

INMUNOHISTOQUIMICA

Técnicas inmunohistoquímicas

- ✓ **aplicación de reacciones Ag/Ac**
- ✓ **únicas o secuenciales**
- ✓ **altamente sensibles**
- ✓ **identifican antígenos que se encuentran en tejidos o células**

Antígenos

Sustancia, que inoculada en un animal, es capaz de desencadenar una respuesta inmunológica con expresión humoral y/o celular.

Hapteno

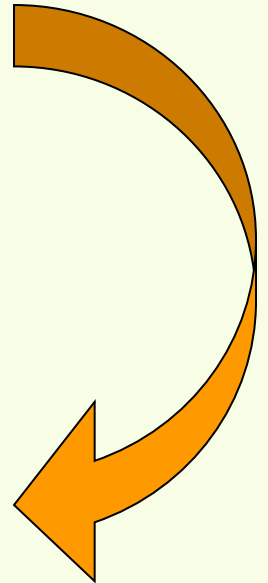
Molécula capaz de reaccionar específicamente con un Ac pero no de inducir su síntesis para lo cual es necesario que se una con una proteína.

Determinante Antigénica

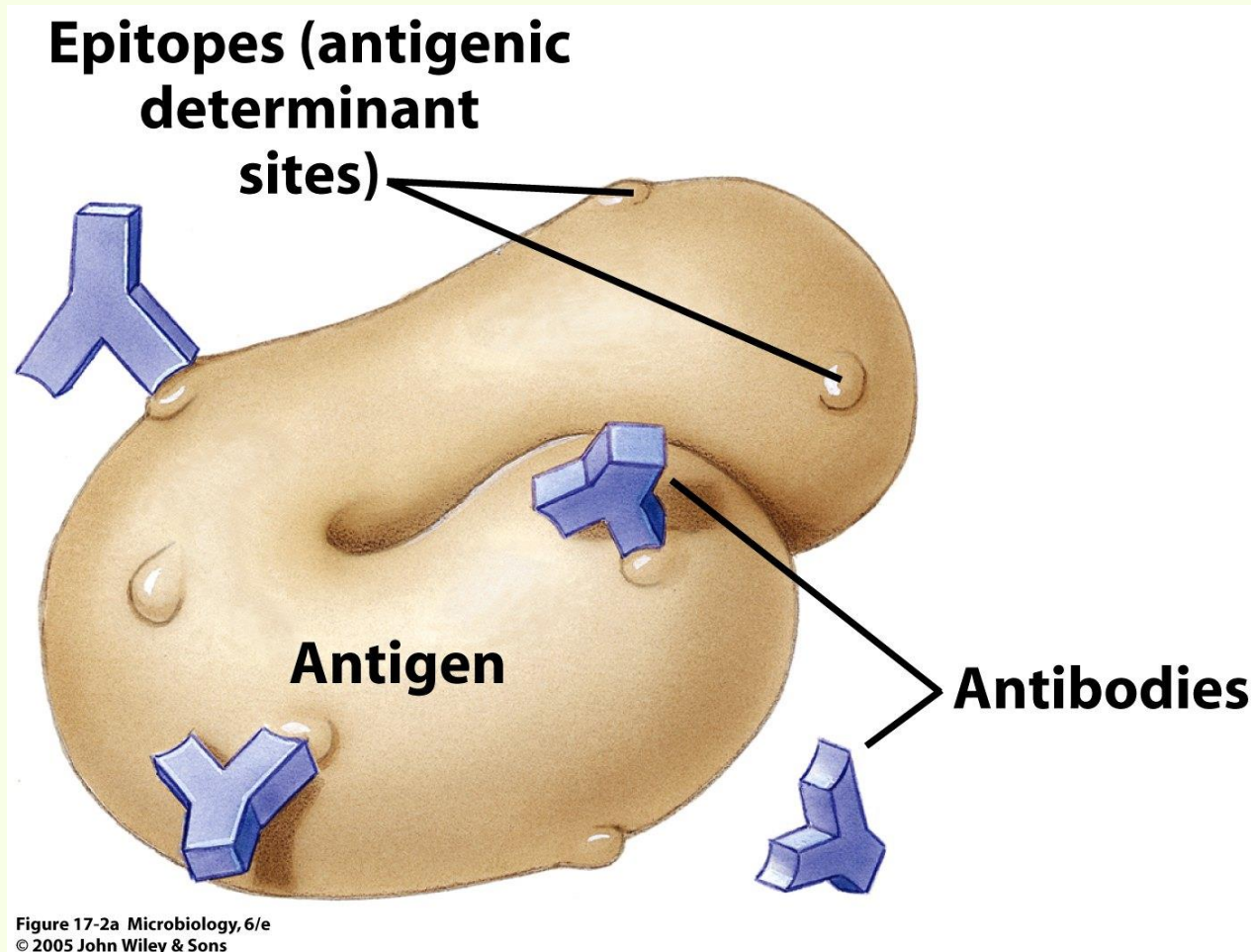
Las moléculas del Ag no presentan antigenicidad homogénea sino que poseen pequeñas áreas responsables de la especificidad que se denominan **determinantes antigénicas o epitopes.**

- **Distintos antígenos pueden compartir una o más determinantes antigénicas**
- **Existe labilidad de las determinantes antigénicas a los agentes físicos y químicos.**
- **Poseen especificidad de órgano y de especie.**

RECUPERACION ANTIGENICA



Reacción antígeno-anticuerpo típica: los anticuerpos se unen a grupos o estructuras químicas específicas llamados **EPITOPES** o **DETERMINANTES ANTIGENICAS**



Reacción Antígeno/Anticuerpo típica: una bacteria gram-negativa patógena podría tener varios antígenos o inmunógenos (flagelos, fimbrias y pared celular)

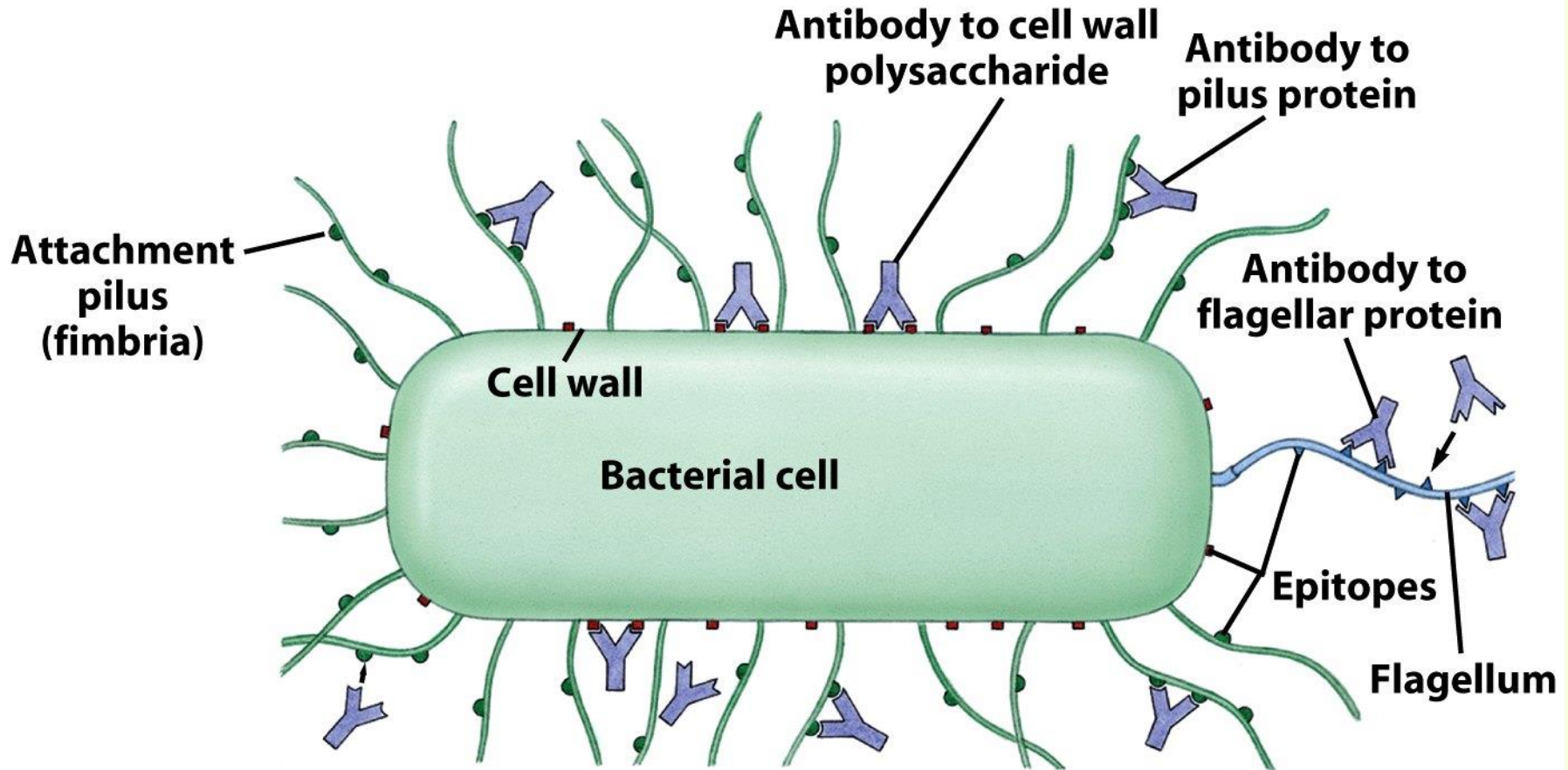


Figure 17-2b Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

ANTIGENOS, INMUNOGENOS Y HAPTENOS

ANTIGENO:

Cualquier sustancia capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o a un receptor de células T

MOLECULAS DE BAJO PESO:

metabolitos intermediarios, azúcares, lípidos, autacoides, hormonas

MACROMOLECULAS:

polisacáridos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, proteínas

HAPTENO:

antígeno incapaz de generar por sí mismo una respuesta inmunitaria contra él: precisa unirse a una proteína portadora

INMUNOGENO:

antígeno capaz de activar las células inmunitarias para generar una respuesta inmunitaria contra él

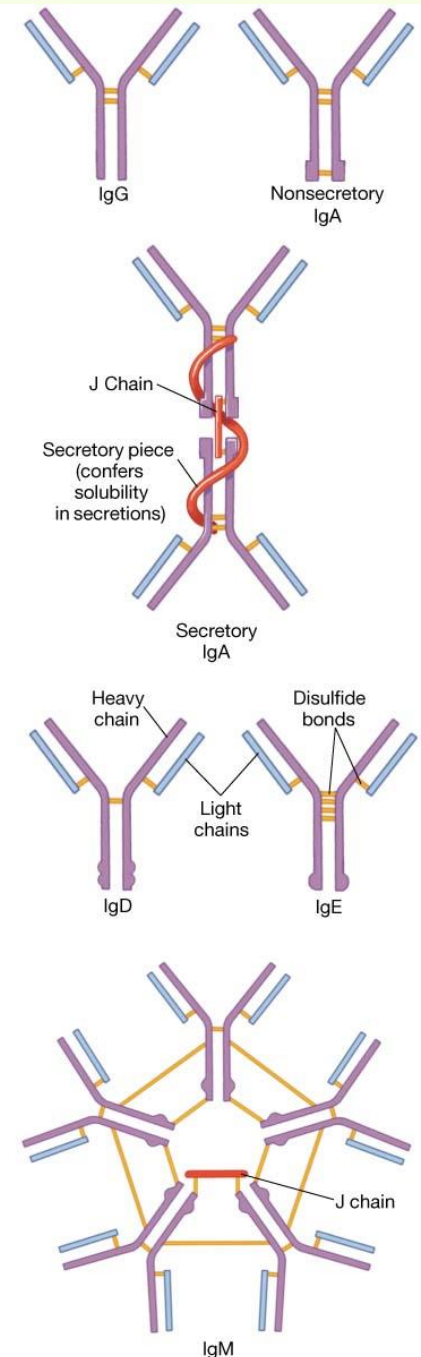


Anticuerpos

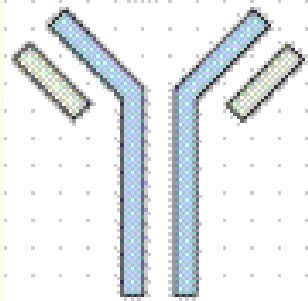
- Son gamma globulinas (químicamente glicoproteínas pertenecientes a la familia de las **Inmunoglobulinas**)
- Existen 5 clases: **IgG** (1,2,3,4) monómero; **IgA** (1,2) dímero; **IgM** (1,2) pentámero; **IgD**; **IgE**.
- Cada Ig está compuesta de 2 cadenas: H y L.

H: γ para la IgG, μ para la IgM, α para la IgA, δ para la IgD; ϵ para la IgE.

L: λ o κ

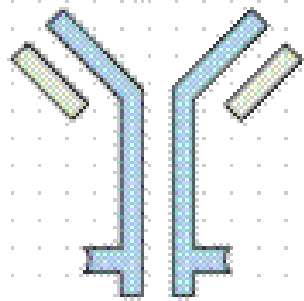


IgG



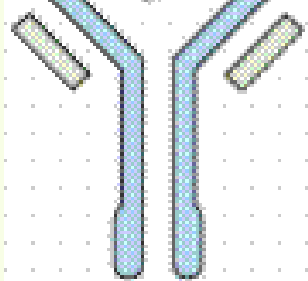
γ Heavy chains

IgA



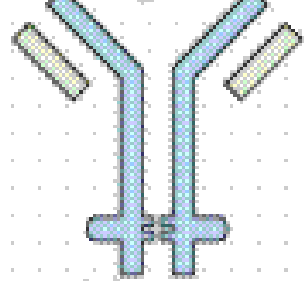
α Heavy chains

IgE

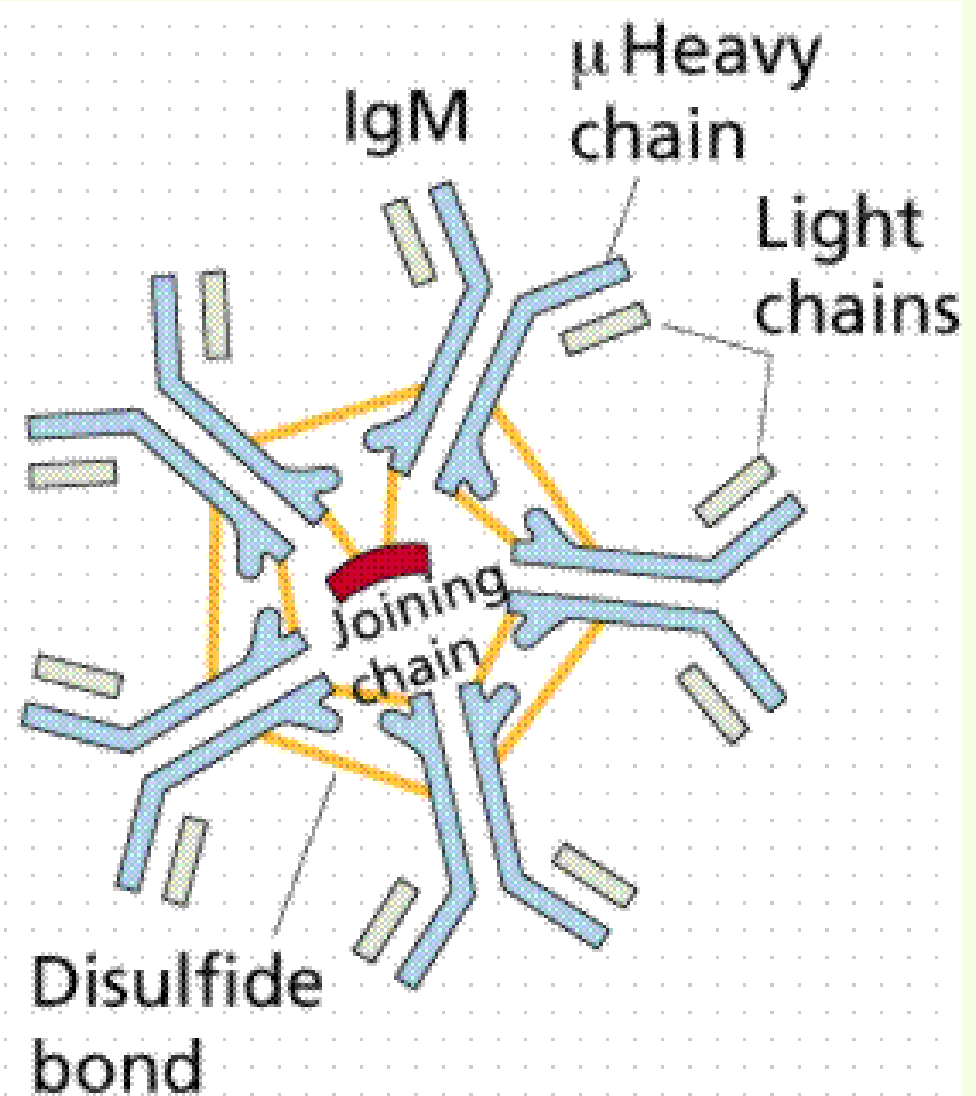


ϵ Heavy chains

IgD



δ Heavy chains



Para las IHQ vamos a describir la IgG1

- Fórmula general: $\delta 2\kappa 2$ o $\delta 2\lambda 2$
- La digestión con papaína la divide en dos segmentos:
 - ✓ **Fab** o fracción Ac que se une al Ag
 - ✓ **Fc** o fracción cristalizable (fija el complemento o se une a la membrana de ciertas células)
- En cada cadena de Ig hay áreas globulares llamadas dominios que pueden ser variables (**V**) o constantes (**C**)
- Los fragmentos **Fab** poseen dos regiones **V**. Aquí es donde se encuentra el sitio de combinación con el Ag llamado **Paratope**.
- Existen varias regiones hipervariables se ubican en los dominios **VL** y **VH**.

- **VARIACION ISOTIPICA:** los genes para las variantes isotípicas están todos presentes en el genoma humano normal. Ej: para las cadenas pesadas y livianas.
- **VARIACION ALOTIPICA:** dentro de una misma especie existen variaciones genéticas (alelos diferentes en determinados loci). Ej: variación de algunos AA en las cadenas pesadas que no se encuentran en todas las personas. En general los alotipos aparecen como variantes de las regiones constantes de las cadenas pesadas.
- **VARIACION IDIOTIPICA:** es la variación dentro de los dominios variables (regiones hipervariables).

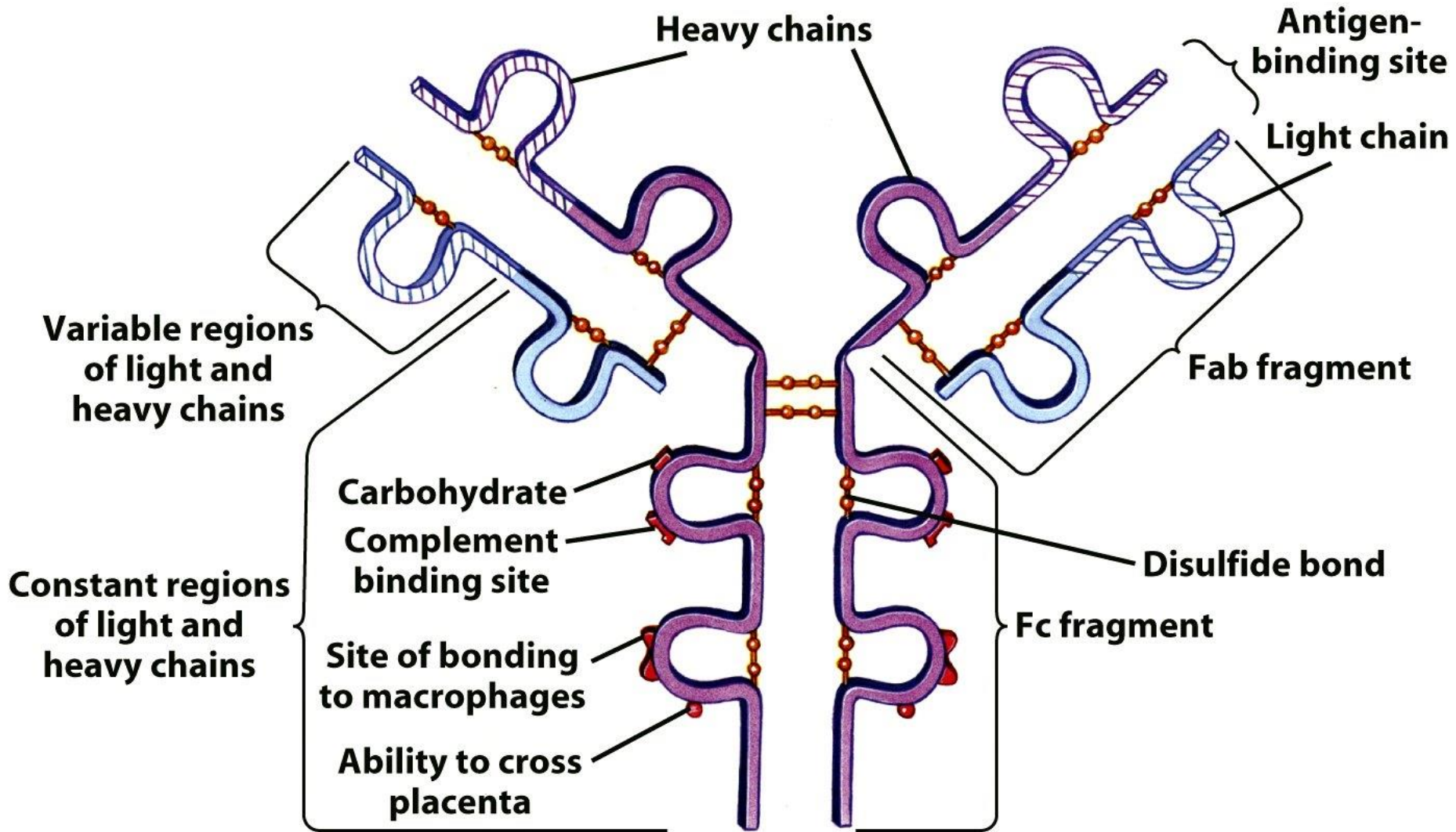


Figure 17-7a Microbiology, 6/e
 © 2005 John Wiley & Sons

La **afinidad intrínseca** de un anticuerpo reside en la región hiperactiva y es determinada por la misma secuencia de AA que determina la especificidad.

La **afinidad funcional**, es decir, la avidéz que tiene un Ac por un Ag, depende de cómo se encuentre ese Ag en el tejido y del propio Ac (tipo de molécula que tenga unida).

Interacción antígeno-anticuerpo

- Se estabiliza mediante enlaces débiles, como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waal e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.

- la suma de todos estos enlaces genera una interacción estable entre el lugar de unión del anticuerpo (**paratope**) y el lugar de unión del antígeno (**epítope**).

Interacción antígeno-anticuerpo

- Estas fuerzas son inversamente proporcionales a una potencia de la distancia entre los grupos interactuantes, lo que implica que epítope y paratope deben presentar estructuras complementarias para obtener una energía de unión suficiente como para resistir la disrupción termodinámica.
- la suma de estas fuerzas de atracción y de repulsión se conoce como **afinidad del anticuerpo**.

La interacción Ag-Ac se verifica en tres niveles:

1. La **reacción primaria** que consiste en el evento básico durante el cual se unen las moléculas del Ag con las del Ac en un proceso no visible. **Se unen el epítopo del Ag con el paratopo del Ac.**
2. La **reacción secundaria** que es un fenómeno visible como la **aglutinación** o la **precipitación *in vitro***.
3. La **reacción terciaria** es un conjunto de fenómenos biológicos (*in vivo*) y que son consecuencia de las reacciones primarias y secundarias.

Las reacciones IHQ son primarias, se hacen visibles marcando el anticuerpo secundario.

- Elementos particulados: oro coloidal, ferritina, proteína A-oro (ME)
- Fluorocromos: rodamina, fluoresceína, FICT
- Enzimas: peroxidasa, glucosa-oxidasa, fosfatasa
- Otros: Proteína A, avidina-biotina, faloidina, etc.

SENSIBILIDAD:

- Si consideramos el Ag: la cantidad mínima de Ag que se pueda localizar.
- Si consideramos la técnica: la cantidad de diagnósticos positivos que se puedan hacer con distintos métodos en un número fijo de casos. Ej: de un total de 50 casos, la técnica A permite el diagnóstico de 40 casos positivos y la B solo 20.
- Si consideramos la dilución de los antisueros marcadores: cuanto mayor sea la dilución del antisuero, mayor será la sensibilidad.

ESPECIFICIDAD:

- Que los Acs sean capaces de unirse solo a una sustancia.
- Que existan distintos Ags que posean determinantes Ags comunes.

Anticuerpos policlonales:

Son aquellos que proceden de distintos clones de linfocitos B estimulados.

Anticuerpos monoclonales:

Son aquellos que derivan de un solo clon de linfocitos B y son específicos para un epítopo determinado, constituyendo una población homogénea.

ANTICUERPOS MONOCLONALES VS POLICLONALES

	Anticuerpos policlonales (suero)	Anticuerpos monoclonales
Epitopes que reconocen	Varios	Unico
Especificidad	Alta especificidad. Varía entre animales y entre sangrías	No varía. Alta especificidad
Afinidad	Variable entre sangrías	Fija
Rendimiento	Concentración media 1 mg/ml. Volumen variable (según especie)	Bajo en cultivo de tejidos. Alto (hasta 20 mg/ml) en líquido ascítico
Costo relativo	Bajo	Alto

ANTICUERPOS POLICLONALES

- Cuando se inmuniza un animal con un antígeno y se provoca una respuesta inmune y aumenta notablemente en el suero del animal la cantidad de Ig específicas del antígeno empleado.
- Esto es la consecuencia de la selección clonal de los linfocitos B que producen anticuerpos contra el antígeno.
- Un antígeno puede presentar diferentes epítopes, y cada uno de ellos ser reconocido por un clon de linfocitos B que producirá moléculas Igs con una secuencia característica.
- Por ello en el suero de un animal inmunizado se acumulan un número desconocido, posiblemente elevado, de diferentes moléculas de Igs específicas en mayor o menor medida de nuestro antígeno. Se trata de un suero producido por la acción de síntesis de numerosos clones de linfocitos B y por ello se ha denominado **policlonal**.

- El animal más frecuentemente usado es el conejo, seguido por la cabra, cerdo, oveja, caballo, cobayo, etc.
- Es importante la forma de administración del Ag: vía, dosis, adyuvantes, número de inmunizaciones, etc., es decir el **plan de inmunización**. Siempre se saca suero pre-inmune. La primer sangría se hace a los 30 días. Luego el suero se prueba por ELISA o Aucherloni.
- Es importante el tamaño del Ag, menor a 10.000 daltons son poco inmunogénicos. Si es muy pequeño hay que pegarle otra molécula: albúmina, tiroglobulina, etc.
- A mayor complejidad química del Ag, mayor Inmunogenicidad.

• Soluciones de Anticuerpos:

✓ **Suero completo**

✓ **Solo Igs**

✓ **Ac purificados de afinidad**

• **Uso de Ac policlonales:**

➤ **ventajas:** mayor capacidad de detección. Mayor sensibilidad de la reacción. Se pierden menos con los lavados de la IHQ.

➤ **desventajas:** son menos específicos.

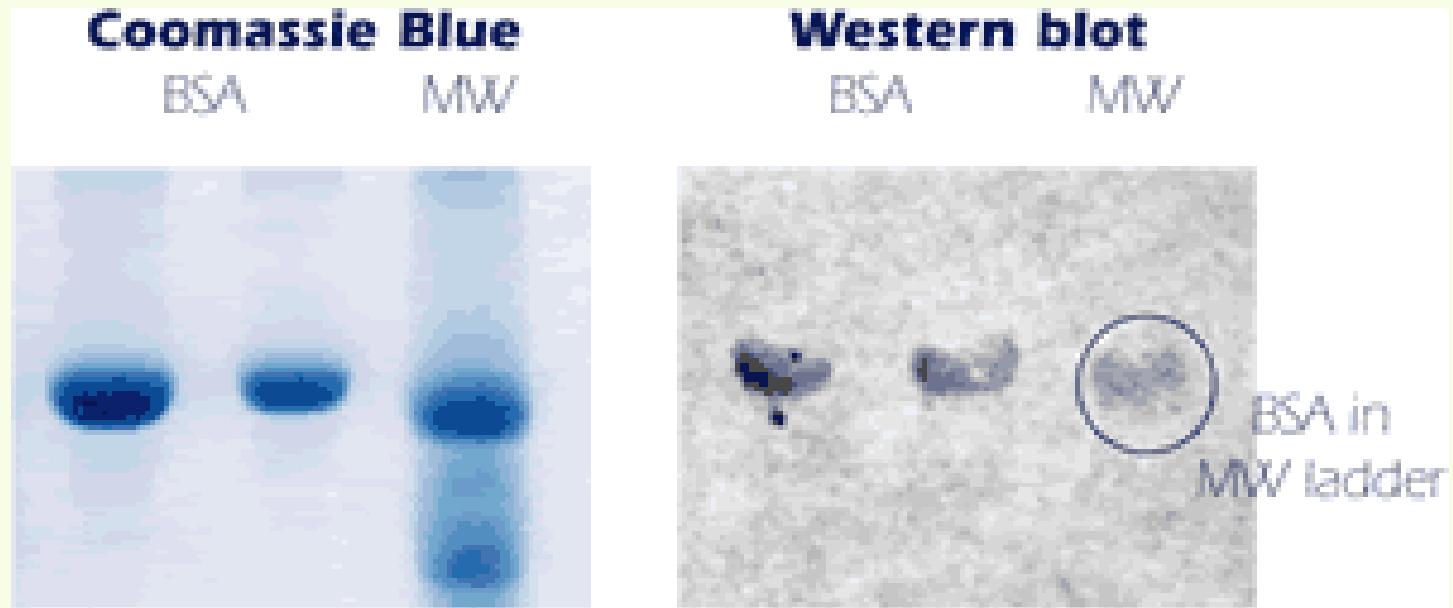


Anticuerpos policlonales



SDS-PAGE

WENSTERN BLOT



Especificidad del Ac: SDS-PAGE Y WENSTER-BLOT

Anticuerpos monoclonales

Son anticuerpos producidos en el laboratorio por cultivo de un clon celular que produce un anticuerpo específico.

- **Reaccionan con un epítope específico del antígeno contra el cual ha sido originado.**

✓ **Ventajas:**

- **alta especificidad**

- **Menos reacciones cruzadas.**

✓ **Desventajas:**

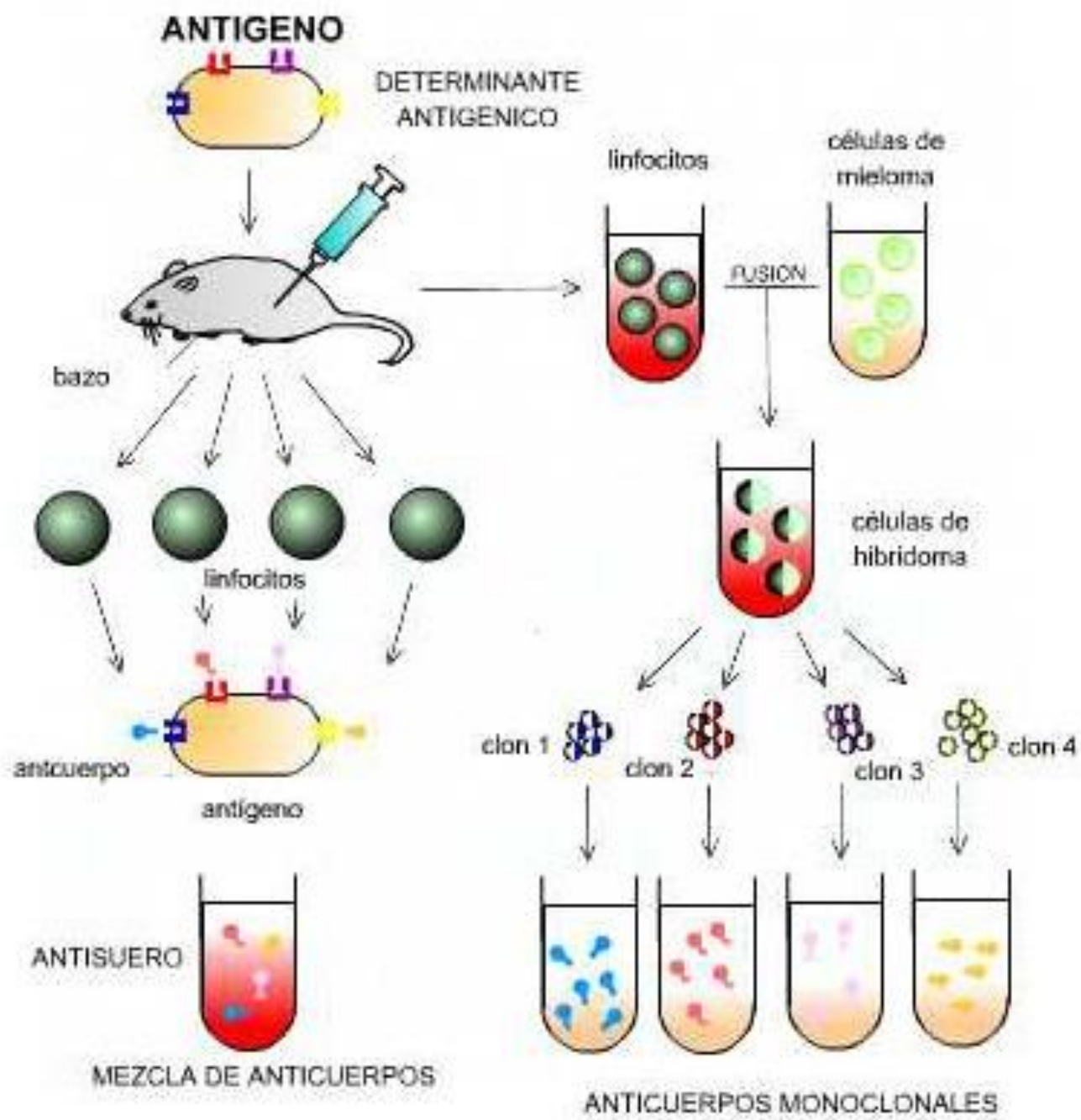
- **su monoespecificidad hace que reaccione con un solo sitio de la molécula del Ag y por ende muy pocas moléculas del Ac se unen (tinción más débil).**

- **la fijación puede hacer que el epítope del Ag se altere y la reacción se negativiza. Hacer cortes por congelación.**

- **son más sensibles al pH y a los iones del buffer diluyente.**

Obtención de Anticuerpos Monoclonales

- 1. Inmunización de animales contra el antígeno para el que se desea producir anticuerpos.**
- 2. Fusión de los linfocitos esplénicos con células de mieloma formando hibridomas**
- 3. Selección de aquellos hibridomas que sean productores de las inmunoglobulinas específicas deseadas**
- 4. Clonación**



Inmunohistoquímica básica

- **Velocidad de reacción:** depende de la dilución óptima del anticuerpo, así como del tiempo de incubación y la temperatura.
- **Título de los anticuerpos:** en IHQ el título de Ac puede definirse como la dilución más alta del antisuero (o Ac monoclonal) que resulta en una coloración específica con la menor coloración de fondo. Un título alto de Ac policlonales permite una dilución alta y por ende se diluyen los Ac no deseados.
- **Tiempo de incubación:** hay una relación inversa entre el tiempo de incubación y el título del Ac. A mayor título del Ac, menor es el tiempo de incubación.
- **Temperatura de incubación:** la reacción Ag-Ac se alcanza más rápidamente a 37°C que a TA. El aumento de la T° de incubación permite una mayor dilución del Ac o una disminución del tiempo de incubación.

Inmunofluorescencia

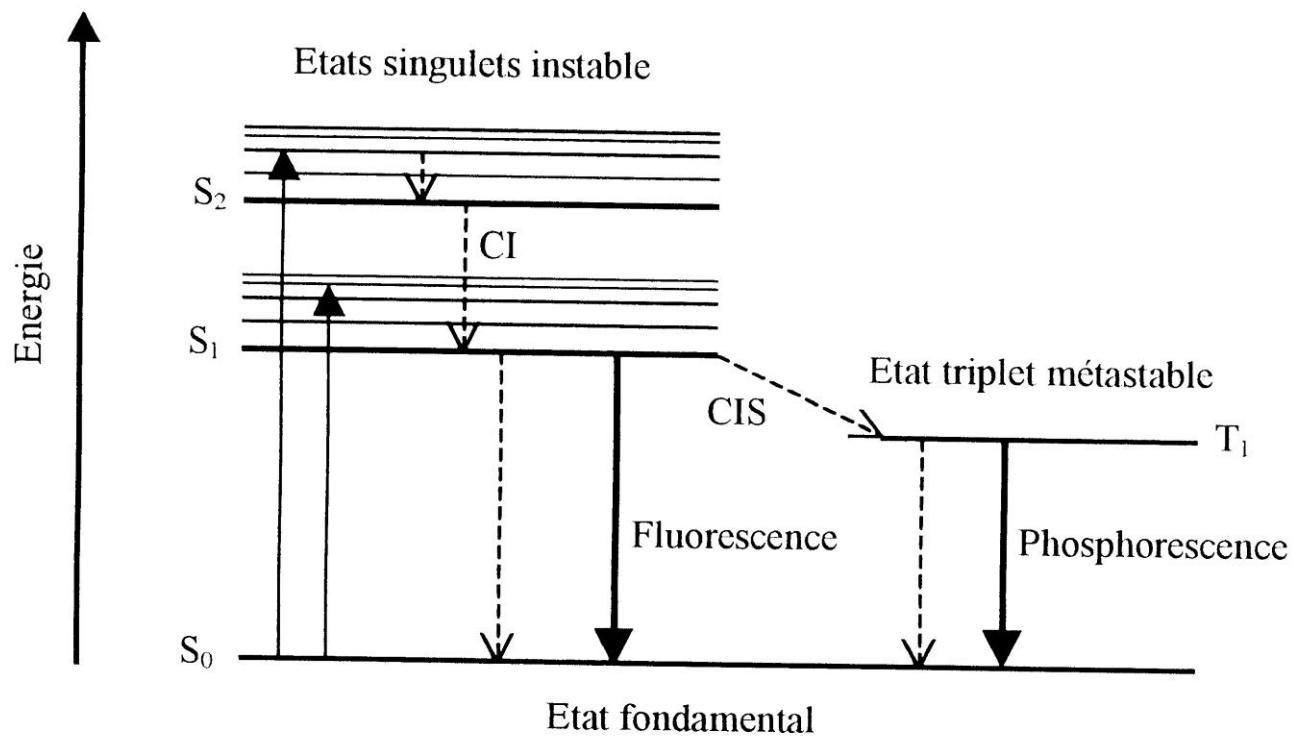
Se usan Ac conjugados con compuestos fluorescentes llamados **fluorocromos**. Se unen al Ac 2rio. en forma covalente.

Se usa un **MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA** que es similar al microscopio convencional, a excepción de que la luz incidente que procede de una potente fuente (UV) capaz de excitar al **fluorocromo**.

- Se pueden observar objetos mas allá del límite de resolución del microscopio óptico.
- Se pueden ver sustancias específicas (ADN, Ac, etc).
- La fluorescencia cesa al cesar el estímulo.
- La sustancia a observar absorbe radiación a una cierta longitud de onda y emite luz con una longitud de onda mayor que la recibida

Los **fluorocromos** son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando captan (son excitados) por un fotón incidente de una longitud de onda característica. Por ejemplo, el isotiocianato de fluoresceína tiene un máximo de absorción a 490 nm y un máximo de emisión a 520 nm.

El **fluoróforo** es el fluorocromo unido covalente mente a un proteína, por ejemplo un anticuerpo.



———→ Transition Radiative

- - - - -> Transition non Radiative

Uno de los problemas de la utilización de **fluorocromos** en microscopia de fluorescencia es la pérdida de ésta debido a las grandes intensidades de luz empleadas. Las muestras empleadas en esta técnica no pueden observadas durante largos periodos de tiempo debido a la **desaparición de la fluorescencia ('fluorescence fading')**. Una muestra que ha perdido parte de la fluorescencia presenta regiones 'oscuras' (como en el ejemplo).

Se han desarrollado métodos que permiten reducir este efecto, entre ellos destacan :

- - el uso de reactivos protectores de la fluorescencia ('antifading reagents')**
- - el uso de fluorocromos con poco 'fading'**
- - el empleo de luz de excitación de menor intensidad**
- - la reducción de la concentración de oxígeno en el espécimen**
- - el direccionamiento del 100% de la luz hacia el dispositivo de registro (cámara, película, ect,) para reducir al máximo el tiempo de exposición.**
- - el empleo de mecanismos de medición de la exposición óptima (automática) para reducir la iluminación al máximo.**

Los reactivos **'antifading'** son moléculas que aportan al fluorocromo aquellos electrones que ha perdido por la emisión fluorescente. Se trata de **moléculas donadoras de electrones que deben encontrarse para ser efectivas en estrecha vecindad a las moléculas de fluorocromo.** Además son específicas de fluorocromo pues los electrones que pueden donar sólo serán donados si se encuentran en niveles de energía ligeramente superiores a los propios del fluorocromo en reposo.

Los reactivos antifading más empleados son los siguientes :

- **p-phenylenediamine**. Es el reactivo más efectivo para la conservación de la fluorescencia (FITC). También efectivo para la rodamina. Se emplea al 0.1% en glicerol/PBS. El reactivo se tiñe de blanco cuando se expone a la luz. Se ha de conservar en la oscuridad. El contacto con la piel es extremadamente peligroso.
- **DABCO (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane)**. Muy efectivo para la fluoresceína, aunque menor que la p-phenylenediamine. Es menos sensible a la luz y es mucho menos tóxico.
- **n-propyl galeate**. Es el agente más efectivo para la rodamina, aunque también es efectivo para la fluoresceína. Se emplea al 0.1% en glicerol/PBS.
- **2-mercaptoethylamine**. Se emplea para la observación de cromosomas y muestras de DNA teñidas con yoduro de propidio (PI), naranja de acridina (AO) o cromomycin A3. Se emplea al 0.1 mM en Tris-E

Las técnicas de inmunofluorescencia se dividen en inmunofluorescencia directa e indirecta

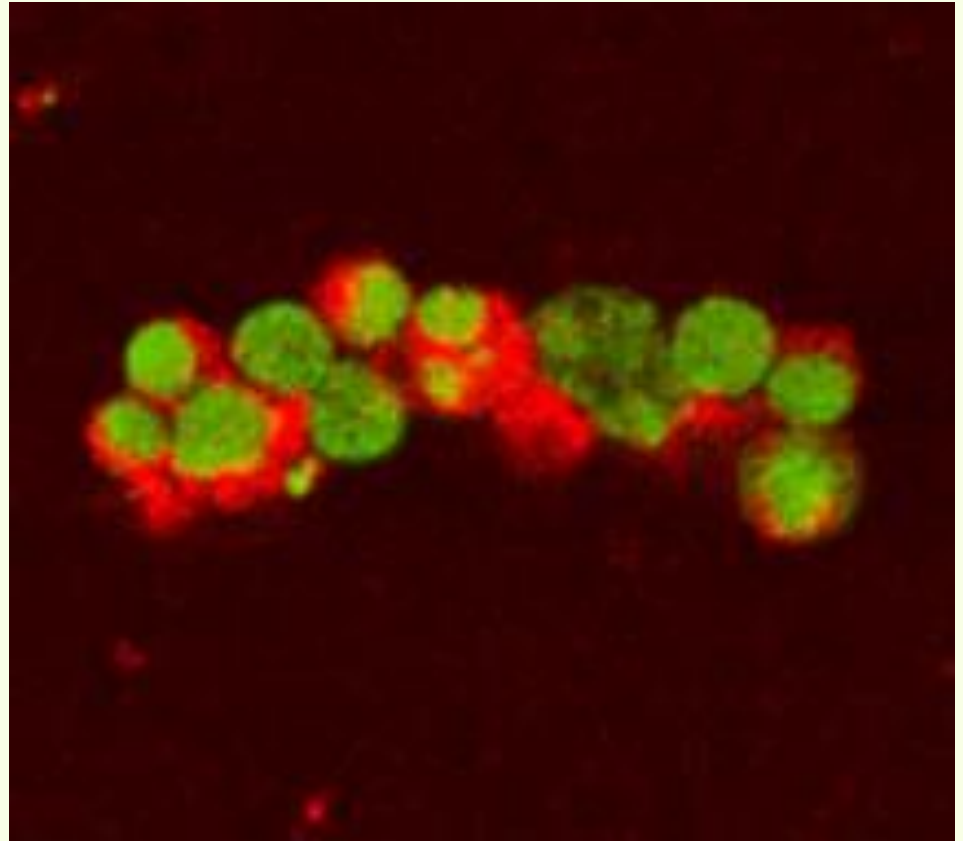
Inmunofluorescencia directa. Son las que emplean anticuerpos a los que se ha conjugado directamente un fluorocromo.

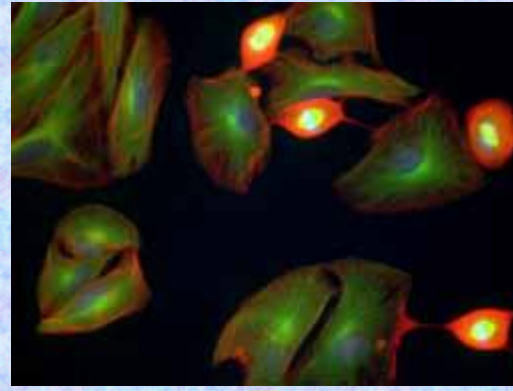
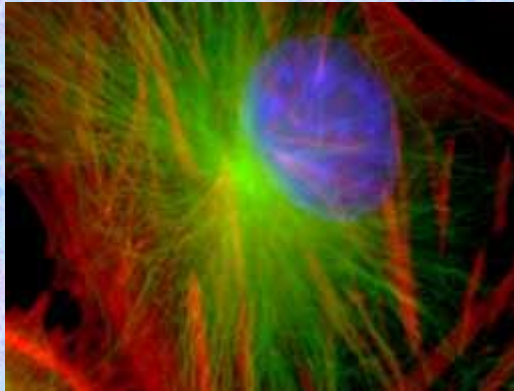
Inmunofluorescencia indirecta. En estas técnicas el anticuerpo que reconoce el antígeno no está marcado sino que se utiliza un segundo anticuerpo conjugado con el fluorocromo y dirigido contra la especie del primero. Una variante de estas técnicas es la que utiliza el primer anticuerpo conjugado con biotina y posteriormente se añade avidina o estreptavidina conjugada con el fluorocromo.

ALTERNATIVAS

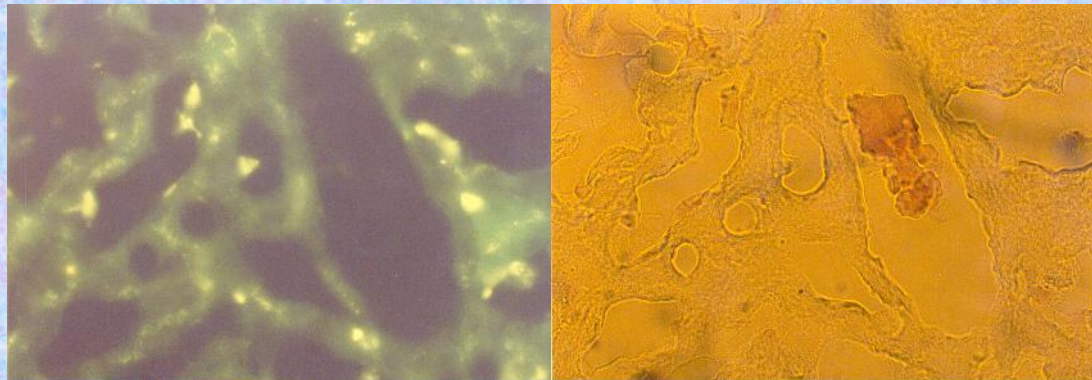
- **de complemento:** el sistema del complemento se une al Ac primario. El Ac secundario es contra una fracción del complemento. Modificación de la técnica indirecta.
- **de doble marcación:** determinación de 2 Ags distintos simultáneamente o secuencialmente.

**IL-1 β in Activated
Mouse T cells.
Indirect
Immunofluorescence staining of IL-
1 β producing
activated mouse
T cells.**





**Células epiteliales , triple coloración: núcleo (azul),
microtubulos (verdes), actina (rojo). 200X (izq.) y 1000X (der.).**



AUTOFLUORESCENCIA