

INTRODUCCIÓN A LA

2020

INTRODUCCIÓN A LA INMUNOHISTOQUÍMICA



(*)

La Inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica diagnóstica, que se emplea desde la década del '30, pero fue reportada por Albert Coons y colaboradores, en 1941 con el empleo de anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para la identificación de antígenos neumocócicos en tejidos infectados, entonces pudo visualizar el sitio donde se localizaba la reacción inmune e identificar así el antígeno del neumococo.

Posteriormente, Nakane (1966) y Avrameas (1969) son los responsables de "the brown evolution", al desarrollar los métodos inmunoenzimáticos (peroxidasa, avidina-biotina) que permiten amplificar la señal del cromógeno en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Actualmente, también se utilizan polímeros sintéticos para amplificar la señal (Envision, PowerVision).

La IHQ es una técnica esencial en el diagnóstico, decisión terapéutica y en el estudio de la patogénesis de enfermedades. diagnóstico

de enfermedades infecciosas y determinación del agente infeccioso. Es útil para la demostración de agentes infecciosos como Citomegalovirus, virus de Hepatitis B, Hepatitis C, etc.

Además, le aportó una nueva dimensión a la histología como instrumento para la demostración específicamente, de un amplio rango de componentes celulares y tisulares. Es una herramienta poderosa para la tipificación tumoral y detección de marcadores tumorales. Permite predecir el pronóstico mediante la identificación de enzimas, de antígenos específicos, oncogenes, genes supresores y de marcadores de proliferación de células tumorales. Esta técnica se emplea para detectar filamentos intermedios expresados en células tumorales (queratina, desmina, vimentina, neurofilamentos, proteínas gliales fibrilares, etc). Los filamentos intermedios miden 10nm y se clasifican en 5 tipos con una distribu-

ción específica en cada población celular, por ese motivo, su determinación permite la clasificación, diagnóstico, desarrollo de fármacos y para la investigación biológica del cáncer.

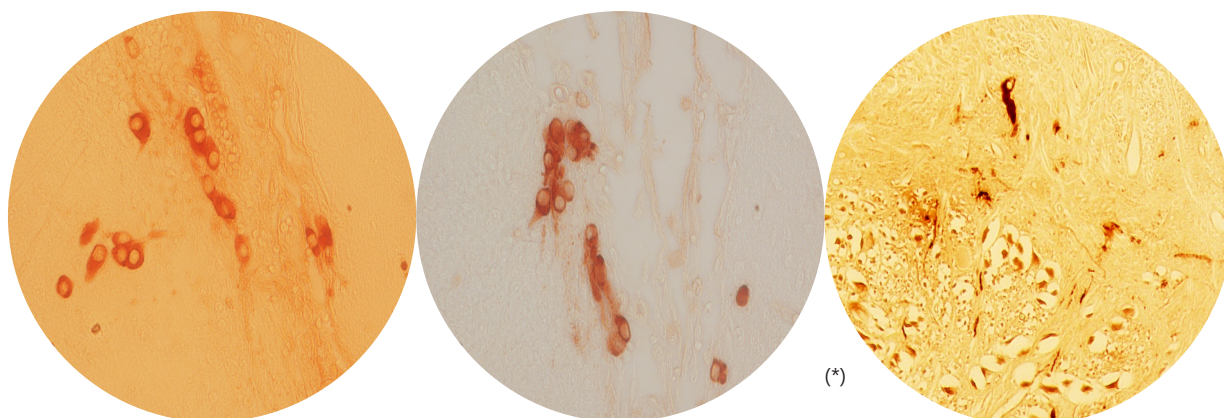
Usando marcadores específicos para diagnosticar si es benigno o maligno, determinar el estadio, el grado e identificar el tipo celular y en caso de metástasis demostrar el tumor primario.

También se emplea en el desarrollo de fármacos, para evaluar la eficacia de los mismos o predecir la respuesta terapéutica en tumores como el carcinoma de mama y el de próstata, por ejemplo. El crecimiento de ambos tipos de tumores puede verse afectados por la acción de las hormonas estrogénicas. La presencia en las células tumorales de receptores específicos expresados en altos niveles responderá mejor al tratamiento con disminución de los niveles hormonales endógenos.

Además, es una metodología empleada para determinar la función de determinados genes durante procesos biológicos como proliferación y apoptosis, con α -PCNA o anticuerpos anti- p53, según corresponda. Al mismo tiempo, se utiliza para determinar trastornos neurodegenerativos, detección de APP (Amyloid Precursor Protein, proteína precursora del β amiloide, en pacientes con enfermedad de Alzheimer). Los neurofilamentos y los filamentos de GFAP, que son marcadores específicos de neuronas y astrocitos, respectivamente y la enolasa específica neuronal (NSE) es una enzima pre-

sente en neuronas, paraneuronas y en tumores derivados de esos elementos. El Neu N es otro marcador neuronal muy utilizado. La proteína S-100 es detectable en células gliales, células de Schwann y también en elementos extraneurales, como condrocitos, lipocitos, melanocitos, células de Langerhans de la piel, células tubulares renales, células interdigitadas de los ganglios linfáticos, etc. La proteína S-100 es un excelente marcador para melanomas. Estas son algunas de las muchas aplicaciones, la IHQ junto a la lectinohistoquímica (para reconocer carbohidratos) y a la ISH (Hibridación in situ) son un instrumento muy importante en laboratorios de diagnóstico e investigación, al permitir el reconocimiento de sustancias químicas específicas en los tejidos incluidos en parafina o en cortes obtenidos en criostato. La IHQ se basa en la reacción antígeno-anticuerpo y su reconocimiento "in situ", haciendo visible dicha interacción cuando el anticuerpo sea marcado con una molécula fluorescente o mediante una reacción enzimática o con radioactivo o partículas de oro coloidal. Es una técnica que con variaciones mínimas puede ser realizada en tejidos animales y vegetales.

Entonces, en primer término, nos referiremos a los antígenos y luego, sobre las características de los anticuerpos. Analizaremos las fases (pre analítica, analítica y post analítica) de la IHQ, ventajas y desventajas, errores y sus posibles resoluciones.



ANTÍGENOS (Ag)

Son aquellas moléculas que poseen capacidad antigénica, reconocidas como extrañas para el organismo (pueden ser ajenas o propias) y desencadenan una respuesta inmune.

La respuesta inmune está dirigida contra diversas secuencias aminoácídicas del organismo invasor o de moléculas expresadas en la superficie de células propias como, por ejemplo, las células tumorales o infectadas por virus.

La antigenicidad dependerá si es una macromolécula, de las cargas, de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas. Las macromoléculas son inmunogénicas principalmente las proteínas y polisacáridos ricos en aminoácidos aromáticos como tirosina o fenilalanina.

Aquella secuencia específica del Ag reconocida por el sitio de combinación del anticuerpo o por un receptor de linfocito, se denomina **EPITOPE o DETERMINANTE ANTIGÉNICO**.

ANTICUERPOS (Ac)

Los anticuerpos son glicoproteínas plasmáticas llamadas inmunoglobulinas (Ig), producidas por células plasmáticas al ser activados y diferenciados desde Linfocitos B. Se clasifican en cinco clases principales: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

Cada molécula posee una estructura básica compuesta por dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (H) (que son diferentes estructuralmente para cada clase de Ig, y le confieren propiedades antigénicas, por lo que determinan la clase y subclase de la molécula) y dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (L) son de tipo *kappa* o *lambda*. La distribución de las cadenas *kappa* y *lambda* difieren en todas las clases de Ig y subclases, así como entre diferentes especies, en el humano el 65% de las Igs son de cadenas livianas "*kappa*" y el 35% "*lambda*".

Los epítopes pueden ser lineales (es una secuencia de aminoácidos contiguos en la secuencia primaria) o conformacionales (el epítipo es un sitio formado por residuos distantes en la secuencia primaria, pero cercanos en la estructura terciaria de la proteína nativa). En los Ag proteicos puede haber cambios postranscripcionales como el splicing alternativo o postraduccionales como la glicosilación que producen variaciones en los epítopes.

Asimismo, hay pequeñas moléculas que pueden funcionar como antígenos si están acoplados a proteínas transportadoras como la albúmina de suero bovino u otras matrices sintéticas llamados haptenos.

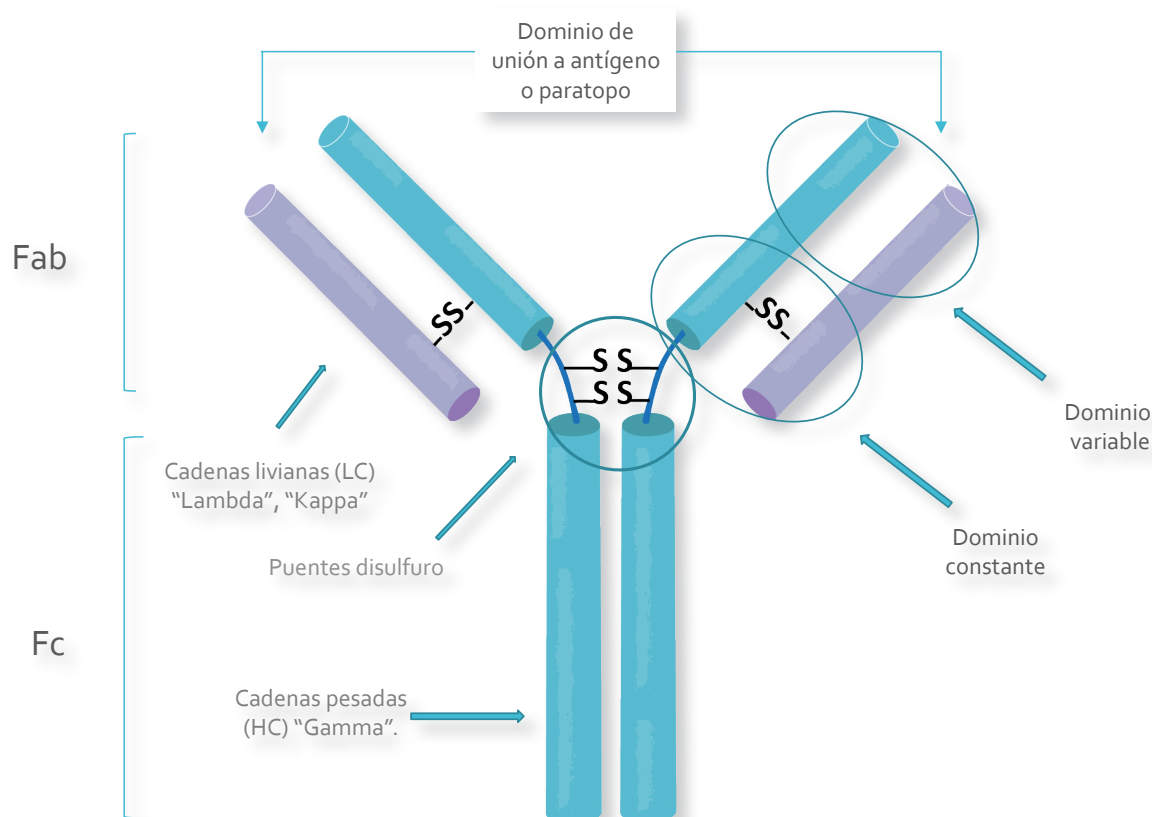
Los antígenos que desaten una fuerte respuesta inmune se dice que son altamente inmunogénicos y será mayor cuanto más alejado filogenéticamente sea el Ag con respecto al organismo que reacciona. La vía de entrada y la dosis también son factores que influyen en la antigenicidad.

La unión entre las cadenas L a H y H a H son uniones covalentes, puentes disulfuro. Los puentes intercatenarios se establecen entre cisteínas.

Las inmunoglobulinas empleadas como anticuerpos en la IHQ son mayoritariamente IgG (IgG1) e IgM, por lo que veremos en detalle estas inmunoglobulinas

IgG

Es la inmunoglobulina de mayor circulación, (representa el 70% de los anticuerpos en circulación) participa en la respuesta inmune secundaria, y atraviesan placenta. Es una molécula de 150kD de peso molecular, compuesta de dos cadenas pesadas *gamma* y dos cadenas ligeras de tipo *kappa* o tipo *lambda*, unidas por puentes disulfuro.



La molécula de IgG, por digestiones enzimáticas se puede dividir en dos fragmentos de unión a antígeno (Fab) y un fragmento cristalino (Fc).

El Fc, es idéntico a todas las IgGs, conformado por dos cadenas pesadas, es la región que interactúa con el receptor Fc de membrana de Linfocitos T y B. Presentan el sitio de glicosilación (algunos glicanos tienen residuos de ácido siálico) importante para la interacción con el receptor.

En Fab, se encuentran los llamados dominios variables (V) y dominios constantes (C).

Cada dominio contiene 110 a 120 aminoácidos y un enlace disulfuro intracadena. En el dominio de la cadena ligera (VL) y en el dominio variable de la cadena pesada (VH) se encuentran los grupos (amino) N-terminales de la molécula de inmunoglobulina, dentro de estos dominios se encuentran regiones hiperaactivas (HV- En esta región, especificidades estructurales únicas llamadas determinantes idiotípicos, cada clon de anticuerpo expresa

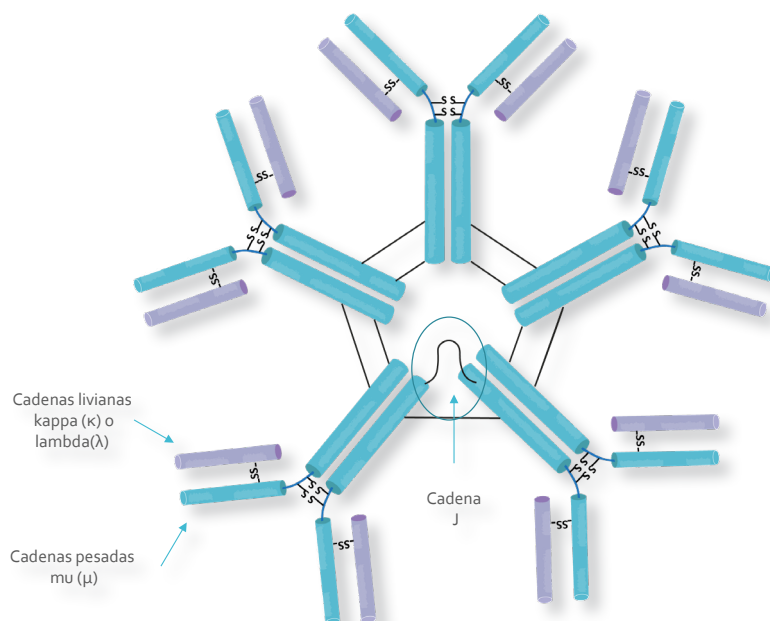
su propio idiotipo). VL y VH juntos forman el sitio de combinación de antígeno. En esta región, llamada paratopo, reside la especificidad de la Ig.

Cada cadena L además del dominio VL, tiene un dominio constante (CL). La cadena H también tiene tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3) y lleva el carboxilo terminal de la inmunoglobulina. Diferencias menores dentro de estas regiones articuladas contribuyen a la especificidad de la subclase de inmunoglobulina G. Los mismos son designados por subíndices como en IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ e IgG₄. Los ratones tienen aproximadamente 95% de cadenas *kappa* y, por lo tanto, la mayoría de los anticuerpos monoclonales IgG de esta especie tienen cadenas *kappa*. Los números de puentes disulfuro que unen las cadenas pesadas también varía entre las subclases de IgG. IgG₁ e IgG₄ cada uno tienen dos, mientras que IgG₂ e IgG₃ tienen cuatro y cinco, respectivamente.

IgM

Esta inmunoglobulina representa el 10% de los anticuerpos circulante y es el responsable de la respuesta inmune primaria. Es un pentámero (MW aproximadamente 900 kD) que consta de cinco subunidades de aproximadamente 180 kD cada una. La fórmula general se puede expresar como $(\mu_2 \text{ kappa}_2)_5$ o $(\mu_2 \text{ lambda}_2)_5$. Cada subunidad está vinculada por un péptido rico en sulfhidrilo, la cadena J (15 kD). Las cadenas J contribuyen a la integridad y la estabilidad del pentámero. Al igual que con IgG, las subunidades de IgM pueden fragmentarse por escisión enzimática y reductora en $F(ab')_2$, Porciones Fab y Fc, así como cadenas pesadas y ligeras, respectivamente.

Se han informado subclases de IgM_1 e IgM_2 .



Mientras que la IgG es el anticuerpo más abundante en los huéspedes hiperinmunizados, en el animal recién inmunizado, IgM es el primer anticuerpo humoral detectable.

Los anticuerpos aparecen tras inyectar al huésped con el inmunógeno. El período desde la inyección hasta la aparición de IgM humorales se denomina período de latencia, el cual puede durar una semana y tienen una vida media entre 4 a 6 días. Transcurrido dos semanas o en respuesta a una segunda in-

yección del inmunógeno, los anticuerpos que predominan son las IgG cuya vida media es de casi un mes.

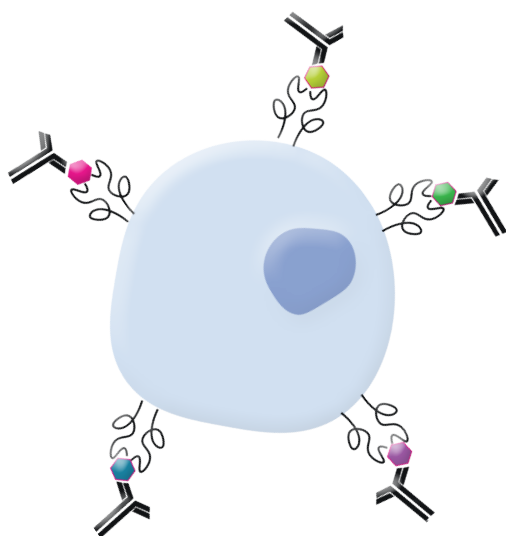
Con respecto a la producción de anticuerpos, es un proceso complejo y que podrán encontrar información en textos de inmunología. Sólo a modo ilustrativo haremos referencia a las características relevantes y diferencias entre los anticuerpos policlonales y monoclonales.

ANTICUERPOS POLICLONALES

Estos anticuerpos son producidos por diferentes clones de células, reaccionan con varios epítopes del antígeno. Son los más usados y son obtenidos en varias especies (conejo, cabra, cerdo, oveja, caballo y otros), principalmente los obtenidos en conejo. El proceso implica inyectar el inmunógeno con adyuvantes en sucesivas etapas a los animales e ir tomando muestras de sangre, transcurrido un determinado tiempo se procede a extraer la sangre y del plasma por cromatografía se separan los anticuerpos del resto de proteínas séricas.

A los fines de la IHQ, la señal obtenida con este tipo de anticuerpos es fuerte. Son más estables y presentan más tolerancia a cambios menores del antígeno (p. ej. polimorfismo, heterogeneidad de glicosilación, o ligera desnaturalización).

Su gran limitación es que pueden ocurrir reacciones cruzadas y a generar una señal inespecífica. También, una desventaja es el alto grado de variabilidad en los lotes, porque la producción de los anticuerpos policlonaes depende de la respuesta inmune de cada animal, por lo que es muy difícil obtener sueros idénticos.

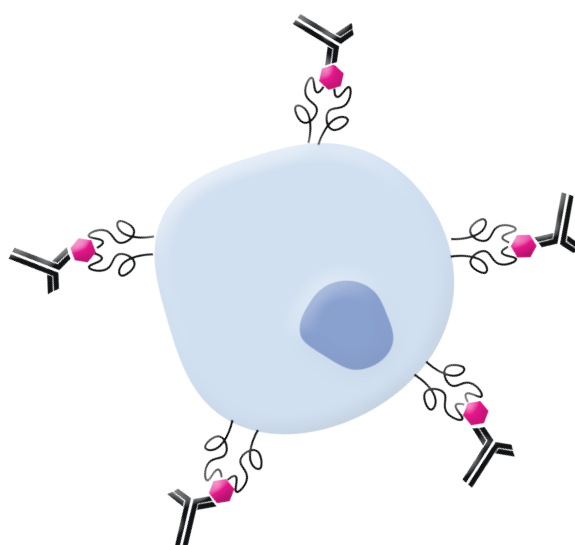


ANTICUERPOS MONOCLONALES

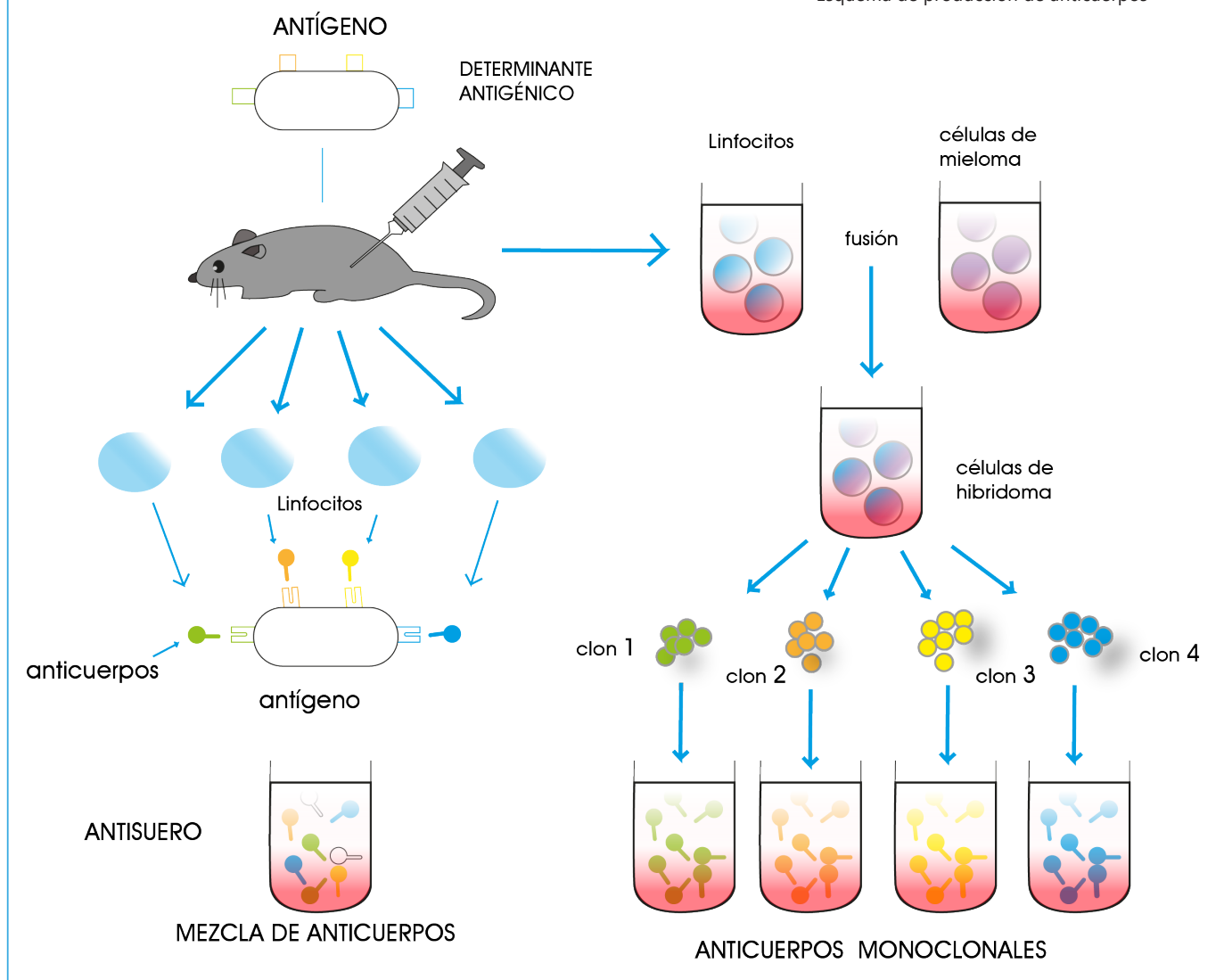
Son anticuerpos producidos por un mismo clon de células plasmáticas, todos reaccionan específicamente ante un epítope del antígeno para el que son afín. La técnica de obtención de este tipo de anticuerpo fue desarrollada por los investigadores César Milstein y Georges Köhler, en 1975. Resumidamente, consiste en hibridar células (linfocitos B) de bazo o de ganglio linfático (principalmente de ratón, aunque también hay algunos de conejo) con células del tumorales del mieloma. Esta nueva célula o hibridoma resultante tendrá la capacidad de dividirse indefinidamente y de la producción de anticuerpos.

Los clones se aíslan por ELISA y se detectan cuáles son aquellos que son específicos para el antígeno al que se expusieron y una vez determinados se cultivan por separado, lo que podrá hacerse tantas veces se requiera.

Entonces como cada clon proviene de un hibridoma, todas las moléculas del anticuerpo serán idénticas en estructura y se unirán a un solo epítope específico del antígeno en cuestión, lo que le otorga alta especificidad y que no haya variabilidad en las partidas o lotes. Ideales para el reconocimiento de antígenos lineales, son menos sensibles, requieren diluciones más concentradas y son más costosos.



Esquema de producción de anticuerpos



REACCIÓN ANTIGENO ANTICUERPO (Ag-Ag)

En cuanto a la relación Ag-Ac, es muy importante tener en cuenta la afinidad del anticuerpo. Esta afinidad intrínseca, está determinada por la secuencia de aminoácidos de la región hipervariable (HV) del dominio variable, la misma que determina la especificidad. En la unión entre el paratope y el epítopo son interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals los que contribuyen a la afinidad Ag-Ac. Entonces, la afinidad es la fuerza de unión del sitio de combinación con el Ag, y la fuerza total de unión del Ac define la aversez del mismo por un determinado Ag.

En tanto sea mayor la afinidad menor será la concentración de Ag libre que se necesite para llegar al equilibrio o sea saturar los sitios de unión del Ac. ya que el título de un Ac aumenta con el tiempo durante el proceso de inmunización también se incrementa la afinidad.

Las reacciones Ag-Ac son reversibles, se puede disociar a estos complejos inmune que se forman durante la realización de IHQ durante los procesos de lavados, si la afinidad del anticuerpo por nuestro antígeno de interés es muy baja. Por lo tanto, hay que tener en

cuenta los factores que debilitan la reacción como la concentración de NaOH, el pH muy bajo y la temperatura demasiado elevada.

En IHQ, el título del Ac se define como la dilución más alta (de un ac monoclonal, está determinada por la cantidad de Ac presente) con la que obtenga mayor marca posible con el menor background en las mejores condiciones, esto depende de la afinidad del Ac por el Ag tisular.

Los títulos de anticuerpo policlonales son 1:100-1:2000 y para los monoclonales 1:10-1:1000.

Con respecto a la dilución de trabajo de los anticuerpos dependerán de la empresa proveedora, en las fichas técnicas sugieren las diluciones de trabajo y condiciones en las que debe realizarse la dilución o si son listos para usar (Ready to use).

De todos modos es importante que se hagan distintas pruebas a diferentes de diluciones para poder definir cuál es la mejor para nuestra muestra y en las condiciones de trabajo que tenemos.

La reacción Ag-Ac, además del título del anticuerpo es influida por el tiempo y la temperatura de incubación. Con respecto a la relación entre título del anticuerpo y tiempo podemos afirmar que a mayor título menor será el tiempo necesario para alcanzar el resultado óptimo. Cuando se requiera un resultado en un menor tiempo, el

anticuerpo debe ser de alta afinidad y estar en alta concentración, por el contrario, tiempo prolongado permite utilizar anticuerpos más diluidos.

Los tiempos de incubación pueden variar desde 1 hora a overnight (16hs), que debe ajustarse en función también de la temperatura de incubación.

A 37° es menos el tiempo necesario, con anticuerpos más diluidos y a 4-8° requiere más tiempo para llegar a saturar el sistema.

Un dato a tener en cuenta es el almacenamiento de los anticuerpos. Los comerciales, generalmente en su ficha técnica, las empresas dan las indicaciones para su correcto almacenamiento.

Las normas generales indican que no deben exponerse a ciclos de congelamiento/descongelamiento, por lo que es recomendable hacer alícuotas (algunas diluciones más concentradas que las diluciones de trabajo, en algunos casos también se pueden guardar 1:2 en glicerol) algunas de ellas dejar para preparar las diluciones de trabajo y otras como stock en el freezer. También el fabricante puede sugerir la adición de azida sódica o de BSA (albúmina sérica bovina) u otro estabilizante.

En la técnica de IHQ que se consideran tres fases:

PREANLÍTICA, ANALÍTICA Y POST ANALÍTICA.

FASE PREANALÍTICA

En dicha fase encontramos los procesos fundamentales y que muy bien conocemos de toda técnica histológica, que requieren dedicación, prolijidad y responsabilidad a la hora de ejecutarla, pero para la realización de la IHQ debemos prestar mayor atención a algunos detalles importantes.

Estos procesos son:

- Toma de muestra
- Fijación- Decalcificación
- Inclusión - Corte

Toma de muestra: es importante que el tiempo transcurrido desde que se toma la muestra de tejido y se lleva al fijador. Si bien depende del material con el que estemos trabajando, si son tejidos animales o vegetales o si se pueden perfundir o si son biopsias, si son muestras de necropsias o son muestras tomadas a campo.

Cualquiera sea la manera o el origen de obtención de las muestras, debemos saber que en tejidos animales la hipoxia causada por la isquemia reduce el pH, se genera un deterioro de las proteínas y de ácidos nucleicos con la consecuente disminución de inmunoreactividad.

El tiempo transcurrido debe ser el menor posible, desencadenada la autólisis (liberación enzimática con la consecuente degradación) se produce alteración de epitopes y dicho deterioro no será revertido por el proceso de recuperación antigénica.

Fijación: La fijación es una etapa mediante la cual se busca:

- Alterar lo menos posible la estructura química y estabilizarla.
- Prevenir el proceso de autólisis.
- Conservar forma, tamaño, volumen (normal o patológico) de la muestra.
- Prevenir contaminaciones (por hongos y/o bacterias).
- Conservar la muestra en el tiempo.

De hecho, puede ser considerada una serie de complejos eventos químicos. Los métodos que permiten realizarla son: INMERSIÓN y PERFUSIÓN. Temas en los que no profundizaremos pero que recomendamos se consideren previamente a la toma de la muestra, teniendo en cuenta con qué tipo de muestras se trabajarán y cuáles son los resultados esperados.

Factores que influyen en el proceso son:

pH: la acidez o alcalinidad del fijador o solución fijadora deberá mantenerse dentro del rango fisiológico, por lo que debe tamponarse.

Osmolaridad: debe evitarse la retracción por soluciones hipertónicas o "hinchazón" celular por soluciones hipotónicas. El formol es una solución hipertónica y un poco más al ser tamponada, es por ello que se genera retracciones en las muestras fijadas

Tamaño de la muestra: no deberían superar los 0,5cm para facilitar una correcta fijación.

Volumen del fijador: si bien hay controversias al respecto se sugiere que el volumen del fijador supere por lo menos en 10 veces el de la muestra.

Temperatura: tiene un efector importante tanto en el mantenimiento de la integridad de las proteínas como en el pH de las soluciones. Con algunas excepciones, se recomienda que el proceso sea llevado a cabo a temperatura ambiente (22-24°C).

Duración: dependerá del fijador empleado, aunque normalmente no debe superar las 24 hs. Muestras de tejido (10x10x3 mm) fijadas en formaldehído neutro durante 6 a 24 horas resultarán con buena preservación citológica y con un mínimo de enmascaramiento de antígeno.

También es importante, detener el proceso con lavados acordes para quitar el excedente de fijador.

Con respecto al Formol, que es el fijador generalmente empleado en todos los laboratorios y que permite realizar la mayoría de las técnicas, hay que recordar que en solución su pH es ácido y durante su almacenamiento se oxida y precipita. Para evitar la polimerización a paraformaldehído, el formaldehído es normalmente estabilizado con 15% -7% de metanol (Kingsbury 1912, Baker 1958), por lo que se suele comercializar en disolución al 37-40% de máxima pureza (Gullickson, 1994; Martínez et al., 2000; Rodríguez et al., 2006; Walker, 1944).

Una manera simple de conocer el pH es colocar 1 o 2 gotas de Rojo Neutro al 1%. Si el pH es 7, vira hacia el naranja, si es ácido al rosado y se estabiliza con Carbonato de Sodio al 1%; y si el pH es básico vira al amarillo y se estabiliza con Carbonato de Li al 1%. (pero cuidado, la presencia de carbonatos puede generar "artefactos" porque pueden precipitar generando áreas de pseudo calcificaciones en el tejido). Por ello se utiliza buffer fosfato para estabilizar el pH y las soluciones se conservan por más tiempo. El formol buffer se tampona a pH 7 con el objetivo de evitar su acidificación a ácido fórmico con la consiguiente disminución de la cinética de fijación.

Recordar que el formol es un fijador que modifica la configuración espacial de las proteínas al generar puentes metileno o cross-linking con grupos amino, sulfidrilos, hidroxilos, etc. de los aminoácidos (principalmente lisina, tirosina, arginina, fenilalanina y triptófano). Inicialmente se forman grupos hidroximetileno, es una reacción reversible pero luego se forman los puentes cruzados de metileno intra e intermoleculares.

El formol, en su forma monomérica hidratada o metilenglicol es la que se encuentra en mayor proporción y un pequeño porcentaje en metanal libre o formaldehído. Una vez en el tejido el metilenglicol se deshidrata a formaldehído. Por eso una muestra de 4mm de espesor habrá sido penetrada en 4 hs, pero su fijación será menor al 20% es por eso que

se recomienda que el tiempo de fijación entre 24 -72 hs.

Además, del efecto directo del formol hay que tener en cuenta el efecto producido por el metanol que genera precipitación y coagulación de las proteínas, además de la deshidratación, generando retracción y endurecimiento.

International Agency For Research On Cancer (IARC, 2012) lo clasificó como sustancia cancerígena para humanos (Grupo 1)

Decalcificación: En caso de requerirse decalcificación se elegirán los más suaves, preferiblemente el EDTA 10% pH7. También se puede emplear ácido fórmico, pero es muy importante que se si se han empleado ácidos, es crítico realizar un lavado de duración variable con agua corriente, de mayor duración cuanto más haya durado la decalcificación.



Cabeza de pejerrey *Odontesthes bonariensis* (*)

INCLUSIÓN

Las muestras fijadas deben ser lavadas adecuadamente para quitar el exceso de fijador. Posteriormente se procederá de la manera habitual, teniendo especial cuidado con la calidad de los productos, el tiempo del proceso y controlar la temperatura de inclusión. (W. Grizzle, 2001; Yang Guo, 2016)

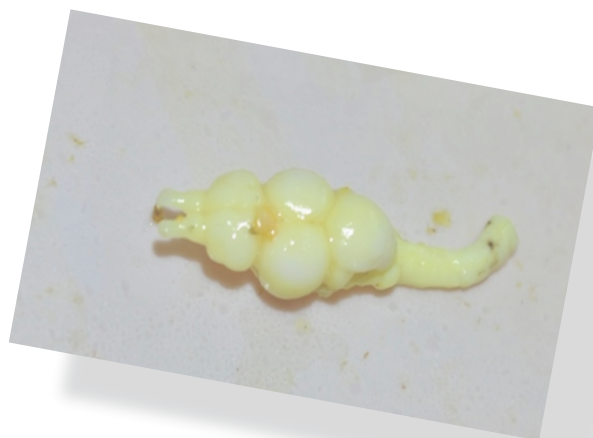
CORTE.

Realización de los cortes deben ser entre 3-7 μm ., secarlos sobre una platina o en estufa, cuidando que la temperatura no supere los 58°C . Se pueden dejar 12 hs a 37°C o 1 h a 58°C como máximo.

Los cortes deben ser colocados sobre portaobjetos tratados con adhesivos tales como Silane, Poli L Lisina, TESPA (Sigma Aldrich), gelatinizados o se debe utilizar portas positivados o con adhesivos de fábrica.

Los cortes pueden guardarse para realizar más adelante. Es conveniente resguardarlos en heladera, también se pueden cubrir con parafina

o envueltos en papel aluminio y guardarlos en el freezer a -20°C , pero si bien pueden guardarse por algunos meses, éstos con el paso del tiempo va disminuyendo la antigenicidad.



Cerebro de pejerrey *Odontesthes bonariensis* (*)

FASE ANALÍTICA

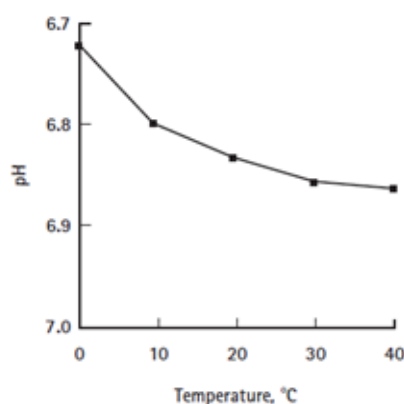
Los procesos que forman parte de esta fase son:

- Recuperación antigénica
- Bloqueo de reacciones inespecíficas (sustancias endógenas)
- Método de incubación
- Sistema de detección
- Reacción de con cromógeno
- Contraste

Si los cortes fueron obtenidos de material fijado e incluido en parafina, deberá ser desparafinado con mucho cuidado, no se recomienda el uso del calor, podrá ser realizado por cualquier aclarante, siempre que sean varias sesiones para asegurarse el correcto desparafinado. Posteriormente, se completa la rehidratación del material con pasajes por alcoholes de graduación decreciente hasta llegar al lavado que en este tipo de técnica se realiza con buffers.

Los buffers comúnmente empleados son el PBS 1X pH 7,4 y el buffer TRIS-HCl. (Si guarda las soluciones buffer en la heladera, hay que

sacarlas 30 min antes de su uso para que lleguen a temperatura ambiente. Observe el siguiente gráfico)



Efecto de la temperatura en el pH del PB
 Chandra Mohan, Ph.D.

RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA (RA)

Se basa en la aplicación en medio acuoso de calor durante diferentes períodos de tiempo para secciones de tejido FFPE (fijadas en formol y embebidas en parafina) para exponer los epítopos y recuperar su antigenicidad.

Existen varios métodos:

- Inducción por calor
- Digestión enzimática
- Combinación calor-digestión enzimática

Recuperación inducida por calor:

Se basa en estudios que se realizaron en la década '90s (Shi et al, 1991) en base a estudios previos que indicaban que la exposición de las muestras a temperaturas mayores a 100°C se rompían los puentes metileno entre las proteínas y el formol. El método que se denominó Antigen Retrieval (AR) y hoy se conoce como HIER (Heat-induce epitope retrieval).

Shi y col introdujeron el uso del calentamiento de soluciones buffer como el Citrato de Sodio pH6 o el Tris-HCl 0,01M pH 8-10 o EDTA pH 8 o TE pH 9 (En el mercado existen buffers comerciales listos para usar).

Las fuentes de calor pueden ser microondas, ollas a presión, baños térmicos, platinas (inmunoprocadores automatizados). El tiempo varía entre 10 minutos a una hora con temperaturas cercanas a 90-100°C, siendo para la mayoría de los antígenos la temperatura óptima de 97°C durante 30 min.

Este procedimiento no sólo mejora la reactividad de algunos antígenos que eran considerados como no reactivos, sino que además la HIER incrementa la sensibilidad permitiendo el empleo de diluciones más altas del anticuerpo, mejora la coloración y disminuye el background.

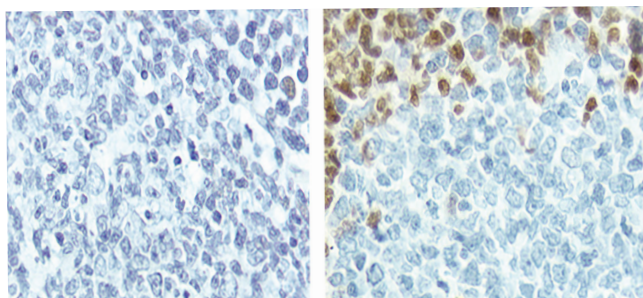
Aunque puede ser excesivo y generar coloración de fondo porque se desbloquearon proteínas como biotinas endógenas. Además, la

exposición a altas temperaturas puede ocasionar que los cortes se despeguen o se levanten y generar efecto borde.

Una vez transcurrido el tiempo, debe enfriarse los cortes, en el mismo recipiente con la solución empleada, hasta que lleguen a temperatura ambiente.

Cada vez que se modifique o se adquiera una nueva partida de anticuerpos o se requiera poner a punto una nueva detección, se debe ajustar cuál es el mejor buffer y luego se ajusta la temperatura y el tiempo.

Shi (1996) recomendaba una batería de pruebas modificando el pH y la temperatura (por encima y por debajo del punto de ebullición). También a partir de sus trabajos se recomienda que se empleen Buffer citrato pH6 o buffers con pH bajos si se requiere el desenmascaramiento de Ag nucleares, pero si los Ag son citoplasmáticos el buffer Tris-HCl pH8 o 9, es mejor.



Lymph Node: Without (left panel) and with (right panel) TRIS-based Antigen Unmasking Solution, Cyclin D1 (rm), ImmPRESS® Anti-Rabbit IgG Kit, DAB (brown) substrate. Hematoxylin QS (blue) counterstain.

Digestión enzimática:

Es un método que se emplea habitualmente, pero para pocos anticuerpos. Es un método difícil de controlar y de estandarizar ya que depende de varios factores. Las enzimas proteolíticas como la quimitripsina, pepsina (0.2-0.4%, pH 2 37°C 5-20 minutos), tripsina (0.1-0.25%, pH6 37°C 10 minutos), pronasa E, proteinasa K (0,1% pH 8 25-37°, 5-10 min).

En la práctica es común la combinación de la digestión enzimática con calor para obtener mejores resultados.

BLOQUEO DE REACCIONES INESPECÍFICAS

Bloqueo de enzimas endógenas
Bloqueo de uniones inespecíficas

Bloqueo de enzimas endógenas

Durante la coloración de la IHQ, las enzimas empleadas son la Peroxidasa de Rábano Picante (HRP) y Fosfatasa alcalina (FA). Dichas enzimas también se encuentran en varios tejidos por lo que se debe bloquear su actividad para que no interfieran en la reacción de coloración generando background o falsos positivos.

Según cuál sea el sistema que se utilizará para la detección del complejo inmune es la enzima que debe bloquearse. En particular, las peroxidasa endógenas reaccionan ante el peróxido de hidrógeno, que es una propiedad común en las hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina, citocromo y catalasas). Estas enzimas, se inhiben con exceso de sustrato (H_2O_2). El agua oxigenada de 100 vol., es diluida al 0.3% en PBS, se incuba las secciones durante 30 a 10 minutos a temperatura ambiente.

(*)

El bloqueo generalmente se realiza antes de la incubación con el anticuerpo primario, excepto algunos (si son comerciales deberá estar indicado en la ficha técnica). La solución de agua oxigenada para el bloqueo, debe prepararse inmediatamente antes de usar. Puede diluirse en agua destilada, en buffer PBS o en metanol (en este caso será realizado después de los pasajes por alcohol 100°).

Un método rápido para detectar el grado de inespecificidad que genera la presencia de peroxidasa en nuestra muestra, es incubar alguna sección con el cromógeno-HRP y si

se observa coloración indica presencia de peroxidasa, por lo que deberá tenerse en cuenta esta coloración inespecífica a la hora de la observación.

Con respecto a la Fosfatasa alcalina el bloqueo es agregando levamisol a la solución de cromógeno y sustrato. Esto sirve para inhibir la expresión de varias de las isoformas de la enzima, que están presente en algunos órganos (hígado, hueso, riñón: túbulo proximal, placenta, etc.). La isoforma intestinal no es inactivada por el levamisol y puede bloquearse con HCL 0,03-0,5N.

Bloqueo de uniones inespecíficas

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, se aconseja el bloqueo de proteína con suero normal, o suero preinmune o de una forma menos específica con BSA (suero de albúmina bovina) 1% o con una solución de leche descremada 5% en PBS 1X y 0,3% de Triton X-100 (leche en polvo descremada sin aditivos como calcio, vitaminas, etc), de esta forma se enmascaran los sitios de posibles uniones.

También en numerosas ocasiones se requiere el bloqueo de biotina endógena, ya que puede interferir dando coloración de fondo cuando el sistema de detección basados en biotina/estreptavidina o avidin/biotina modificado. Existen kits comerciales para realizar este bloqueo que debe realizarse antes de la incubación del primer anticuerpo. En algunos órganos donde los tejidos tienen mayor concentración de biotina, como el hígado y el riñón, mientras que otros tienen menor concentración como pulmón, cerebro, mama y bazo.

También se encuentran en el mercado soluciones bloqueadoras que reemplazan las opciones antes descriptas, se basan en proteínas de origen vegetal.

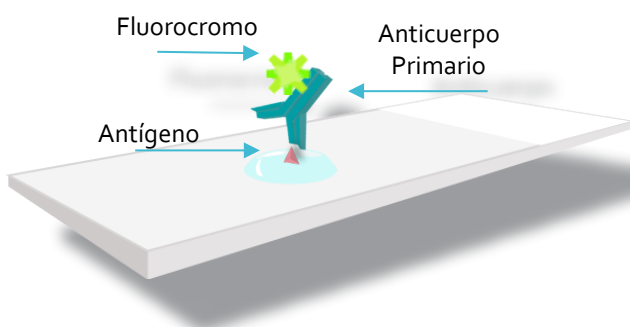
Este tipo de bloqueo no es necesario si el sistema de detección emplea una cadena de polímeros con el anticuerpo secundario (EN-VISION de Dako, por ejemplo)

MÉTODOS DE INCUBACIÓN

Para visualizar el complejo Ag-Ac, se realiza una reacción colorimétrica. Los métodos van desde sencillos procedimientos en los que el anticuerpo primario es conjugado con un fluoróforo (como FICT o isocianato de fluoresceína -rojo, TRICT o isocianato de tetrametilrodamina -verde) denominados métodos directos, hasta métodos más complejos e indirectos.

MÉTODO DIRECTO

Es la técnica más antigua en la que los anticuerpos primarios eran marcados con moléculas fluorescentes., hoy en día no se utiliza debido a la escasa amplificación de la señal.



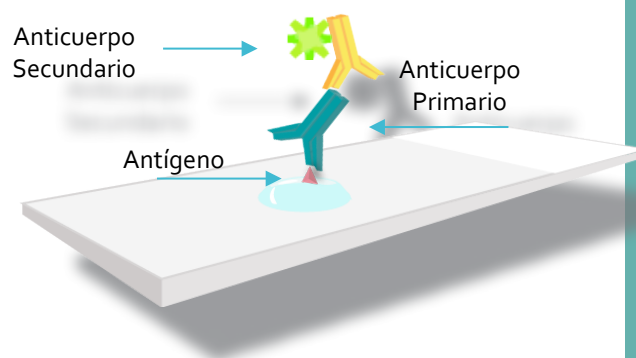
MÉTODOS INDIRECTOS

Estos métodos consisten en la aplicación de anticuerpos primarios sin conjugar, que será reconocido por un anticuerpo secundario que se encuentra conjugado con fluorocromos, enzimas o polímeros.

Método indirecto de dos pasos:

Consiste en aplicar el anticuerpo primario, el cual reconocerá al antígeno en estudio. Luego, dicho anticuerpo será reconocido por un anticuerpo secundario anti-anticuerpo primario marcado con un fluoróforo. La técnica de Inmunofluorescencia (IF) es un ejemplo de este tipo de metodología. Los anticuerpos secundarios comerciales marcados pueden ser los Alexa Fluor® (Thermo Fisher Scientific).

Esta metodología es muy útil para visualizar varios antígenos simultáneamente con fluoróforos que se puedan excitar y emitan en diferentes longitudes de onda. Otorgan buenas imágenes dependiendo del microscopio de epifluorescencia con el que se cuente. Es bastante rápido, pero hay que tener cuidado con la autofluorescencia (principalmente en los tejidos fijados con formaldehído).



Método indirecto de tres pasos:

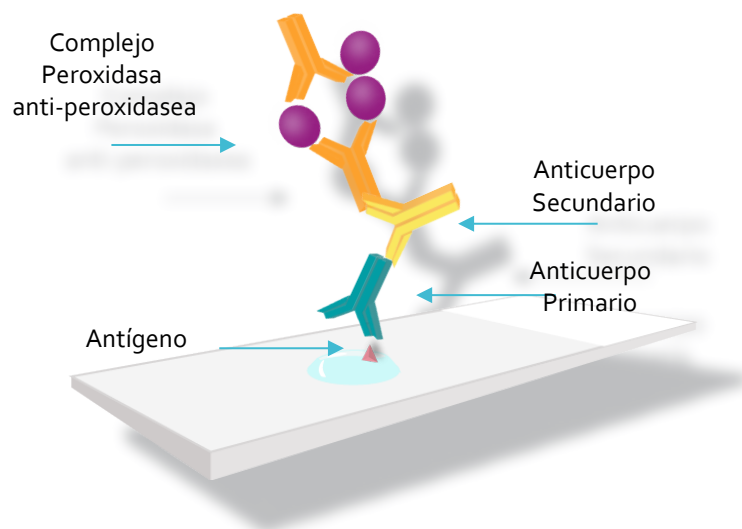
En este, el procedimiento se basa en utilizar como anticuerpo secundario uno que haya sido conjugado con una enzima.

El anticuerpo secundario y el terciario son aplicados sucesivamente y ambos están marcados con la misma enzima. Esto permite amplificar la señal cuando los antígenos estudiados tienen un número reducido de epítopes.

Otros métodos indirectos son los que emplean enzimas, como el **Método PAP** que utiliza un complejo peroxidasa-antiperoxidasa, mientras que el **Método APAAP** usa un complejo fosfatasa alcalina-anti fosfatasa alcalina.

Método PAP

Desarrollado por Sternberger en 1970. Consiste El complejo PAP consta de tres moléculas de peroxidasa y dos anticuerpos .



Método APAAP

Diseñado por Cordell y col en 1984. Este método consiste en generar un complejo APAAP que tiene dos moléculas de fosfatasa alcalina y un anticuerpo.

Hoy en día, estas técnicas prácticamente están en desuso.

Peróxidasa (PA) empleada es la enzima Peroxidasa de rábano picante (*Amoracia rusticana*)(HRP). Son enzimas oxidorreductoras. Su actividad fue descubierta por Schonbein en 1855. El grupo protésico está compuesto por un grupo hemo unido a la proteína (generalmente un residuo de histidina).

Fosfatasa Alcalina es una enzima extraída del intestino de ternero, hidroliza ésteres de naftol dando compuestos fenólicos y fosfatos

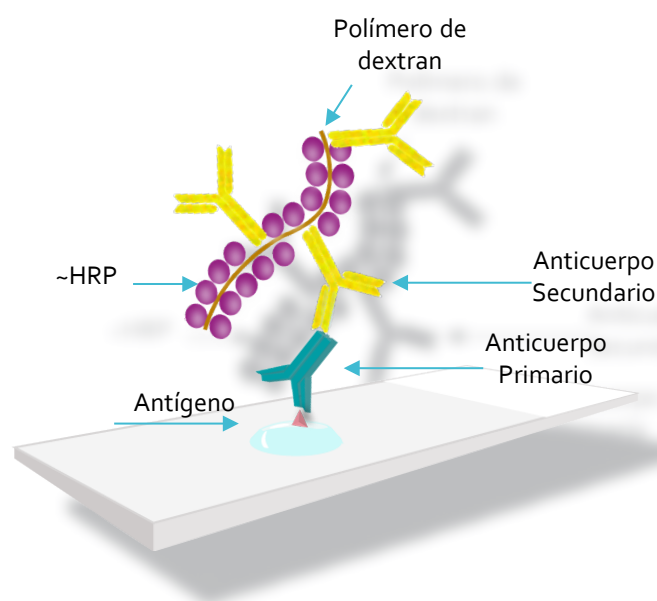
Método a base de polímeros

Para amplificar la señal, Sabattini en 1998 crea un método que consiste en una cadena central de polímero de dextran conjugado con veinte moléculas de IgG y con cien moléculas de HRP.

Existen diferentes métodos, en los que se asocian menos moléculas y son un método directo como el sistema EPOS de Dako.

La ventaja de este tipo de métodos es que no requieren el bloqueo de biotina endógena, que disminuye el tiempo del proceso porque son muchos más sensibles para la detección de Ag en bajas concentraciones.

En el mercado se encuentran kits multi target y otros con algunas modificaciones en el diseño como el apilamiento de las moléculas y otros que utilizan micropolímeros.



Método ABC (Avidina/Biotina) y ABC modificado (LSAB, Estreptavidina/Biotina)

Hoy en día, se emplean como rutina estos métodos, que se basan en la afinidad de la Avidina (es glicoproteína de la clara de huevo de PM 68000) o de la Estreptavidina (obtenida del *Streptomyces avidinii*) por la Biotina (la biotina es una vitamina del complejo B de muy bajo peso molecular: 213), para esto cuentan con cuatro sitios de unión.

Pero la Avidina tiende a unirse inespecíficamente a componentes tisulares con cargas negativas por lo que es reemplazada por la estreptavidina. La biotina se puede conjugar fácilmente con la fracción Fc de las inmunoglobulinas, sin afectar la capacidad de los Acs de unirse a los antígenos específicos.

La biotina también puede acoplarse a la peroxidasa picante del rábano (HRP). Varias moléculas de biotina pueden unirse a una molécula de HRP. Así, en cada molécula de anticuerpo se pueden conjugar hasta 150 moléculas de biotina. Por lo tanto, la utilización de estas técnicas permite una gran amplificación de la reacción.

Entonces, el antígeno reconocido por el anticuerpo primario, que a su vez lo será por un anticuerpo secundario conjugado con biotina, y ésta interactuará con la estreptavidina que tiene asociada la enzima.

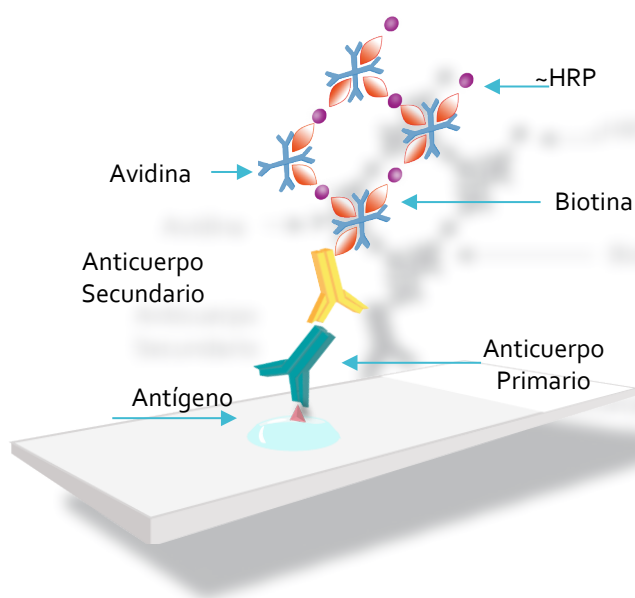
En este método se emplean enzimas peroxidadas o fosfatasa alcalina. El complejo enzima-sustrato transforma un cromógeno incoloro en un producto final coloreado e insoluble.

Dado que la unión de la enzima con el sustrato (agua oxigenada) es reversible, una vez libre la peroxidasa puede reaccionar nuevamente con el sustrato presente para formar nuevas moléculas coloreadas.

Existen varios cromógenos que pueden reaccionar y dar un precipitado como la 3'-3'-diaminobencidina (DAB) que genera un precipitado marrón tostado, y fácilmente identificable al microscopio. Es un precipitado estable e insoluble en alcohol o solventes orgánicos, lo que permite realizar otras técnicas después y conservar los cortes por largo tiempo.

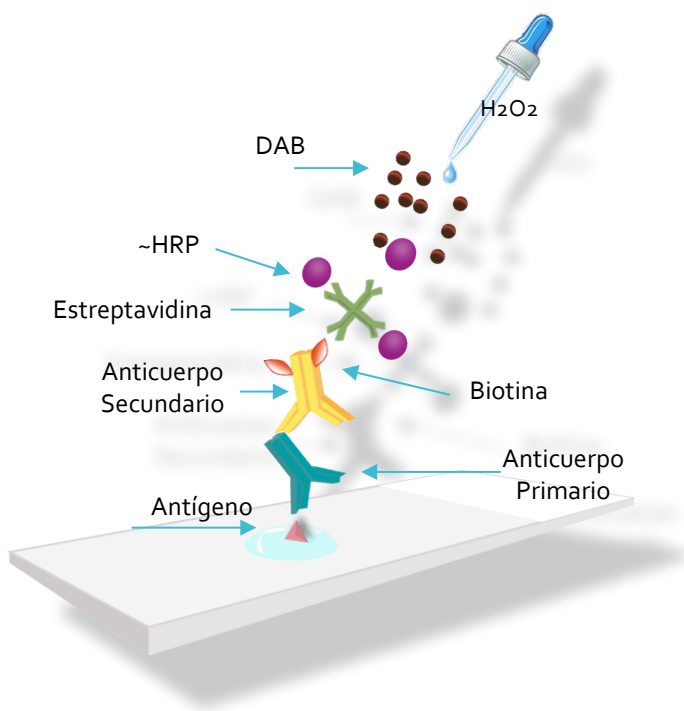
El tono puede ser modificado si se utiliza, una vez precipitado, con níquel, tetróxido de osmio o sulfato de cobre. Pero, es cancerígeno. Otra opción es utilizar el 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) como donantes de electrones, genera un precipitado rojo, pero a diferencia del DAB, es soluble en alcohol y solventes orgánicos, por lo que no permite preparaciones duraderas.

También, puede usarse el 4-cloro-1-naftol que da un precipitado azul soluble; o el reactivo de Hanker-Yates que produce un precipitado negro azulado.



Técnica de la estreptavidina-biotina marcada (LSAB)

Desarrollada por Bratthover en 1995. Se la considera de 4 a 8 veces más sensible que el ABC, es más rápida y puede usarse indistintamente con un suero primario monoclonal de ratón o policlonal de conejo; ya que el anticuerpo puente es en realidad una mezcla de IgG anti-ratón y anti-conejo (Dako Co. 1995) y también puede utilizarse un Ac biotinilado de cualquier especie en reemplazo de los Ac puente del kit comercial y luego unirlo a la estreptavidina.



Otras reacciones posibles son con el uso de otra enzima, como la fosfatasa alcalina (AP), que se recomienda en muestras de tejido con alta concentraciones de peroxidasas, como sangre, médula ósea y bazo. Entre los sustratos el más empleado es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/ nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) y el naftol AS-TR fosfato/ fast red RC.

Método Animal Research kit (ARK)

Es un método de detección universal, desarrollado por Dako para evitar uniones inespecíficas a inmunoglobulinas endógenas cuando se trabaja con anticuerpos primarios que provienen de la misma especie que se está muestreando.

Antes de incubar con el anticuerpo primario, se hace reaccionar con fragmento Fab de Ig anti-ratón biotinilado, se genera un complejo inmune (a 4° se puede guardar por varios meses). Cuando se va a realizar la técnica, se le agrega suero normal de ratón, y de esta forma el exceso de anticuerpo biotinilado queda "tapada". Entonces, se aplica a la muestra y luego se revela.

Método CAS (Catalysed Signal Amplification)

Esta metodología se basa en la capacidad de la HRP en oxidar compuestos fenólicos a compuestos intermediarios inestables y altamente reactivos o RADICALES.

Entonces, se utiliza Tiramida, que en un extremo de su molécula posee un fenol y en el otro una amina con la que reacciona con la Biotina.

La tiramida conjugada, Biotinil-tiramida, se oxida y se deposita al reaccionar con la tirosina de proteínas cercanas al sitio de interacción Ag-Ac.

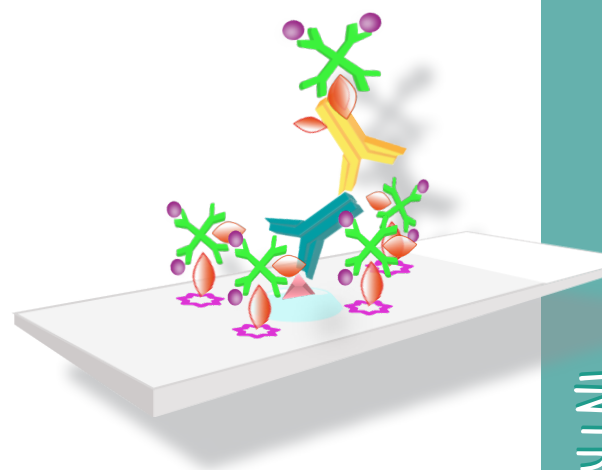
Posteriormente, la biotina será reconocida por la estreptavidina-HRP. Se pueden establecer hasta 3 ciclos y luego se revela.

Desventajas: es un método muy laborioso, es de difícil estandarización, lleva mucho tiempo y requiere bloqueo de biotinas endógenas.



Fluorescein-Tyramide Amplification

Es una modificación del método CAS, en el cual se reemplaza Biotinil-tiramida por Fluorescein-tiramida. La ventaja es que no requiere bloqueo de biotina endógena.



iCAS (Improved Catalysed Signal Amplification)

Es una modificación del método CAS, para aumentar la sensibilidad del sistema, mejorar la señal y disminuir el ruido de fondo.

En este método, se reemplazan las moléculas de Tiramida por moléculas de Ácido Fenólico que es un mejor sustrato para la HRP.

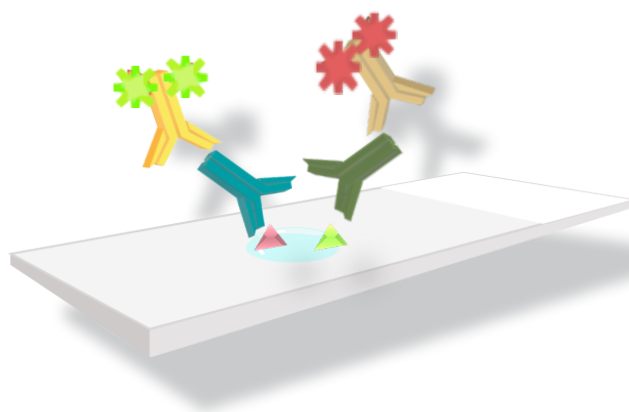
MÉTODOS DE MARCACIÓN MÚLTIPLE

Como es frecuente que se requiera la determinación de varios Ags al mismo tiempo, presentes en el mismo tejido, en la misma población celular e incluso dentro del mismo compartimiento celular, se desarrollaron métodos que combinan técnicas, Hibridación *in situ* y luego IHQ, doble marcación por incubación simultánea y tinción secuencial.

Doble marcación por incubación simultánea:

Este método permite la detección de Ags diferentes con Acs de distintas especies que serán

reconocidos por Ac secundarios diferentes. La Inmunofluorescencia (IF) se fundamenta de este modo.



Tinción Secuencial

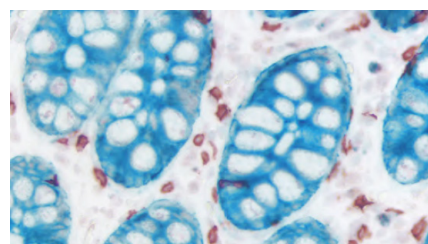
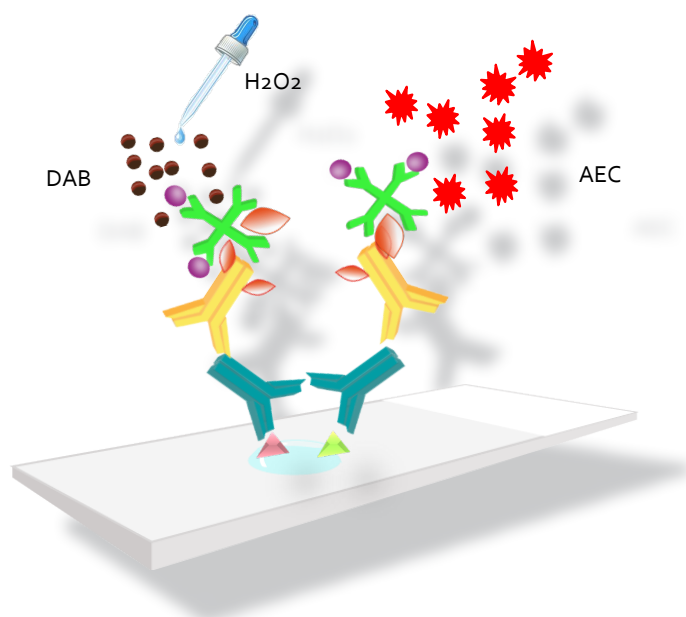
En este caso, se realiza una incubación con un Ac primario, se revela y luego se procede a incubar con el segundo Ac primario, que se revela utilizando un método de detección diferente al primero o si se emplea la misma enzima, se usa otro sustrato.

La siguiente tabla muestra algunas posibles combinaciones.

Enzima	Cromógeno	Color
Gal	x-Gal	Turqueza
AP	Fast Blue BB	Azul
HRP	AEC	Rojo

HRP	DAB	Marrón
Gal	x-Gal	Turqueza
AP	Fast Red	Rojo

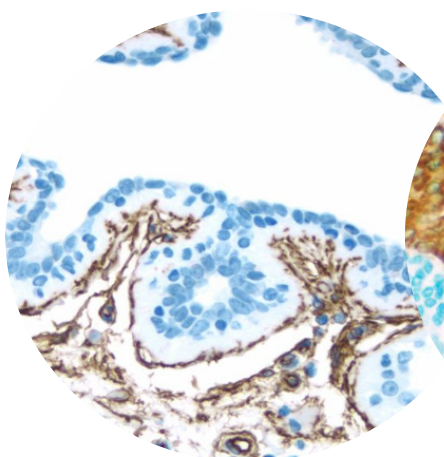
HRP	DAB	Marrón
AP	New Fucsin	Rojo
HRP	TMB	Verde



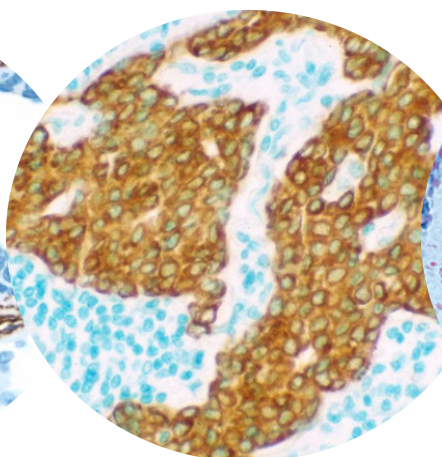
Colon - Double label • Cytokeratin (AE1/AE3, m), ImmPRESS AP Anti-Mouse IgG Reagent, Vector Blue AP Substrate (blue) • CD3 (rb), ImmPRESS Anti-Rabbit IgG HRP Reagent, ImmPACT AEC Red HRP Substrate (red).

Contraste

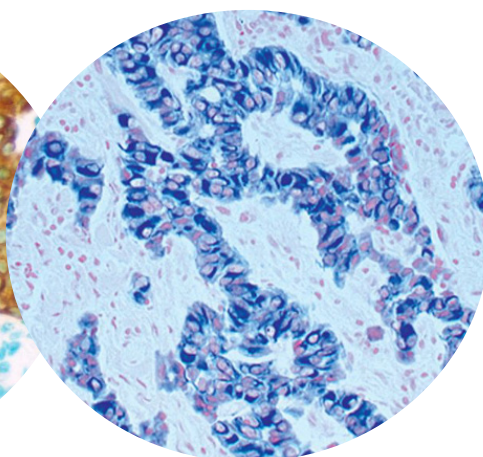
Usualmente, la IHQ se contrasta con Hematoxilina, aunque otras coloraciones son posibles, con Methyl green o Nuclear Fast Red



Hematoxilina-qs de Vector Lab®



Methyl green de Vector Lab®



Nuclear Fast Red de Vector Lab®

Methyl-Green

0,1M Buffer Acetato de Sodio pH4,2

Acetato de Sodio 3 H₂O.....1,36 grs
 Agua destilada.....100 ml

Disolver, ajustar el pH con ácido acético glacial.
 Llevar a volumen final.

Methyl green 0,5%

Methyl green (libre de ethyl violet)...0,5 grs.
 0,1 M de Buffer Acetato de Sodio.....100ml

Tiempo de coloración estimado: 5 minutos
 Lavado rápido en agua destilada.
 Deshidratar y aclarar rápidamente. Montar.

Nuclear Fast Red

0,1M Buffer Acetato de Sodio pH4,2

Nuclear Fast Red.....0,1 grs
 Sulfato de Amonio..5 grs.
 Agua destilada.....100 ml

Disolver, filtrar y agregar cristales de timol.

Tiempo de coloración estimado: 5 minutos
 Lavado rápido en agua destilada.
 Deshidratar y aclarar rápidamente. Montar.

CONTROLES

La IHQ es una técnica que requiere varios controles para su validación posterior. Los controles de reacción deben realizarse al mismo tiempo que las determinaciones de la muestra de interés.

Éstos deberán repetirse cada vez que se modifiquen alícuotas de anticuerpo, se cambie alguna condición del procesamiento.

Controles de Ac primarios

Los controles para Acs primarios consisten en:

*Realizar al IHQ en cortes de animales knock out para el Ag que se pretende demostrar.

*Para saber si el Ac primario es específico para la proteína de interés se puede realizar una ISH seguida de IHQ.

*Determinar la especificidad del Ac mediante técnicas como Western Blot, RIA o ELISA.

*En cortes en paralelo, se incubaba uno con el Ac y el otro con el Ac que fue preabsorbido con el péptido (para el que fue generado el Ac). Se lo considera un CONTROL NEGATIVO.

Controles de Ac secundarios.

Se incuban los cortes, previamente con suero normal de la misma especie que el Ac primario.

Controles de tejidos.

Utilizar cortes de tejidos que sea conocida la inmunoreactividad positiva o negativa para el Ag a determinar.

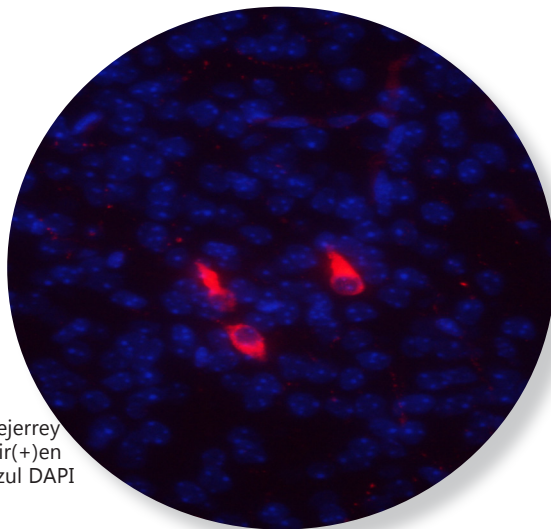
Identificar áreas dentro del corte, en las que se reconocen como negativas

FASE POST ANALÍTICA

OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO Y EVALUACIÓN DE PROBLEMAS

Ausencia o el exceso de coloración

Puede deberse a varias causas, por eso es importante la realización de controles positivos durante el proceso.



Corte transversal de cerebro de pejerrey *Odontesthes bonariensis*, pGnRHir(+) en rojo Alexa Fluor™594, núcleos en azul DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole).200x

Ausencia de coloración

-  Ag se expresa en muy baja cantidad.
-  Método de Recuperación antigénica ineficiente.
-  Concentración final del Ac primario muy diluída
-  Alícuota del Ac primario vieja.
-  Anticuerpo primario incorrecto.
-  Anticuerpo secundario incorrecto o vencido.
-  Sistema de detección vencido o erróneo.
-  Cortes viejos.

Posible respuesta

- Evaluar con controles de tejido inmunoreactividad positiva.
- Modificar el método de recuperación. Rectificar el tiempo, chequear el pH de los buffers.
- Aumentar la concentración del Ac primario. Cambiar alícuota por otra que no haya sufrido ciclos de congelación y descongelación.
- Probar con otro Ac para el mismo Ag, hay muchas variaciones entre las diferentes empresas. O si son producidos por laboratorios de investigación, depende de la secuencia del péptico contra la que generaron el Ac.
- Cambiar el Ac secundario por el correcto o por uno nuevo o aumentar la concentración.
- Evitar el uso de cortes viejos. Realizar nuevos cortes. No dejarlos expuestos a la luz y/o a temperatura ambiente.

Posibles respuestas

Modificar el método de Recuperación Antigénica, cambiar el tiempo y evaluar otros buffers posibles de diferente pH

El bloqueo de reacciones inespecíficas ha sido insuficiente. Realizar un bloqueo de biotinas endógenas.

Coloración excesiva

En todo el corte, y en todos los cortes.

Aumentar el tiempo del bloqueo de peroxidasas endógenas.

Solo en la periferia del corte

Tener cuidado con la temperatura y el tiempo de incubación del Ac primario.

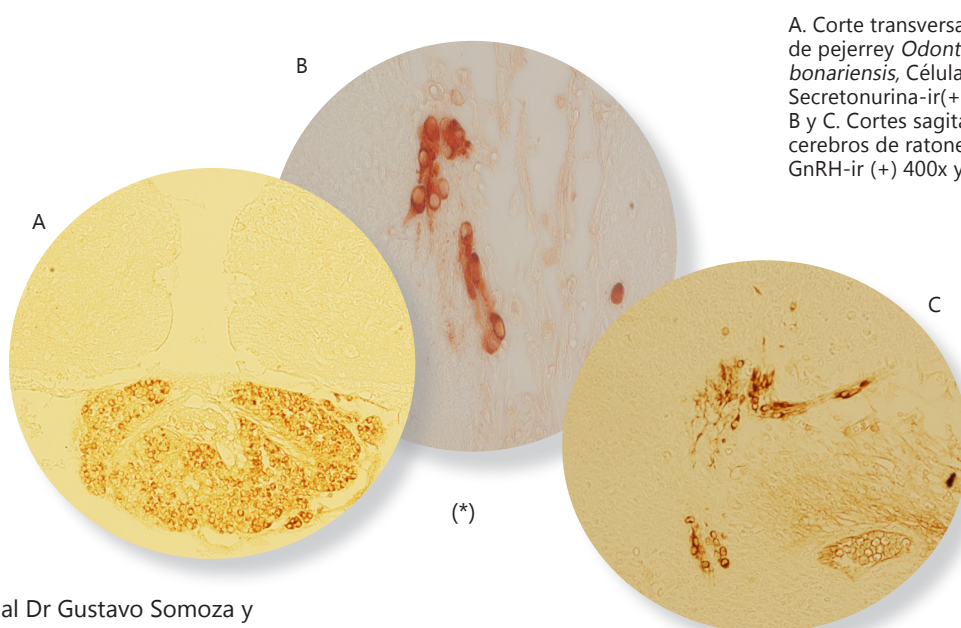
En todas las inmunomarcaciones del día de trabajo

Si el Ac primario es de la misma especie que la muestra, utilizar otro método.

Bloquear el Ac secundario.

Diluir el sistema de revelado, o disminuir el tiempo.

Reducir el grosor de los cortes.



A. Corte transversal de cerebro de pejerrey *Odontesthes bonariensis*, Células hipofisarias Secretorina-ir(+). 200x
B y C. Cortes sagitales de cerebros de ratones, neuronas GnRH-ir (+) 400x y 100x

Agradecimiento al Dr Gustavo Somoza y colaboradores del laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura del Instituto Tecnológico de Chascomús. CONICET-UNSAM, por las imágenes (*)

Referencias

Controls for Immunocytochemistry: An Update

R. W. Burry *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59(1) 6–12 (2011)

Applications of immunohistochemistry

J. Duraiyan, R. Govindarajan, K. Kaliyappan, and M. Palanisamy. *J Pharm Bioallied Sci.* (2012)

Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues

I. Eltoum, J. Fredenburgh, R. B. Myers, W. E. Grizzle. *The Journal of Histotechnology* 24:3 I (2001)

The Effects of Tissue Processing Variables Other Than Fixation on Histochemical Staining and Immunohistochemical Detection of Antigens,

W E. Grizzle, C. R. Stockard & P.E. Billings. *Journal of Histotechnology*, 24:3, 213-219 (2001).

Drying paraffin sections on hotplate inadvisable

Yang Guo, Yu Xiang and Zheng-Wei Yang. *Journal of Histology & Histopathology* Vol. 3 Art 4 (2016)

Controls for Immunohistochemistry: The Histochemical Society's Standards of Practice for Validation of Immunohistochemical Assays

S. M. Hewitt, D. G. Baskin, C. W. Frevert, W. L. Stahl, and E. Rosa-Molinar. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2014, Vol. 62(10) 693–697 (2014)

A Practical Approach for Evaluating New Antibodies in the Clinical Immunohistochemistry Laboratory

E.D. Hsi, MD. *Arch Pathol Lab Med*—Vol 125, (2001)

Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology

K. S. Janardhan, H. Jensen, N. P. Clayton and R. A. Herbert. *Toxicologic Pathology*, 46(5) 488-510 (2018)

The Antigen–Antibody Reaction in Immunohistochemistry

C. Montero. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Volume 51(1): 1–4 (2003)

The Impact of Tissue Fixatives on Morphology and Antibody-based Protein Profiling in Tissues and Cells

L. Paavilainen, Å. Edvinsson, A. Asplund, S. Hober, C. Kampf, F. Pontén, K. Wester.

Journal of Histochemistry & Cytochemistry Volume 58(3): 237–246, (2010)

The Effect of Cold Ischemia Time and/or Formalin Fixation on Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and Human Epidermal 'Growth Factor Receptor-2 Results in Breast Carcinoma

M. Pekmezci, A. Szpaderska, C. Osipo, Cağatay Erşahin. *Pathology Research International*. (2012)

Overview of Automated Immunohistochemistry

J. W. Prichard, DO. *Arch Pathol Lab Med*. ol 138, (2014)

Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories

J.A. Ramos-Vara, M. Kiupel, T. Baszler, L. Bliven, B. Brodersen, B. Chelack, S. Czub, F. Del Piero, S. Dial, E. J. Ehrhart, T. Graham, L. Manning, D. Paulsen, V. E. Valli, K. West. *J Vet Diagn Invest* 20:393–413 (2008)

When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique

J. A. Ramos-Vara and M. A. Miller. Veterinary Pathology, Vol 51(1) 42-87 (2014)

Comparison of Different Decalcification Methods Using Rat Mandibles as a Model

F. M. Savi, G. I. Brierly, J. Baldwin, C. Theodoropoulos, M. A. Woodruff. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, Vol. 65(12) 705 –722 (2017)

Antigen Masking During Fixation and Embedding, Dissected

C. R. Scalia, G. Boi, M. M. Bolognesi, L. Riva, M. Manzoni, L. DeSmedt, F. M. Bosisio, S. Ronchi, B. E. Leone, and G. Cattoretti. Journal of Histochemistry & Cytochemistry Vol. 65(1) 5–20 (2017)

Evaluation of a panel of antibodies for the immunohistochemical identification of immune cells in paraffin-embedded lymphoid tissues of new- and old-world camelids

A-K.Uhde, A. Lehmbecker, W. Baumgärtner, I. Spitzbarth. Veterinary Immunology and Immunopathology 184 42–53(2017)

FIXATION The Key to Good Tissue Preservation

Dale Ulmer, P.A. University of South Alabama College of Medicine, Department of Pathology, Mobile, AL

Application of immunohistochemistry technique in hydrobiological studies

Hui Zhang, Wen Wen, Jizhou Yan. Aquaculture and Fisheries (2017) Technical notes

Links

<http://www.ihcworld.com/protocols.html>

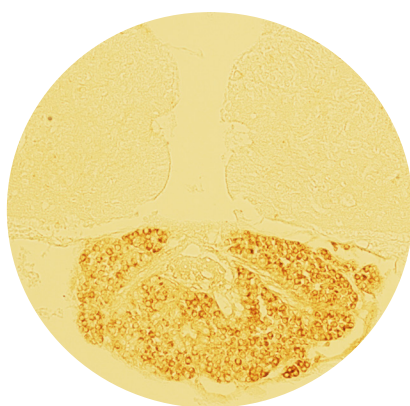
<http://www.hoajonline.com/histology>

<https://nordiqc.org/recommended.php>

<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/graphic-protocol-preparation-and-chromogenic-ihc-staining-paraffin-embedded-tissue-sections>

<https://www.cospheric.com/>

<https://www.textoscientificos.com/quimica/formaldehido>



Gabriela C. López