellos se enmascaran. Se consideran 4 métodos principales o básicos en una estandarización que son:

- Sin recuperar : no se le da tratamiento, sirve de testigo
- Enzimático: por ejemplo digestión con Proteinasa K

- Tratamiento con buffer/recuperador de citratos a pH 6.0
- Tratamiento con recuperador comercial como:
 - Declere
 - Antigen retrieval
 - Inmuno/Dna retriever con citratos

En una estandarización normal o estándar se deben hacer los 4 métodos. Se pueden realizar con solo dos métodos sin recuperación y el de citratos, si no se dispone de los otros recuperadores, pero si ninguno de estos dos métodos da un marcaje óptimo se deben hacer las pruebas con los otros dos

TIEMPO DE INCUBACIÓN

Es uno de los factores que junto con la dilución tiene una gran influencia en la técnica porque depende de la reactividad del anticuerpo primario.

El tiempo promedio de un anticuerpo es de 30 minutos, existen algunos que necesitan 2 horas de incubación.

TEMPERATURA DE TRABAJO

La temperatura ideal es la de medio ambiente, con un control de la humedad relativa, por lo que debe de preferencia hacerse en cámara húmeda.

También se puede poner a una temperatura de 37°C si se dispone de una cámara húmeda con regulación de temperatura pero debe estandarizarse el tiempo de incubación el cual disminuye

Cualquier protocolo que se haga en temperaturas bajas o bajo condiciones de refrigeración debe extenderse el tiempo de incubación (días fríos o 4°C)²

² Al estandarizar es seguir un mismo protocolo, si se cambia algo después de la estandarización se pueden obtener resultados no esperados (tinción de fondo, no marcaje, etc.). Así mismo el cambio de un reactivo o agregar uno que no se usaba también debe ser tomado en cuenta para resolver posibles fallas

TESTIGO

Un testigo es aquel tejido que posee o expresa un antígeno en particular que se quiere detectar. Existen testigos muy generales y fáciles de conseguir, por ejemplo: Apéndice: actina, desmina, pS100, algunos CD, Ck cóctel, EMA, CEA, etc.

Pero hay algunos que son más difíciles como de algunos tumores o para virus, por ejemplo: Tejido infectado con LMP1-EBV, CMV, o tumores positivos a alfafetoproteína, etc.

La mejor manera de probar una estandarización es tener un testigo fiable al antígeno buscado. Conociendo las posibles causas de los falsos positivos se puede asegurar que las técnicas de IMHQ son correctas, por ejemplo:

- El HMB45 puede ser confundido con melanina endógena de la piel

ESTABILIZACIÓN DE ANTICUERPOS

Es un procedimiento técnico con el cual se logra que el anticuerpo de trabajo se mantenga con sus propiedades de marcaje del antígeno, sin que se vea afectado por otros factores que causan tinción de fondo (véase apéndice A) o permitiendo la visualización (sin tinción de fondo). Esto se logra por medio de reactivos químicos con diferentes funciones.

REACTIVOS USADOS PARA ESTABILIZAR UN ANTICUERPO

- BSA (albúmina sérica bovina)³
- Detergentes (*Triton*, Jabón neutro, *Dextran*)
- Azida de sodio

³ También se usa como adhesivo para laminillas en inmunofluorescencia.

Que función tiene los componentes

- BSA

Cubre o se une a proteínas inespecíficas del tejido. Evita que se pegue el anticuerpo a las paredes del vidrio o plástico de tubo de ensayo de preparación y el portaobjetos.

- Azida de sodio

Es un conservador. Evita la proliferación de bacterias. Evita la tinción de fondo al bloquear la peroxidasa endógena.

- Detergentes

Permeabiliza las membranas de las células, permitiendo la penetración del anticuerpo, Evita cargas en el tejido.

EJEMPLO DE ESTANDARIZACIÓN

En la practica un buen ejemplo para explicar esto es la estandarización de la vimentina, un filamento intermedio que se encuentra en músculo y es considerado como un testigo esencial para saber si se ha fijado bien el tejido o se ha expuesto a temperaturas muy altas al embeberlo en parafina.(Dosljak,1999)

Si no marca con métodos habituales de inmunohistoquímica se considera que el tejido no fue bien fijado o fue mal manejado.

Otra problemática que presenta este anticuerpo en la estandarización es un fenómeno denominado prozone y que se prueba con el uso de las diluciones, , que en inmunohistoquímica consiste en que a altas concentraciones del anticuerpo no hay marca al aplicar revelador del el sistema de detección , provocando así un falso negativo, hay la creencia que si no marca anticuerpo contra el antígeno y no hay

tinción de fondo debe concentrarse mas la dilución del anticuerpo, lo cual con este protocolo para anticuerpo se demuestra que es erróneo, y que se enfatiza la necesidad de estandarizar, probar las diferentes diluciones y no fiarse de los insertos, que sirven solo como guía.

Ejemplo de estandarización de un anticuerpo

Anticuerpo:	Vimentina (V9)
Tipo:	Monoclonal
Especie:	Ratón vs. Humano
Clon: Subtipo:	IgG1 kappa
Dilución recomendada por fabricante:	1:15-1:20
Recuperación recomendada fabricante:	ninguna
Testigo:	Apéndice
Aplicación :	parafina y congelado
Sistema de detección:	En visión y LSAB+ (universal o Monoclonal)
PROTOCOLO DEL IMSS CMNS XXI H. ESPECIALIDADES	
Vimentina	
Testigo:	apéndice
Dilución:	1:500
Recuperación:	En olla de presión citratos pH 6.0 por 10 minutos.
Bloqueo de peroxidasa:	30 minutos
Incubación:	30 minutos s/bloqueo de proteínas
Sistema de detección:	cualquiera

El protocolo del este anticuerpo se maneja a una dilución de 1:500 sin recuperar o recuperados en citratos, sin bloqueadores de proteínas , incubado el primario por 30 minutos con sistema de detección LSBA (Label Estratipvidina-avidina) con incubación en cada uno de los reactivos 2 ario y 3ario ,se revelo con DAP diez minutos, contrastado con hematoxilina , montado en medio resinoso.

APENDICE TECNICO 3

MANEJO Y PREPARACIÓN DE LAS BIOPSIAS INCLUIDAS EN PARAFINA

Los bloques de parafina deben ponerse a refrigeración a 4° C por una hora o más, también los bloques de tejido testigo a usar, según sea los casos, para facilitar el corte de los mismos.

Se deben cortar a 3 µm de espesor y sin ningún tipo de adhesivo añadido al agua del baño de flotación.

Se montan¹ en portaobjetos con adhesivos ya previamente preparados (Grenetina –Dicromato, Poli-L-lisina, Silano, o portaobjetos con carga) se deben sacar solos los cortes necesarios² para el numero de anticuerpos solicitados, se corta y se monta el testigo (+) correspondiente a los anticuerpos.

Estos se repite por cada uno de los portaobjetos según sean necesario en cada caso, se puede poner testigos control en portaobjetos por separado si son muchas casos de un mismo anticuerpo y se procesan igual que los demás portaobjetos.

Se dejan secar y se guardan hasta que se comience el protocolo de IMHQ

PROTOCOLO DE IMHQ

- Se ponen a desparafinar los portaobjetos a una temperatura de 60-70°C por 15 a 30 minutos aproximadamente, hasta que se observe que se ha desparafinado por completo los portaobjetos.

¹ Montar: se recogen del baño de flotación el tejido problema y testigo en un portaobjetos,

² Se puede cortar más portaobjetos de los necesarios pero no es recomendable ya que pueden acumular polvo y se contaminan con el paso del tiempo.

- Se introducen **sin demora** en xilol para desparafinalización (se debe tener aparte de los líquidos de tren) y se dejan por 5 minutos.

- Se pasa por cada uno de los líquidos del tren³ de *hidratación/deshidratación* **exclusivo** para inmunohistoquímica (*xilol [2 cambios], alcohol absoluto. [2 cambios], alcohol al 96° [2 cambios]*) hasta llegar a PBS a pH 7.4/0.01 M. en vaso coplin.

- Se deja en PBS por 5 minutos y después se hacen enjuagues rápidos en PBS otras 2 veces, este procedimiento se repite cada vez que se mencione en el protocolo lavar* en PBS.

- Se procede a hacer la recuperación antigénica según el diagrama 1 para cada anticuerpo en particular

- Se sigue el procedimiento según recuperador usado.

- Se lava*

- Se bloquea en peróxido de hidrógeno al 3% de 20 a 40 minutos

- Se lava con piseta con PBS y se ponen en vaso coplin

- Se lava*

- Se aplica el anticuerpo primario (monoclonal/policlonal) según la dilución establecida en los protocolos de estandarización.

- Se deja incubar por el tiempo establecido en los protocolos de estandarización, cuidando que no se seque.

- Se lavan con piseta y se colocan en vaso coplin

- Se lava*

- Se aplica el anticuerpo secundario de acuerdo al sistema usado (Envision) y al tipo de anticuerpo primario usado (poli o monoclonal)

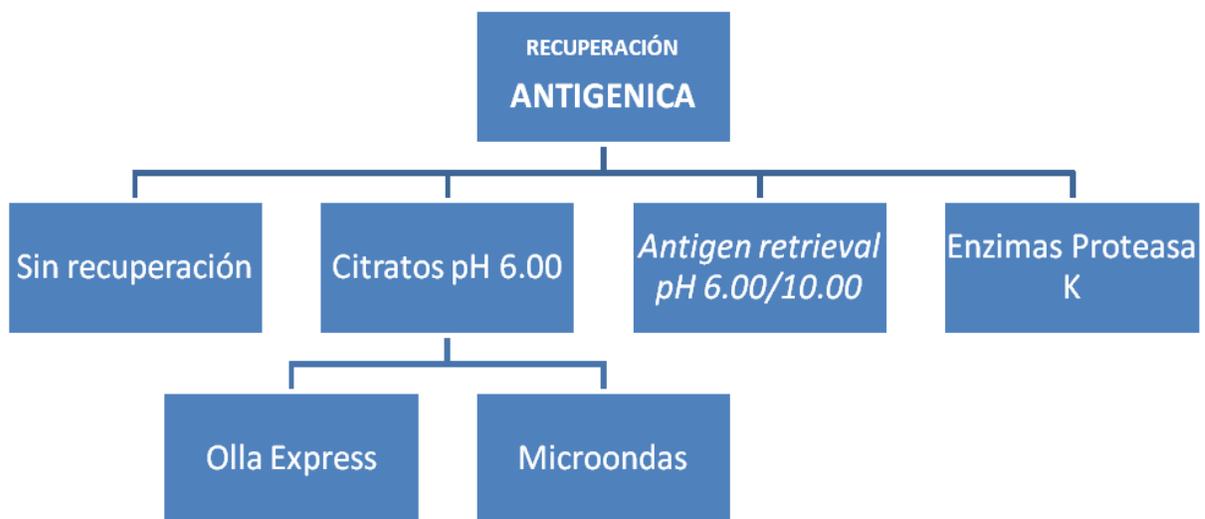
- Se incuba por 10 a 30 minutos (Envisión)

- Se lavan con piseta y se colocan en vaso coplin

³ Secuencia de líquidos (alcoholes de diferentes grados, alcohol absoluto y xilol) que sirven para hidratar o deshidratar los tejidos

- Se lava*
- Si se usa un sistema de detección que utilice un anticuerpo secundario (LASB, ABC, LASB2, TARGET, ABC, etc.) se aplica y se deja incubar por el tiempo de 10 a 30 minutos y se aplica otro lavado antes del paso siguiente
- Se revela con DAB y se incuba por 1 a 10 minutos. Se deben observar al microscopio, para saber si hay reacción en el testigo que sea positiva y si no hay tinción de fondo.
- Si se observa marca de positividad en el testigo, se lavan con piseta con agua destilada y se colocan en vaso coplin con agua destilada
- Se contra tiñen con hematoxilina
- Se deshidratan hasta xilol en el tren de tinción de IMHQ
- Se montan en medio resinoso (Entelan) u otro medio según el caso de cromógeno usado
- Se etiquetan y se entregan para su diagnóstico por el patólogo

Diagrama 1

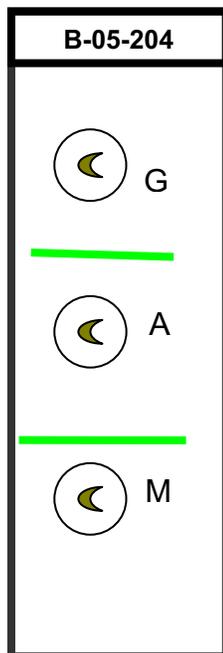


PROCEDIMIENTO DE IMF

RECEPCION DE LAS BIOPSIAS INCLUIDAS PARA CONGELACION

Las biopsias de tejido (riñón, hígado, ganglio, etc.) que se usa para congelación se reciben en el transoperatorio o en la sala de recepción de muestras, **no debe venir fijado** solo en solución salina para su transporte, del tejido se toma una sección para inmunofluorescencia y lo demás se usa para procesarse en parafina (rutina) .

Las biopsias deben ponerse a refrigeración a menos (-20 a -30 °C), por lo cual esto se hace embebido en **medio de congelación**⁴ para corte optimo en temperatura (OCT). Se guarda en refrigerador hasta su corte en el Criostato.



CORTE Y MONTAJE EN CONGELACIÓN

- Se deben cortar a 3 μm de espesor y sin ningún tipo de adhesivo añadido al agua del baño de flotación.
- 9 cortes para el protocolo (IgG, IgA, IgM, C1q, C3, C4c o C4d, F, K y L) y un HE del inicio de los cortes y al final de los cortes en el mismo portaobjetos ⁵
- Se montan en portaobjetos con adhesivos ya previamente preparados (albúmina al 10%, poli-L-lisina, Silano, o portaobjetos cargados)
- Se dejan secar 10 minutos a temperatura ambiente, se colocan en acetona fría (4°C) por 10 minutos, se retira la acetona y se dejan secar, se pueden

⁴ Tissue-tek o Jung medios con polivinilo-alcohol, polietileno glicol

⁵ No se deben cortar más portaobjetos de los necesarios, debido a que las biopsias son pequeñas.

guardan hasta que se comience el protocolo de IMF en refrigeración (a 4° C) no mas de dos días.

PROTOCOLO DE IMF

- Se marcan los portaobjetos con la inmunoglobulina a usar
- Se circula con lápiz diamante alrededor de la biopsia (corte)
- Si se tiene, se pone lápiz hidrofobico entre cada corte como se muestra en la figura 1.

- Se colocan en solución buffer pH 6.00 (PBS) por uno o dos minutos
- Se sacan del buffer y se seca el exceso, sin dejar que los cortes se sequen, se le agrega el anticuerpo correspondiente a cada uno de los cortes con la dilución establecida para cada uno de ellos.

- Se ponen en cámara húmeda
- Se incuban de 20 minutos a 1 hora según la temperatura ambiente,
- Se lavan en solución buffer con una piseta con mucho cuidado.
- Se colocan en vaso coplin con PBS, se enjuaga 3 veces con PBS.
- Se drena y se agrega solución de azul de Evan's al 1% por cinco minutos

- Se drena el azul de Evan's (se recicla), y se lava 3 veces con PBS, se dejan en buffer.

- Se montan en glicerina-buffer y se guardan en refrigeración a 4°C y en oscuridad hasta su observación*.

Nota:

- Nunca dejar secar los cortes.
- Lavados con cuidado, los cortes se pueden caer.
- Se puede hacer en parafina, solo tomar en cuenta la autofluorescencia en tejido fijado y que se sigue el protocolo de IMHQ hasta la hidratación del corte y se procede con el protocolo de IMF. "Las preparaciones duran de 6 meses a un año en estas condiciones"

APENDICE TECNICO 4

REACTIVOS

ADHESIVO PARA PORTAOBJETOS IMF

ALBÚMINA 10%

- Albúmina Serica Bovina al 22% (BSA).....10 gotas
- Agua destilada1 litro

Preparación:

Se coloca en un recipiente el agua destilada y se agrega las diez gotas de BSA, se agita y se guarda en refrigeración. Nota: Tiene una caducidad de una semana en refrigeración.

Preparación de portaobjetos:

Los portaobjetos se colocan en rejilla y se sumergen por 10 min. Se colocan en estufa a 60 °C por una hora, se dejan enfriar y se guardan en sitio limpio y seco. Caducan al mes por no usar antibacterial y fungicida, dado que interfieren en la técnica

ADHESIVO PARA IMQ

GELATINA-DICROMATO

- Grenetina grado alimenticio2.5 a 5 gramos
- Dicromato de potasio0.5 gramos
- Timol0.1 gramos
- Agua destilada..... 1 Litro

Preparación:

Se coloca en un recipiente el agua destilada, se agrega la grenetina y se agita, se puede calentar para disolver la grenetina, se deja enfriar un poco y se

agrega el dicromato de potasio y a continuación el timol. Su color debe amarillo-rojizo y no debe presentar grumos. Se conserva en refrigeración Nota: Tiene tres semanas de caducidad en refrigeración. Si se aglutina se puede calentar para disolver los grumos. Si tiene un color verdoso no se use (contaminación por hongos o bacterias).

Preparación de portaobjetos:

Los portaobjetos se colocan en rejilla y se sumergen por 10 min. Se colocan en estufa a 60 °C por una hora, se dejan enfriar y se guardan en sitio limpio y seco. Caducan a los tres meses, dado que interfieren en la técnica

POLI-L-LISINA

- Poli-L-lisina10 ml
- Agua destilada o desionizada 1 litro

Preparación:

Se coloca en un recipiente el agua bidestilada y se agrega los diez mililitros de Poli-L-lisina, se agita y se guarda en refrigeración. Nota: Tiene una caducidad de tres meses en refrigeración. Esta cantidad alcanza para preparar de 300 a 500 portaobjetos

Preparación de portaobjetos

Los portaobjetos se colocan en rejilla y se sumergen por 10 min. Se colocan en estufa a 60 °C por una hora, se dejan enfriar y se guardan en sitio limpio y seco. No Caducan. También se usa en IMF

AMORTIGUADORES

PBS PH 7.4, 0.05 M

Fosfato de sodio dibásico	0.9 gramos
Fosfato de potasio monobásico.....	0.54 gramos
Cloruro de sodio	0.6 gramos
Agua destilada	1 litro

Preparación:

Se coloca el agua destilada en un matraz de precipitado usando agitador mecánico o magnético, se agregan cada uno de los reactivos, hasta la completa disolución de los reactivos. Se debe medir el pH y se ajusta con soluciones de NaOH 2M ó HCL 1N Caduca a la semana, no se guarda en refrigeración pues cambia el pH.

Usos: preparación de anticuerpos, para realizar lavados y preparación de otros reactivos.

CITRATOS PH 6.0

Ácido cítrico.....	2.1 gramos
Agua destilada	987 mililitros
Ajuste de pH con 13 ml de hidróxido de sodio al 2 M	
Detergente libre de fosfato.....	6 ml (opcional)

Preparación: se coloca el agua destilada en matraz de precipitados, se agrega el ácido cítrico, y se ajusta con los 13 ml de NAOH 2M, se puede usar o no el detergente libre de fosfato. Caduca al mes.

Uso: recuperación antigénica de manera general. En baño Maria, olla Express o microondas.

BLOQUEADOR DE PEROXIDASA AL 3 %

H ₂ O ₂ al 30 %.....	10 ml
Alcohol metilico ó agua destilada (usar solo uno).....	90 ml

Preparación: se mezclan los dos reactivos en un frasco ámbar. Se guarda en refrigeración.

Uso: para el bloque de peroxidasa endógena, su caducidad es de dos semanas, se puede reciclar, no se tira después de su uso.

VOCABULARIO

Isótipos: son las diferencias entre las 5 cadenas pesadas y ligeras de las clases de inmunoglobulinas

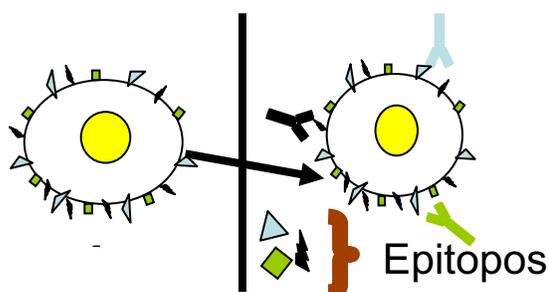
Alotipos: son pequeños cambios que puede tener un individuo normal en el ordenamiento de un aminoácido en particular, en las diferentes cadenas de sus inmunoglobulinas (debido al código genético)

Idiotipos: se refiere a la especificidad antigénicas individuales que se encuentran en el sitio activo de cada inmunoglobulina, esto es que cada clona tiene un idiotipo diferente (diferente parte del antígeno)

Sitio activo: es la parte que interacciona específicamente con un antígeno, cada Ig tiene dos sitios activos

Especificidad: es un atributo fundamental inmunológico de los antígenos, se refiere a la capacidad de reconocer entre diferentes variantes en la posición original en la molécula de los epitopes contra los cuales fueron creados, ayuda además a demostrar que las reacciones con los antígenos sea solo con ellos y no con otros parecidos.

Bacteria con diferentes epitopos y varios antígenos que responde a estímulos diferentes



Epítipo: parte que interacciona con el receptor de los linfocitos.

Paratope: parte del receptor de los linfocitos que se une al antígeno.

Agratope: parte del antígeno que interacciona con las moléculas de CMH

Desetope: región de la molécula de CMH que hace contacto con el agratope

Antigenicidad: capacidad de crear una respuesta inmunológica

Inmunogenos: inducen una respuesta positiva inmunológica contra sus determinantes.

Tolerogenos: inducen una tolerancia a sus determinantes

BIBLIOGRAFIA

Abbas, Abul K. Inmunología celular y molecular. 2002, 4ta edición, Mac Graw-Hill-interamericana. España, 577 Pág.

All, V.D., Protein localization by fluorescence microscopy: a practical approach. 2000, Oxford University Press. 231 Pág.

Bennington, James L. Inmunomicroscopía: a diagnostic tool for the surgical pathologist. Vol 10. In the series major problems in pathology. 1986. Saunderson company, Philadelphia, USA. 452 Pág

Colvin, Robert B, Bhan, Atul K., Mc Cluskey, Robert T., Diagnostic inmunopathology. 1995. 2da edición. Raven Press NY 1000, Pág.

Cormack, David H., Fundamentos de Histología, 1984, Editorial Harla, México, 549 Pág.

Corona, Atziri Romero. Comparación entre la virulencia de una mutante en la formación de fagosomas gigantes de *salmonella entérica* Serovar *typhimurium* y la cepa silvestre en el modelo de fiebre tifoidea murina. 2005. Tesis licenciatura, Químico Fármaco Biólogo, Facultad de Química . UNAM. 39 Págs.

Dosljak, Suzie. Inmunoperoxidase Method. 1999. Institute of medical and veterinary science. The Queen Elizabeth Hospital Division, Department de Histopathology. Canada, 10 Pág.

García del Moral, Raymundo, laboratorio de anatomía patológica, 1993 Interamericana-McGraw-Hill, 1993, España 657 Pág.

García, Tamayo Fernando, Fundamentos de Inmunobiología. 1997. UNAM. 544 Pág.

Herman, B. Fluorescence microscopy: Microscopy Hand Book, 1998, 2da Edicion, Bios Scientific Publisher Spring. 170 pag.

Dako. Marc key, Immunohistochemical Staining Methods, 2006 Fourth Edition USA. 184 Pág.

IMSS. Plan de estudios de formación de histotecnólogos, 2004

Indirect Immunoenzyme Technique. Immunoportal, [http://: www.immunoportal.com](http://www.immunoportal.com)

Marc Key, PhD, Immunohistochemical Staining Methods, cuarta edición Key Biomedical Services ° Ojai, CA, USA

Mark, R. Wick , Immunohistochemical Approaches to the Diagnosis of Undifferentiated Malignant Tumors. Annals of Diagnostic Pathology 12 (2008) Págs. 72-84.

Portales, Gloria L., Gonzáles, Víctor D., Manual de procedimientos para inmunohistoquímica: una guía práctica. 1997. DAVI-LAB, México, 25 Pág.

Prophet, Edna B., métodos histotecnológicos.1995, AFIP, USA.280 Pág.

Rodríguez, Luís Gerardo Torres. “Descripción Inmunohistoquímica de Adenomas Hipofisarios de Pacientes con Acromegalia e Hiperprolactinemia”, 2005, Tesis de Especialidad, Facultad de Medicina UNAM, 27 Pág.

Rosk, FW, Fluorescence Microscopy, vol. II, 1995. England, Cambridge University Press, 4575 Pág.

Roskoski, Robert Jr. Bioquímica, 1998. Mac Graw-Hill-Interamericana. México. 560 Pág.

Rubins, Emmanuel. Farber, John L. Patología-fundamentos. 1992, editorial panamericana. 752 Pág.

Salomon, Eldra Pearl; Berg , Linda R; Martin, Diana W; Vilee, Claude. Biología de Vilee .3era Edicion. 1996, Interamericana Mac Graw Hill. México. Cap. 34 Págs. 837_860.

Sánchez, Alejandro Pacheco, Torres, José E. Hernández. Ortiz, Carlos hidalgo. Manual de procedimientos de inmunohistoquímica e hibridación in situ.2000. Hospital ABC, Departamento de patología, México.32 Pág.

Ulrika, V. Mikel. Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology, 1994.Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) 254 p.

UNAM, Plan de estudios carrera de Biología, FES Zaragoza, 1980.

Vela, Guadalupe M., Alvarado, Ernesto A. Lovos. Informe sobre entrenamiento en técnicas de inmunohistoquímica para patología quirúrgica general, en Hospital de Especialidades CMN "SXXI", 2004. ISSS, Hospital de Oncología, el salvador. 45 Pág.

VESTASTAIN. Instrucciones, Vector laboratorios. Burlingame, usa