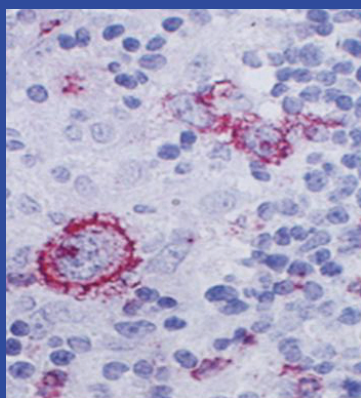
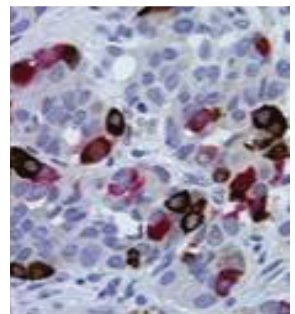
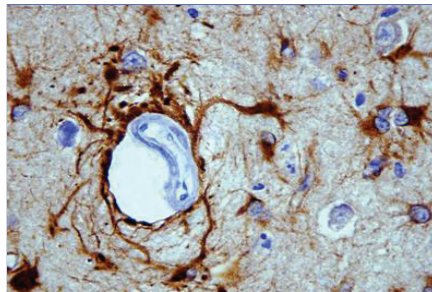
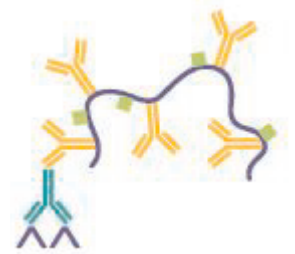


ENCUENTRO REGIONAL DE HISTOTECNOLOGÍA 2008

CURSO DE INMUNOHISTOQUÍMICA BÁSICA



J. E. Uriburu 950 • Piso 5
(C1114AAD) Cdad. Autónoma de Buenos Aires
www.ht.org.ar • sah@ht.org.ar

Índice

Principios Básicos en las Técnicas Inmunohistoquímicas. Parte I.	Pag.3
El antígeno.....	Pag.4
HT. Cristina Chaves (1)	
Reconversión antigénica.....	Pag.18
Norma Pozzo.(2)	
Principios Básicos en las Técnicas Inmunohistoquímicas. Parte II.....	Pag.23
El anticuerpo.....	Pag.24
HT. Cristina Chaves (1)	
Sistemas de detección .Reacciones de Visualización.....	Pag.27
Norma Pozzo.(2)	
Los marcadores o trazadores, visualización de los marcadores enzimáticos, reacciones de óxido-reducción, sustancias endógenas, uniones inespecíficas, incubaciones.....	Pag.30
HT. Cristina Chaves (1)	
Principios Básicos en las Técnicas Inmunohistoquímicas. Parte III.....	Pag.34
Inmunohistoquímica aplicada a extendidos citológicos.....	Pag. 35
HT. Cristina Chaves (1)	
Problemas, causas y soluciones.....	Pag.39
Norma Pozzo.(2)	
Gestion de compras.....	Pag.41
Norma Pozzo.(2)	
Organización en los laboratorios de inmunohistoquímica.....	Pag.44
Norma Pozzo.(2)	
Guía para preparar soluciones molares.....	Pag.49

(1) Escuela de Técnicos Preparadores de Histología "Prof. Dr. Domingo Mosto"
Hospital General de Agudos J.M. Ramos Mejía G.C.B.A.

(2) Hospital de Pediatría "J.P.Garrahan". Servicio de Patología .G.C.B.A

Nuestro agradecimiento a:

Dra. Conejos, Dra. Paz, HT. Daniel Iñigo, HT. Karina Rocca. Personal del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Niño Jesús. San Miguel de Tucumán:
Autoridades del Hospital del Niño Jesús, San Miguel de Tucumán
Autoridades y personal del SIPROSA y Ministerio de Salud de la Provincia de Tucumán

Principios básicos en las técnicas de Inmunohistoquímica

Parte I

EL ANTÍGENO

Prefacio:

"La presente sección del cuadernillo contiene una recopilación de variados autores que han colaborado con sus manuscritos y/o charlas en eventos científicos de la Sociedad Argentina de Histotecnología, la Sociedad Argentina de Patología y la Sociedad Argentina de Citología (en ése orden) que hemos editado para esta ocasión, bajo la responsabilidad de la Ht. Cristina Chaves"

INTRODUCCIÓN:

Para entender los fundamentos de las técnicas de inmunohistoquímica, es preciso conocer:

- El antígeno
- El anticuerpo
- Los marcadores o trazadores
- Los sistemas de detección
- Las reacciones de óxido-reducción.
- La visualización de los marcadores enzimáticos.

Vayamos ordenadamente a cada una de las definiciones y conceptos:

Las técnicas de inmunohistoquímica se basan en la aplicación de reacciones **antígeno-anticuerpo**, que pueden ser únicas o secuenciales. Son altamente sensibles y específicas y ponen en evidencia a través de **un marcador o trazador acoplado a un anticuerpo u otras sustancias**, gran variedad de componentes celulares o tisulares.

Estos componentes son generalmente **proteínas**. Pueden demostrarse también otros compuestos relacionados como polipéptidos, grupos prostéticos como hidratos de carbono en glicoproteínas, o tipos de lípidos como gangliósidos o cerebrósidos.

Con éstas técnicas, es posible demostrar una gran variedad de proteínas, sean simples o conjugadas, las cuales, como veremos **se comportan como antígenos frente a un anticuerpo determinado y específico**, a través de un **marcador que hace visible la reacción**.

Entonces cabe aquí preguntarnos:

Pregunta 1. ¿La unión entre el antígeno y el anticuerpo ocurre siempre?

La **primera respuesta** la dejaremos en suspenso hasta más entrada la lectura del cuadernillo y entre todos la contestaremos en una evaluación general. Les adelantamos que hay múltiples respuestas y que probablemente todas sean correctas. Justificaremos cada una de ellas.

Pregunta 2. ¿Se puede ver esa reacción?

La unión antígeno – anticuerpo es un tipo de reacción denominada **primaria**, que ocurre **"in vivo"**. Por tanto al ser **un proceso no visible, necesita de un marcador que permita su visualización**. Por eso es tan común denominar a estas técnicas como de **"inmunomarcación, inmunomarcaje, inmunotrazado, o simplemente marcación"**. **¿Quién de ustedes no ha escuchado alguna vez decir que a una muestra hay que hacerle marcaciones?**

Pregunta 3. ¿Se puede demostrar?

La reacción antígeno-anticuerpo se puede demostrar en tejidos animales, humanos, extendidos citológicos, improntas, procedimientos intraquirúrgicos, etc., y esto nos remonta al año 1941 cuando el equipo de Albert H. Coons, consiguió **"marcar"** un anticuerpo con un marcador fluorescente denominado **"fluorocromo"**. Posteriormente se utilizaron enzimas marcadoras unidas a un anticuerpo u otras sustancias, la más difundida, la peroxidasa de rábano picante (**HRP**) **clasifica a las técnicas de inmunoperoxidasa**.

- Se denomina generalmente a la inmunohistoquímica como la ciencia del uso de **anticuerpos marcados** para revelar **"in situ" la presencia de un antígeno**.

- Depende de la afinidad exclusiva que muestran los anticuerpos por sus **epitopes: "la especificidad"**
- Se consigue aportar certeza sobre la **presencia o ausencia** de un antígeno.

De la variedad de técnicas de demostración de antígenos, arribaremos aquí las técnicas inmunoenzimáticas, las cuales se aplican en la actualidad generalmente sobre tejidos fijados químicamente e incluidos en parafina.

Definición de antígeno, factores que alteran su estructura, preservación de la antigenicidad:

La definición clásica de antígeno es:

"Toda aquella sustancia que inoculada a un animal, es capaz de generar una respuesta inmunológica, con expresión humoral (síntesis de anticuerpos o inmunoglobulinas) y/o celular (células inmunológicamente competentes)." Los haptenos, son sustancias capaces de reaccionar con un anticuerpo, pero no de inducir su síntesis.

En nuestro caso, los "antígenos" a demostrar serán proteínas. Sus moléculas poseen:

- Una **estructura primaria**, dada por la cantidad, tipo y secuencia amino-ácida y a la ubicación de los enlaces disulfuro.
- Una **relación espacial**, dada por las relaciones de los aminoácidos colocados junto a una estructura primaria, **que determinan la estructura secundaria**.
- El ordenamiento global y la interrelación de las diversas regiones y de los residuos aminoácidos, conforman su **estructura terciaria**, dada por sucesivos plegamientos de la cadena polipeptídica por uniones electroestáticas, puentes de hidrógeno, puentes de sulfuro, fuerzas de van der Waals y aminoácidos hidrofóbicos.
- La **estructura cuaternaria**, está constituida por dos o más cadenas polipeptídicas, unidas por fuerzas distintas a los enlaces covalentes. (Por ejemplo enlaces de hidrógeno, electrostáticos, uniones iónicas).

Al comportarse como antígenos, estas sustancias no presentan una reactividad homogénea con el anticuerpo, sino más bien, sólo partes muy específicas de la molécula son las responsables de unirse a un anticuerpo determinado. Son los denominados **epitopes o determinantes antigénicos** y están relacionados con su estructura química y espacial.

Dicho de otra manera podemos definir a los **determinantes antigénicos o epitopes como zonas relacionadas con la estructura química y espacial de una proteína (nuestro antígeno) responsables de la afinidad con el anticuerpo**.

Las fuerzas comparativamente débiles encargadas de mantener la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, son alteradas con relativa facilidad, con la consecuente pérdida de actividad biológica.

Desnaturalización de las proteínas

- ش Por acción de diversos agentes, *las proteínas pueden alterarse y perder su estructura terciaria y aún la secundaria, quedando solamente la cadena polipeptídica.*
- ش Este fenómeno se denomina **desnaturalización**; por ésta causa, la proteína pierde también su actividad biológica.
- ش El fenómeno en algunos casos es reversible y en otros irreversible.
- ش En forma física, la desnaturalización puede observarse como una conformación aleatoria de una cadena polipeptídica sin que se afecte su estructura primaria.
- ش Es importante resaltar que, si bien en la fijación una proteína pierde su conformación espacial, de no existir destrucción parcial o total de la cadena, la estructura primaria se conserva.
- ش Lo que con frecuencia puede ocurrir, es que la conformación espacial se vea alterada en grados variables. Entonces los determinantes antigénicos pueden quedar "**ocultos**" a las zonas de unión o **paratopes** del anticuerpo.
- ش Mientras que algunos determinantes antigénicos, resisten en forma suficiente la fijación e inclusión, reaccionando fácilmente con los anticuerpos específicos, la mayoría pierde en mayor o menor

medida su reactividad inmunológica después de la fijación, procesado e inclusión y presentan cierta dificultad para unirse a sus anticuerpos específicos. ⁽¹⁾

ش Los métodos que apuntan a reconformar los **epitopes** para su reconocimiento, se engloban en lo que se denomina: “**reconversión antigénica**”. ⁽²⁾

Algunos factores que desnaturalizan las proteínas son:

a) **Físicos** - por ejemplo el calor por arriba de 37°, las radiaciones, los ultrasonidos, etc.;

b) **Químicos**- por la acción de ciertos reactivos como:

- Ácidos fuertes, que las coagulan irreversiblemente, como el nítrico y el clorhídrico.
- Ácidos que inducen cambios coloidales en las moléculas proteicas precipitándolas por disminución del pH, como el acético, tricloroacético, crómico, etc.
- Disolventes orgánicos, como los alcoholes, acetona, intermediarios.
- Sales de metales pesados, con las que las proteínas forman sales complejas, como el cloruro de mercurio, dicromato de potasio o ácido pícrico.
- Sales neutras, como el sulfato de amonio, cloruro de sodio, etc.
- pH extremos, menores de 3 o mayores de 10.

✦ Por acción de diversos agentes las proteínas pueden alterarse y perder su estructura terciaria o cuaternaria. Ya hemos visto que este fenómeno se denomina **desnaturalización**, por ésta causa la proteína pierde en grado variable su actividad biológica y su inmunorreactividad. El fenómeno en algunos casos es reversible y en otros es **IRREVERSIBLE**.

En el diagrama 1 se encuentran representados los agentes desnaturalizantes de uso común en la técnica histológica:

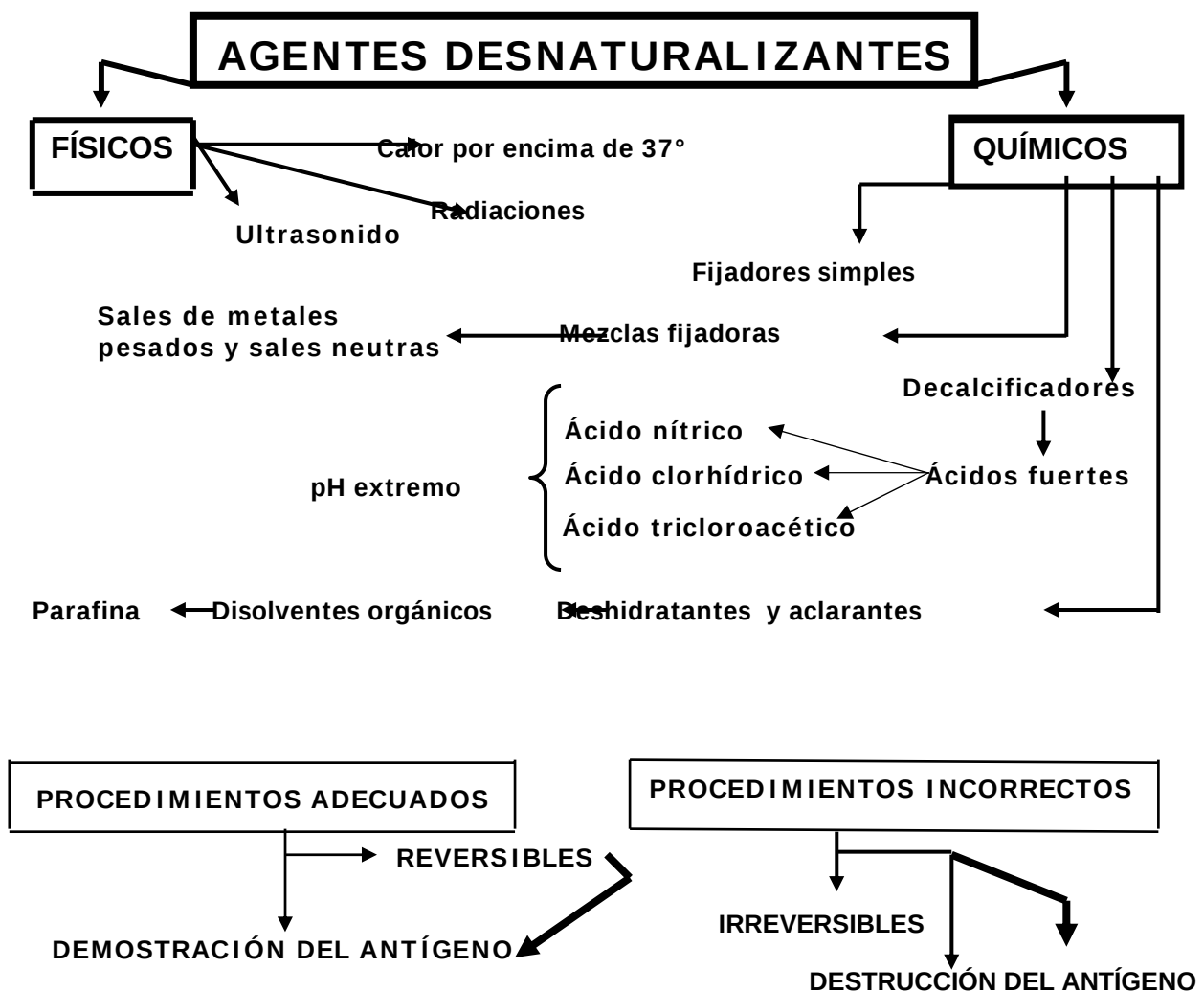


Diagrama 1

- ✦ Los fenómenos irreversibles de desnaturalización provocan una total pérdida de la actividad biológica.
- ✦ Si bien el proceso de fijación para microscopía óptica, altera la estructura terciaria y cuaternaria de una proteína, difícilmente altera la estructura secundaria mientras que la primaria se mantiene conservada, por lo tanto, los fenómenos de desnaturalización causados, son generalmente reversibles.
- ✦ Es FUNDAMENTAL que en los procedimientos histológicos de fijación histológica o citológica, NO SE PROVOQUE UNA DESNATURALIZACIÓN IRREVERSIBLE QUE DAÑE LA INMUNORREACTIVIDAD ANTIGÉNICA.
- ✦ La impericia en el tratamiento de las muestras, puede provocar un daño irreparable en la demostración del antígeno.

Factores que pueden influenciar en el resultado de una inmunomarcación:

- La fijación
- El procesamiento de la muestra
- La naturaleza del antígeno
- Su concentración en la muestra
- Su distribución (nuclear, citoplasmática, relacionado a membranas, sean citoplasmáticas o nucleares, o extracelular).

EFFECTOS DE LA FIJACIÓN, DECALCIFICACIÓN, PROCESADO E INCLUSIÓN SOBRE LOS ANTÍGENOS

- ✦ En toda técnica de inmunomarcación, es de vital importancia, preservar el antígeno a demostrar.
- ✦ La fijación tejido o material en estudio, dependerá de la labilidad y concentración del antígeno en la muestra.
- ✦ Como frecuentemente desconocemos a priori estos parámetros, debemos seguir métodos adecuados tanto de fijación como de decalcificación, procesado e inclusión.

Como se puede observar en el Diagrama 2, el punto crucial entre los factores que influyen el desarrollo final del procedimiento inmunohistoquímico es el proceso de fijación. ⁽³⁾

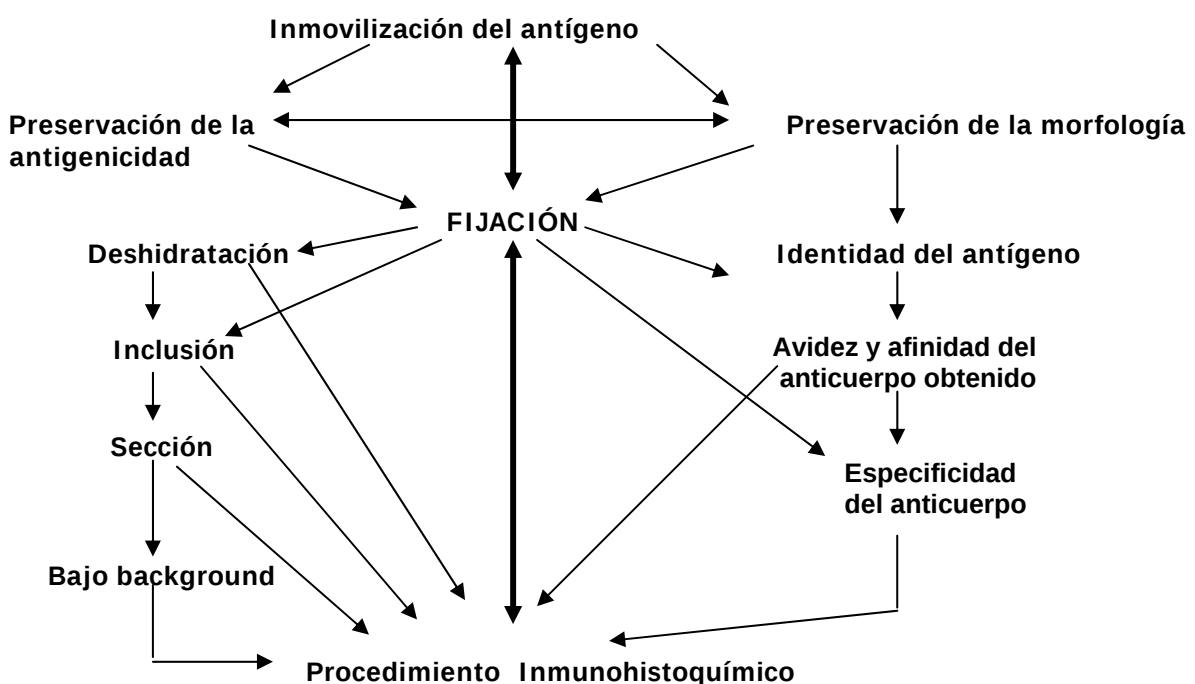


Diagrama 2

Para tener éxito en el mismo es obvia la necesidad de conocer cada uno de dichos factores. Sin embargo, debido a que la tinción inmunohistoquímica es el resultado de un complejo set de interrelaciones entre los factores (representados por flechas), la exacta contribución de cada factor individual no puede determinarse. La **fijación** en el centro del diagrama indica la gran importancia de la misma dentro de estas relaciones mutuas. ⁽⁴⁾

A continuación desarrollaremos aquí algunos conceptos y fundamentos de estos procedimientos, aplicados a la conservación apropiada del antígeno.

EFFECTOS DE LA FIJACIÓN SOBRE LOS ANTÍGENOS

Principios generales de la fijación:

- ✦ No existe un método universal de fijación, o lo que es lo mismo, un agente fijador adecuado para un tejido, puede no serlo para otro.
- ✦ No todos los fijadores conservan indefinidamente el tejido, ya que la fijación no equivale a conservación tisular.
- ✦ **UN DEFECTO DE FIJACIÓN JAMÁS PUEDE SER CORREGIDO.**
- ✦ Es inútil realizar cualquier estudio histológico sobre un material con graves defectos de fijación.

Fijación con formaldehído:

El extendido uso del formol como fijador de rutina se debe a su fácil elaboración, bajo costo y excelente preservación de la morfología.

Aunque el mecanismo de la fijación con formol no se puede asegurar con exactitud, se cree que el formaldehído forma complejos con la mayor parte de las macromoléculas tisulares. Su grupo aldehído (doble unión al oxígeno), se une a un único átomo de carbono. Esta unión es muy inestable (posee una alta energía) y se tratará de unir a otros grupos para disminuir la energía. Específicamente el formaldehído se une a sitios que contienen átomos de hidrógenos reactivos, como las aminas, amidas, hidroxilos, péptidos, sulfhidrilos, anillos aromáticos de aminoácidos, azúcares, grasas y posiblemente carboxilos. Todos estos componentes se hallan en las principales biomoléculas de la célula y de la matriz extracelular.

La fijación con formaldehído produce **“uniones cruzadas” mediante puentes metilénos** entre las biomoléculas como proteínas, péptidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Produce un anclaje de las estructuras dentro de la célula (membrana nuclear, cromatina, membrana plasmática, organelas principalmente el citoesqueleto) y de las fibras de la matriz extracelular. De esta manera mantiene la forma de la célula, la unión entre células y la unión y estabilidad de la matriz extracelular.

El efecto de fijación denominado **“cross-linking”**, (uniones o enlaces “cruzados” que se producen entre la molécula del fijador y la de las proteínas u otras biomoléculas), consigue su efecto de **“fijar”**, pero debemos tener en cuenta que durante la reacción de fijación las biomoléculas pueden **perder su conformación espacial o quedar enmascaradas o escondidas**. Puede ocurrir entonces, que los determinantes antigénicos, queden **“ocultos”**, impidiendo el reconocimiento del anticuerpo específico. En éstos casos, para revertir el efecto **“cross-linking”** del fijador, se realizarán métodos de reconversión antigénica.

El formol no altera la estructura secundaria ni primaria de las proteínas, pero sí la terciaria y cuaternaria. En muchos casos en donde el *epitope es conformacional* (3D) altera la región antigénica o la enmascara. En los casos donde el *epitope es lineal* (secuencia lineal de aminoácidos) puede enmascarar la región antigénica. Por lo tanto para ambos casos se necesita la recuperación antigénica.

El formaldehído penetra con relativa lentitud. Al principio, la cantidad de formaldehído es escasa, pero a medida que se une **covalentemente** a las proteínas, se produce mas formaldehído a partir de la solución fijadora, continuando la fijación. De ahí que una correcta fijación lleve su tiempo, según el tamaño de la muestra y de la temperatura. El grado de penetración del fijador establecerá un tiempo mínimo (de 4 a 24 hs. estándar, para biopsias, 48 hs. o más para piezas enteras).

Los tejidos fijados en formol por 24 a 48 hs adquieren numerosas uniones cruzadas y otras uniones que no son alteradas con los subsecuentes pasos de la técnica histológica. En contraste, si la muestra es grande,

(resecciones quirúrgicas, órganos completos, etc.,) los tejidos fijados por menor tiempo (4 a 24 hs), son alterados luego por los pasos de la técnica histológica, por ejemplo las proteínas o los ácidos nucleicos son desnaturalizados por el alcohol, o el calor de la estufa.

En consecuencia de lo expuesto, **el tiempo de fijación será directamente proporcional al tamaño de la muestra.**

La cantidad de uniones cruzadas dependerá de la concentración, pH, temperatura y tiempo de acción del fijador. Algunos autores señalan que el formol ácido (pH aproximado 4), produce fuertes uniones cruzadas a diferencia del formol bufferado neutro o básico. También indican (dando lugar a la polémica), que la fijación con formol bufferado inactiva más grupos reactivos que el formol ácido, pudiendo producir un mayor enmascaramiento de grupos antigénicos.

El formol a temperatura ambiente penetra 5 mm por cada 4 horas, aproximadamente. Si elevamos la temperatura a 37°C, acortaremos los tiempos de penetración del fijador. Puede reducirse el tiempo, si la fijación se realiza a baja presión dentro de equipos automáticos de procesamiento de muestras. El microondas puede utilizarse para aumentar la difusión y reacción química del fijador. En cualquier caso se debe tener en cuenta que una rápida fijación de la superficie externa de la pieza, produce una lentitud en la penetración del fijador determinando una mala fijación del centro de la muestra. Por lo tanto es aconsejable si se ha de usar microondas, colocar las muestras por inmersión en el fijador a temperatura ambiente por unas horas y luego colocar los bloques en microondas durante 7 a 10 minutos a bajas potencias (potencia 3 a 4 como máximo) y a temperaturas que no excedan los 40° a 50°C. **Sin embargo en base a nuestra experiencia, la utilización del horno microondas para la fijación y procesamiento de biopsias quedará circunscripta a técnicos altamente calificados en éstos procedimientos.**⁽⁵⁾ El peligro de un calentamiento fuerte que destruya los sitios antigénicos es irreversible; en la creencia de un procedimiento rápido para el diagnóstico, podemos alterar una muestra de tal manera, que su demostración inmunohistoquímica sea inviable.

Una fijación prolongada puede producir un decremento en el reconocimiento de los determinantes antigénicos. A mayor cantidad de uniones cruzadas entre proteínas adyacentes, aumenta la trama química y también se cubren los sitios antigénicos. Lo ideal es que se conozca el tiempo que lleva la muestra en formol. Las muestras no deben superar el espesor de 5 mm y la cantidad de fijador debe ser igual o mayor a 10 partes por 1 de muestra.

Se pueden utilizar también mezclas fijadoras mixtas es decir, precipitantes y formadoras de uniones cruzadas a la vez, como el Bouin o el Zamboni que llevan ácido pícrico (precipitante) y formol (formador de uniones cruzadas).

Otros fijadores utilizados comúnmente:

Fijadores por deshidratación tisular:

Todos éstos fijadores son sustancias altamente higroscópicas que liberan el agua libre y la ligada a moléculas. Los fijadores alcohólicos como el metanol, el etanol, la acetona y el cloroformo, son considerados fijadores precipitantes ya que desnaturalizan las proteínas destruyendo los puentes hidrofóbicos que mantienen la estructura terciaria (tridimensional) de la molécula proteica. La estructura primaria y secundaria se mantiene intacta y si la secuencia aminoacídica es la que actúa como antígeno (*epitope lineal*), son fijadores ideales⁽⁶⁾. La acetona, el etanol 100° y el metanol son poco penetrantes y endurecen los tejidos, se los utiliza generalmente para frotis o secciones de criostato. Sin embargo todos los fijadores alcohólicos tienen un pH neutro, lo que constituye una gran ventaja en éste tipo de técnicas. En particular la acetona altera muy poco la estructura antigénica, es altamente recomendable para la fijación de frotis hematológicos. Si el antígeno se halla en péptidos de menor tamaño, conviene utilizar fijadores que produzcan uniones cruzadas ya que éstas evitan la difusión del péptido.

Dentro de éste grupo de fijadores, se encuentra el alcohol 96° que es el más utilizado en extendidos citológicos. Algo a tener en cuenta cuando utilizamos éste fijador, es justamente que destruye los puentes hidrofóbicos. Si el epitope es conformacional puede alterar o enmascarar la región antigénica. Existen técnicas modificadas de reconversión antigénica que apuntan a reconformar estos epitopes alterados por la fijación con 96°. En cuanto al cloroformo que puede ser utilizado en mezclas fijadoras o como líquido intermediario en la inclusión con parafina, también tiene una aplicación de reconformación de epitopes en extendidos. Sobre estos compuestos, ampliaremos más conceptos en la sección de inmunohistoquímica en citología.

Glutaraldehído:

Este fijador forma más uniones cruzadas que el formaldehído, causando desnaturalización de las proteínas por alteración de la estructura alfa hélice, por ese motivo, no se lo usa en inmunohistoquímica. Sin embargo, fija rápidamente y junto al tetróxido de osmio son los fijadores por excelencia para microscopía electrónica.

Un aspecto a tener en cuenta con respecto a éste fijador es la fijación primaria en la que se lo utiliza, para técnicas aplicadas a patologías de nervio periférico. A mayor exposición a la acción del glutaraldehído, menor será la posibilidad de demostrar antígenos, ya que produce gran cantidad de enlaces por puente metileno y la reconversión antigénica resulta dificultosa.

Recomendamos que si se han de requerir estudios de inmunohistoquímica sobre éste tipo de patologías, nos asesorem con técnicos altamente calificados y especializados en éstas técnicas ⁽⁷⁾

Mezclas fijadoras a base de ácido pícrico:

Bouin:

Este fijador es conocido por penetrar rápidamente y causar una leve contracción en los tejidos. Contiene ácido pícrico, formol y ácido acético, los cuales precipitan las proteínas, coagulándolas, que se combinan para formar picratos y también producen uniones salinas intermoleculares. Es un excelente fijador estructural que conserva la composición proteica de los tejidos convenientemente, por tanto, si se lo usa adecuadamente, de buena aplicación para técnicas de inmunohistoquímica. Es el fijador de elección (junto al formol tamponado) para médula ósea en nuestro medio. Además por su poder decalcificador, es frecuente utilizarlo para descalcificación de hueso esponjoso, en estos casos deberemos tomar delicados recaudos. (Ver indicaciones en la siguiente página).

Utilización del Bouin como fijador:

- ✦ *Tiempo de fijación: 4 a 24 hs como máximo, según el tamaño de la pieza.*
- ✦ *Lavados abundantes en alcohol 70° hasta la decoloración total de la muestra, para asegurar la eliminación completa de ácido pícrico.*

Desafortunadamente, por ignorancia, empecinamiento o franca negligencia, en muchos casos no se siguen los procedimientos básicos de fijación en mezclas que contengan ácido pícrico.

Lo que en varias oportunidades suele ocurrir en los laboratorios donde se utiliza el líquido de BOUIN, es lo siguiente:

- ⊗ *Excederse en el tiempo máximo de fijación al usarlo como decalcificador, tornando a la muestra extremadamente quebradiza al corte, provocando una severa distorsión morfológica Y UN DECREMENTO DE LA INMUNOREACTIVIDAD.*
- ⊗ *Lavar en agua antes del procesado provocando fenómenos osmóticos que alteran la inmunorreactividad y la morfología tisular.*
- ⊗ *Dejar restos de ácido pícrico en los lavados postfijación, provocando una acción continua del ácido que perdura en el tiempo, aún en la muestra ya incluida en parafina.*

Indicaciones en la utilización del líquido de BOUIN:

- ☺ **Es uno de los mejores fijadores para la conservación proteica, si lo usamos correctamente, arribaremos a resultados óptimos.**
- ☺ **Respetemos a nuestros próceres de la técnica histológica, que han fundamentado sobradamente, las ventajas y desventajas en la utilización del ácido pícrico.**
- ☺ **Cuando usamos líquido de Bouin, sigamos los procedimientos adecuados de fijación y postfijación.**
- ☺ **Si por razones ajenas a nuestra voluntad, conciencia y criterio técnico debemos decalcificar en Bouin, controlemos la descalcificación al menor tiempo posible de exposición al ácido pícrico.**

- ☹ **Lavemos abundantemente en alcohol 70° u 80° hasta la decoloración total de la muestra, antes de colocarlo en alcohol 96° para su posterior procesado.**
- ☹ ***Jamás se nos ocurra cometer la imprudencia de enjuagar en agua, concluida la fijación.***

Otras mezclas a base de ácido pícrico son el fijador de **Bouin- Hollander** que contiene acetato de cobre, utilizado también como decalcificador en hueso esponjoso y el fijador de **Duboscq Brasil (Bouin alcohólico)**, empleado en punciones renales. Las mismas recomendaciones descriptas para el Bouin corresponden para éstas mezclas.

Mezclas fijadoras a base de cloruro de mercurio:

El cloruro de mercurio (sublimado, bicloruro de mercurio) así como otras sales de mercurio fueron comunes fijadores histológicos en el pasado. Penetra rápidamente y precipita todas las proteínas, reaccionando con un número de residuos aminoácidos, incluidos los grupos tiol, amino, imidazol, fosfato e hidroxilo. Los cristales de mercurio depositados en el tejido, necesitan ser removidos antes de continuar la técnica histológica. El cloruro de mercurio está contenido en mezclas como el Zenker, Helly, Ridley y la solución de B 5.

Mezclas fijadoras a base de metales pesados:

Sales de metal como sales de zinc pueden ser potentes precipitantes proteicos, formando complejos insolubles con los polipéptidos.

La solución de Zinc formalina ha sido propuesta por algunos autores como un fijador de preservación antigénica para mejorar los resultados de una inmunotinción. Otra mezcla fijadora propuesta es el fijador de Fish (descubierto por F.Blum, Alemania 1893), a base de cloruro de zinc, formalina y agua.

Fijadores para inmunohistoquímica:

Los mejores para las técnicas de inmunohistoquímicas son los que contengan en su composición formol, o mezclas fijadoras con formol (Zenker, B5, formol con sales de zinc, etc.). También se usa frecuentemente Bouin, que por regla general, no provoca una desnaturalización irreversible de las muestras. Otro fijador utilizado, buen preservador de cantidad de antígenos, pero de penetración más lenta que el formol, es el etanol 96°, que se utiliza usualmente en citología. Para tejidos, el etanol solo, produce generalmente una retracción y distorsión de la morfología. Puede usarse con mejores resultados morfológicos y antigénicos en mezclas fijadoras, o bajo una fijación en frío que es la base del método de Sainte- Marie, indicado especialmente para la demostración de algunos antígenos. Cada uno de éstos fijadores, tiene un poder de penetración distinto. Un buen fijador, debe brindar el mejor detalle morfológico, en un tiempo de fijación lo más breve posible.

El cuadro 1 que se representa a continuación, está basado en una modificación de guías de Taylor, Battifora y otros autores, sobre la base de la experiencia de nuestro Laboratorio:

Preservación de la inmunorreactividad:

Calidad de preservación	Fijador
Buena	Formol neutro, B5, Fish, Zinc Formol, Bouin, Alcoholes
Intermedia	Formol pH ácido, Bouin usado como decalcificador, Duboscq-Brasil, Zenker, Helly, Zamboni
Mala	Fijadores oxidantes, dicromatos, permanganatos ácidos.

Cuadro 1

pH de fijación:

En general, la mayor preservación morfológica y antigénica, se obtiene usando fijadores a pH neutro o fisiológico. A pH ácido, la antigenicidad puede verse afectada según el fijador. Por debajo de pH 3, la

antigenicidad de las moléculas puede perderse, probablemente como resultado de la desnaturalización de la estructura secundaria.

Temperatura:

Dentro de los límites indicados, la temperatura de fijación, no es probablemente crítica. Para la mejor preservación de la morfología y antigenicidad, la fijación a temperatura ambiente o en frío, es aún el método indicado. De cualquier manera, la temperatura de fijación no debe exceder los 30°C/ 37°C, siendo ya crítica a los 42°C. De fijar una muestra a éstas temperaturas, se tendrá especial cuidado en el tiempo.

DECALCIFICACIÓN ADECUADA EN INMUNOHISTOQUÍMICA:

La elección de un agente decalcificador depende de la dureza de la muestra a decalcificar y de los estudios posteriores que se deben realizar. Siempre se tendrá en cuenta que si se decalcifica excesivamente, se destruirán los componentes tisulares y no se arribará a un diagnóstico apropiado, más aún si se requieren estudios posteriores de inmunohistoquímica.

Ácido nítrico:

El ácido nítrico es el agente más rápido y eficaz, sin embargo utilizado en altas concentraciones (superiores al 6%), tiende a producir gran destrucción tisular, además de interferir en forma perniciosa en la demostración antigénica. Varios autores antes del advenimiento de la inmunohistoquímica proponían concentraciones acuosas del 7 al 7.5 %, indicando detalladamente el método de neutralización post-descalcificación.

En este punto citamos a García del Moral (1993):

- ✦ Formula utilizarlo al 5% en solución acuosa y observa: *"En caso de que la solución sea alcohólica, la proporción de ácido nítrico debe ser del 7.5%. Tiempo medio de decalcificación para un bloque óseo de 5 mm de espesor de 12 a 24 hs".*

Basándonos en nuestras indagaciones, los problemas de reconocimiento del antígeno en una muestra tratada con ácido nítrico se sustentan en las siguientes razones:

- ⊗ Es frecuentemente usado para decalcificar cabeza femoral, pero en forma incorrecta.
- ⊗ No se tiene en cuenta que el hueso esponjoso es extremadamente lábil a ácidos tan fuertes.
- ⊗ Se prefiere insistir en la decalcificación del hueso compacto, para facilitar los cortes.
- ⊗ Se lo utiliza en soluciones acuosas de concentraciones altas.
- ⊗ El espesor de bloque no es el indicado, sea por insuficiente pericia al pasar la sierra por el residente y/o anatomopatólogo, sea por adjudicar la tarea a personal no competente para éste procedimiento.
- ⊗ Debido al excesivo espesor, el tiempo de exposición supera ampliamente al máximo permitible.
- ⊗ La suspensión de la muestra en una gasa para decantar los depósitos cálcicos y evitar la saturación del líquido decalcificador, no se respeta.
- ⊗ No se agita ni se cambia la solución decalcificadora para acelerar el proceso.
- ⊗ Se reemplaza el proceso de aceleración por un calentamiento de la muestra por encima de los 30°C,
HORRORES DE PROCEDIMIENTO QUE TERMINAN ARRUINÁNDOLA.
- ⊗ La neutralización del ácido es escasa o NULA.
- ⊗ **ETC, ETC,ETC,..**

Pero entonces, ustedes se preguntarán, si el ácido nítrico es lo peor que existe en el planeta tierra para decalcificar... ¿No?

ES BUENO, PERO PELIGROSO. HAY QUE SABER UTILIZARLO:

- ☞ Es fuerte, potente y rápido, (suficientemente acelerado de por sí, como para que nosotros lo aceleremos aún más).

- Se puede utilizar en hueso compacto pero si existe hueso esponjoso en la muestra, no superemos porcentajes inadecuados. Recomendamos el 6% a 7% como máximo en soluciones acuosas.
- El tiempo de decalcificación es directamente proporcional al espesor de la muestra.
- La suspensión de la muestra es altamente recomendable, aunque en algunos casos la pericia del operador (anatomopatólogos o residentes o técnicos entrenados en macroscopía patológica), permite un espesor tan fino que a las pocas horas se completó la decalcificación.
- **Respetemos el tiempo del proceso anterior “la fijación”, que en varias circunstancias, dependiendo del tamaño de la pieza, DEBE ser larga, aunque se produzcan muchos enlaces covalentes.**
- **El proceso de decalcificación con ácido nítrico es lo suficientemente agresivo, como para superar los efectos causados por la alteración de las estructuras proteicas del formaldehído, entonces completemos la fijación antes de iniciar la decalcificación.**
- **En éstos casos, el histotécnico a cargo de la fijación de piezas óseas de gran tamaño debe “REGISTRAR” la fecha de inicio y finalización del tiempo de fijación, facilitando así, los métodos de reconversión antigénica que correspondan.**

Ácido clorhídrico:

El ácido clorhídrico si bien no es tan rápido como el nítrico, produce menor agresión tisular y empleado en mezclas decalcificantes, puede acelerar el proceso, sin alterar demasiado las demostraciones inmunohistoquímicas. ⁽⁸⁾

Ácidos débiles:

Los ácidos débiles como el fórmico, producen escasos artefactos tisulares e interfieren poco en los resultados finales de la inmunomarcación. Como actúan lentamente, requieren la renovación frecuente del líquido decalcificador. Se puede combinar las ventajas de ácidos débiles y fuertes en mezclas decalcificantes tales como fórmico-clorhídrico, para adquirir rapidez, morfología e inmunorreactividad adecuada.

El proceso de fijación:

Como ya hemos expuesto anteriormente, para disminuir en lo posible las alteraciones del agente decalcificador, la fijación de la muestra debe haberse completado, antes de iniciar el proceso. Los fijadores que contienen dicromato de potasio, bicloruro de mercurio (B-5, Zenker, Helly) o formaldehído tamponado, mejoran notablemente el procedimiento de decalcificación, aceleran el proceso, reducen la hinchazón del colágeno, del estroma y de la matriz ósea. Cuando el tejido óseo está infiltrado por tumor, se deben separar las partes blandas para su procesamiento rutinario y las partes óseas para el proceso de decalcificación.

Temperatura de decalcificación:

Al igual que para el proceso de fijación, las temperaturas elevadas, por encima de 37° C, producen alteraciones tisulares. A los 60°C la maceración es máxima. Para evitar éstos procedimientos irreversibles, es conveniente tratar las muestras a temperatura ambiente con una agitación suave manual o mecánica que acelera el proceso decalcificador.

Post- tratamiento del tejido:

Después del proceso de decalcificación en el que se han empleado ácidos, el exceso de éstos últimos deberá ser eliminado mediante lavados en soluciones neutralizantes. Cada decalcificador requiere de un protocolo específico de tratado posterior. Es fundamental seguirlo, puesto que la inmunomarcación de tejidos decalcificados puede ser interferida por un exceso residual de los ácidos empleados. Un pretratamiento de los cortes en solución acuosa de carbonato de litio al 1% mejora la neutralización.

Los decalcificadores más usados en nuestro medio, para una adecuada conservación antigénica son:

1. EDTA
2. Ácido fórmico
3. Ácido fórmico - clorhídrico
4. Soluciones fijadoras con poder decalcificante que contengan pícrico (Bouin, Bouin Hollande, otras) con ciertas reservas:
 - a) Un máximo recomendable de exposición de no más de 24 horas.

- b) Solo aplicable para cilindros pequeños con poco hueso compacto.
- c) Lavar rigurosamente hasta desprendimiento total del color, para cortar la acción del ácido pícrico.

De los descalcificadores y mezclas descalcificantes anteriormente detallados, es sin lugar a dudas el EDTA el de preferencia para la aplicación de técnicas inmunohistoquímica. No siempre puede utilizarse, depende como ya mencionamos de la dureza del tejido y si se conoce, (por los datos e historia clínica del paciente). que serán necesarias técnicas inmunohistoquímicas.

Ex profeso, el ácido nítrico no ha sido mencionado, por la sencilla razón que es el menos indicado para éstas técnicas. No obstante, si requiere ser utilizado, insistimos en las recomendaciones explicitadas anteriormente, posibilitando la viabilidad de demostración antigénica. Su utilización deberá ser consultada a expertos en este tipo de procedimientos (9-10).

Decalcificación de Médula Ósea:

Estas biopsias se obtienen por punción aspiración (de 1 a 2 cm. de longitud) y frecuentemente se realizan improntas o extendidos que son utilizados en hematología.

En el caso del tratamiento de las biopsias de médula ósea, es imprescindible la combinación de una fijación y decalcificación adecuada. Si bien en la literatura encontraremos variados procedimientos, en nuestro medio se plantean controversias en cuanto a la fijación y decalcificación ideal. Sin embargo, varios autores coinciden que lo más importante en éstos procedimientos, será la conservación morfológica y bioquímica de la estructura linfóide, lo más adecuada posible para la demostración de antígenos tisulares.

Los artefactos de extracción del material, del proceso de fijación y/o de decalcificación, pueden tornarse irreversibles para su estudio histopatológico.

En nuestra experiencia, el procedimiento ideal para médula ósea se obtiene con una fijación en Bouin (máximo 4 hs) seguida de una decalcificación en EDTA.⁽¹¹⁾

El Bouin es un excelente fijador con cierto poder decalcificador. Por eso es que frecuentemente se lo utiliza en nuestro medio como fijador-decalcificador. Sin embargo como agente decalcificador, debe someterse la muestra a un tiempo de exposición generalmente mayor a las 24 hs. Este tiempo prolongado en el agente, perjudica la demostración de antígenos tisulares.

Otras combinaciones adecuadas son:

Fijación en formol tamponado – Decalcificación en EDTA

Fijación en B5 – Decalcificación en EDTA

Fijación en formol tamponado, B5 o Helly - Decalcificación en ácido fórmico-clorhídrico⁽¹²⁾

EL PROCESADO DEL TEJIDO

En general, la deshidratación e inclusión en parafina, sigue los mismos parámetros en cuanto a tiempos y temperatura de los detallados para la fijación. Tiempos cortos combinados con cambios frecuentes de solventes e intermediarios, cambios de parafina y calor que no exceda los 62°C, son ideales para conservar la morfología y la antigenicidad.

Debemos tener en cuenta que una correcta fijación implica cortar el proceso de fijado una vez transcurrido el tiempo. Si la muestra ha sido incorrectamente fijada o no se ha procedido al lavado que corresponda a cada fijador, (con el fin de detener la acción fijadora), los pasos subsecuentes de deshidratación, la seguirán fijando, extendiendo un tiempo de fijación excesivo, que puede aumentar la posibilidad de decremento de inmunorreactividad.

Uno de los problemas más comunes con los que solemos enfrentarnos los técnicos que nos especializamos en inmunohistoquímica, **es la maldita costumbre de cierta gente** (por llamarla de alguna manera), que por diversas circunstancias (todas injustificables), **procesa para el demonio (...)**. Nos expresamos así, de éste modo tan enfático, porque hay principios elementales que se supone deberíamos aprender en nuestros primeros conocimientos de la técnica histológica y que son los siguientes:

- ☹ Una vez concluida la deshidratación, debemos colocar las muestras en los agentes intermediarios, que se saturan de alcoholes con el paso del tiempo.
- ☹ La renovación de los solventes del procesado debe ser frecuente, de tal manera que esa saturación no ocurra.
- ☹ Si un intermediario o aclarante esta saturado de alcohol es muy probable que se alteren en demasía o directamente se destruyan unas cuantas sustancias dentro de la muestra, además de los antígenos que se pretenden demostrar.
- ☹ LOS ALCOHOLES “HIERVEN” A 65°C - 70 °C, AUNQUE NOSOTROS NO NOS DEMOS CUENTA, LAS POBRES BIOMOLÉCULAS SÍ (claro que en sus últimos estertores, pues las hemos mandado a otra vida)...
- ☹ Igual o peor estropicio de biomoléculas, ocurre cuando algún lúcido trasnochado pasa directamente de los alcoholes a la parafina, sea porque se equivocó de líquido en el recipiente del procesador, sea porque se olvidó de pasar por los intermediarios o aclarantes, si el procesamiento es manual.
- ☹ Desafortunadamente, no es infrecuente que se deje en manos de personal que no está capacitado, estos procedimientos que por ser muy básicos no dejan de ser a la vez muy críticos.
- ☹ Es función y responsabilidad del HISTOTÉCNICO preservar una muestra para una correcta observación microscópica. (...)
- ☹ Semejantes desaciertos no deben ocurrir, cualquiera puede equivocarse, pero si extremamos las normas básicas de registro y atención, y si cumplimos con las tareas que nos corresponden (ni más ni menos que eso), las probabilidades y variables de error desaparecen.
- ☹ Una deshidratación deficiente que no permite la salida total del agua del tejido, hace que luego de la inclusión, el taco muestre un área blanca y blanda que impide que se realicen buenos cortes⁽¹³⁾.
- ☹ Las zonas donde han quedado restos de agua, se desprenden sistemáticamente de los portaobjetos, aún de aquellos tratados con adhesivos especiales para las técnicas de inmunohistoquímica. En consecuencia con los lavados permanentes, la acción de enzimas proteolíticas o el sometimiento de los cortes al calor, las zonas desprendidas se pierden en los sucesivos pasos de la técnica y la evaluación de los resultados se torna imposible.

INCLUSIÓN EN PARAFINA Y CORTE:

La parafina es una sustancia de tipo céreo, compuesta por mezcla de hidrocarburos saturados de cadena larga, que puede obtenerse con una amplia variación en su punto de fusión. Las de uso habitual poseen una temperatura de fusión entre 54° - 58° C.

Las parafinas clásicas tienen el inconveniente de oxidarse con el paso del tiempo, adoptando una tonalidad amarillenta y consistencia más blanda.

Las de uso habitual son una mezcla de parafinas con polímeros plásticos de peso molecular controlado y otros aditivos que mejoran sus características como agente de inclusión ⁽¹⁴⁾.

En reglas generales, la parafina si bien altera la forma de las proteínas, no induce mayores cambios conformacionales que la fijación y/o el procesado. Sin embargo tenemos que volver siempre al mismo punto: si las condiciones de inclusión son inadecuadas, podemos alterar y hasta arruinar ciertos antígenos que no podremos demostrar.

Uno de los artificios más comunes que suele ocurrir cuando se realizan cortes sobre muestras mal procesadas e incluidas, es el llamado **“efecto tierra seca”**. **Se representa por la dificultad en conseguir cortes finos y homogéneos que se “agrietan como la tierra seca” al colocarlos en el agua para su estirado.**

Hasta con adecuada fijación, procesamiento perfecto y un técnico experto, un corte de tejido puede ser destruido por un defectuoso embebido, inclusión y orientación de la pieza ⁽¹⁵⁾.

Cuando en un preparado histológico aparece el EFECTO TIERRA SECA debemos hacernos las siguientes preguntas:

- ¿El tejido ha sido mal procesado?

- ¿Se controló la temperatura de la parafina?
- ¿El agua donde se estiró el corte estaba muy caliente?
- Si el tejido proviene de una congelación ¿Fue colocado inmediatamente en formol, sin descongelarlo lentamente?⁽¹⁶⁾

Control de fijación, procesado e inclusión, previos a la inmunomarcación:

En los albores del desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas, Battifora y otros autores propusieron como molécula indicadora de labilidad debida a la fijación química, la identificación de vimentina. Establecieron según sus estudios, que si la vimentina era detectable en la muestra de estudio, se podía presumir que otros antígenos podían también ser detectados. Además resultó la más indicada como control para éstas comprobaciones, ya que casi siempre cualquier tipo de muestra contiene algunas células de origen mesenquimático o endotelios, cuya reacción debe ser positiva.

Posteriormente, con el avance de la fabricación de anticuerpos para diversos antígenos muchos más lábiles que la vimentina por un lado, y con el desarrollo de sistemas de detección cada vez más sensibles por el otro, en base a nuestra experiencia, podemos testificar que la molécula de vimentina es bastante resistente a la fijación y la decalcificación.

No obstante adquirir la experiencia de estos autores, en la práctica cotidiana de nuestros laboratorios también tomamos como parámetro de efectos deletéreos la marcación con vimentina, pero en sentido inverso a lo planteado por ellos. Cuando una muestra presenta dificultades para demostrar cualquier antígeno, testeamos su preservación de la siguiente manera:

- 1) Debido a la fácil demostración de la vimentina, por ser muy resistente a los efectos de fijación, descalcificación, procesado, inclusión, corte, etc., y por ser el filamento intermedio que se encuentra en mayor cantidad en diversidad de tejidos y órganos; ante las múltiples variables de error que pueden darse en los procedimientos técnicos previos a la técnica de inmunohistoquímica, levantamos varios cortes en distintos portaobjetos, en los que colocamos uno del caso problema y un testigo en condiciones óptimas de fijación y/o decalcificación, procesado e inclusión.
- 2) Realizamos la dilución habitual de vimentina que tenemos protocolizada en nuestro laboratorio.
- 3) Inhibimos sustancias endógenas. (Ver más detalles en la sección correspondiente).
- 4) Aplicamos la reconversión antigénica habitual protocolizada en el caso que la necesite, según las indicaciones del fabricante del anticuerpo y continuamos con la técnica.
- 5) Si el anticuerpo no necesita recuperación antigénica, continuamos directamente con la técnica.
- 6) Si la vimentina del caso problema queda demostrada, es probable que otros antígenos puedan ser demostrados.
- 7) Si la vimentina del caso problema no queda demostrada, es improbable que otros antígenos puedan ser demostrados, forzando a cambiar el protocolo habitual, concentrando más el anticuerpo y utilizando métodos de rescate más agresivos.
- 8) Si la vimentina queda demostrada aplicando el procedimiento 7 en el caso problema, es probable que puedan demostrarse algunos antígenos formol resistentes, pero improbable que se demuestren otros de iguales características (formol resistentes) y altamente improbable que se demuestren antígenos más lábiles.
- 9) Si la vimentina NO QUEDA DEMOSTRADA aplicando el procedimiento 8 será inútil insistir, **todos los antígenos han quedado dañados irreparablemente.**

Pueden usarse otros controles, tales como Keratinas o factor VIII, pero la

Conclusiones:

- Las técnicas de inmunohistoquímica requieren de procedimientos adecuados y secuenciales que comienzan desde la fijación.
- Estos procedimientos deben efectuarse conciente y cabalmente por personal competente.
- La base de la demostración óptima de un antígeno determinado se sustenta en los múltiples fundamentos explicados.

Bibliografía:

- Pearse, A.: Tratado de Histoquímica teórica y aplicada – Editorial Agilar 1960
- Martin D.; Mayer, P.; Rodell, V.: BIOQUÍMICA DE HARPER 9ª edición- Editorial El Manual Moderno – México D.F. 1984
- Molinolo, A.; Fernández Alonso, G.; Meiss, R; Sens, A.: Introducción a las Técnicas de Inmunohistoquímica – Editor E.Herr – Buenos Aires 1983
- García del Moral, R: Laboratorio de Anatomía Patológica. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill - Edición 1993-
- Aldana Marcos, H.: Efectos de la fijación y sistemas de rescate antigénico: Histoinforme Año XIV Vol 1 – Mayo 2003
- Della Speranza V. Concepts in Epitope Retrieval for Immunohistochemistry. Histologic. Vol. XXXIV, No. 2, Nov. 2001.
- Tomasi, V.; Manual teórico práctico del Taller de Inmunohistoquímica aplicada. Sociedad Argentina de Histotecnología -1998
- Fraenkel-Conrat H., Olcott H.S. The reaction of formaldehyde with proteins. Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J Biol Chem.* 1948;174: 2673-2684.
- Taylor, C; Cote, R; Inmunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist – Second Edition – W.B.Saunders Company Philadelphia 1994
- Battifora, H.: – Inmunohistochemistry in tumor diagnosis, Congreso Argentino de Patología: Mar del Plata 1992
- Kelly DP, Dewar Mk, Johns RB, Shao WL, Yates JF. Cross-linking of amino acids by formaldehyde. Preparation and ¹³C NMR spectra of model compounds. In Friedman M, ed. Protein cross linking: Symposium on protein cross linking. San Francisco 1976
- Chaves, C; Elizabaraz, M.: Fijación, decalcificación y procesamiento adecuados para la conservación de antígenos tisulares. 99:100:101.: Cuadernillo de Procedimientos y Técnicas Básicas aplicadas a la Histotecnología. Sociedad Argentina de Histotecnología – San Miguel de Tucumán – Mayo de 2007 –
-
- Narvaiz, M.: Filamentos intermedios – Curso Anual de Postgrado – Facultad de Medicina de la UBA y Sociedad Argentina de Histotecnología – año 2202
- Sapia, S.: Panel Básico de Inmunomarcación. – Curso Anual de Postgrado – Facultad de Medicina de la UBA y Sociedad Argentina de Histotecnología – año 2202
- Sapia, S.; Pena, E: Histofisiología del tejido linfático y médula ósea. Sociedad Argentina de Histotecnología – 22 de agosto de 2003 -
- Narvaiz, M.: Curso de Inmunohistoquímica – Sociedad Argentina de Histotecnología – Agosto 2006
- Taylor Cr. Kledzik G. Inmunohistologic techniques in surgical pathology: A spectrum of new special stains. *Human Pathology* 1981;12:590
- Battifora H. Kopinski M: The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins: *J. Histochem Cytochem* 1986;34:1095
- Leong ASY, Milios J, Duncis CG.: Antigen preservation in microwave-irradiated tissues: a comparison with formaldehyde fixation. *J Pathology* 1988;156:275
- Shi SR, Key ME, Kalra KL.: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue section. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741
- Shi Sr, Iman A, Young L, Cote R, Taylor C.: Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies.: *J Histochem Cytochem* 1995;43:193
- Della Speranza V.: Concepts in Epitope Retrieval for Immunohistochemistry: Histologic: Vol XXXIV, N°2, nov 2001
- Taylor C.R, Shi S.R, Cote R.J.: Antigen retrieval for Immunohistochemistry: status and need for greater standardization. *Appl Immunohistochem* 1996; 4: 144-166

Referencias:

- ^{1,2}. Pozzo, N.; Camarero, C.: Introducción a las Técnicas de Inmunohistoquímica. Cuadernillo de Procedimientos y Técnicas Básicas aplicadas a la Histotecnología. 79:80 – Sociedad Argentina de Histotecnología – San Miguel de Tucumán – Mayo de 2007 –
- ^{3,4,6}. Aldana Marcos, H.: Efectos de la Fijación y Sistemas de Rescate Antigénico. 106:107 - Cuadernillo de Procedimientos y Técnicas Básicas aplicadas a la Histotecnología. Sociedad Argentina de Histotecnología – San Miguel de Tucumán – Mayo de 2007 –
- ⁵. Schultz, M.; Biondo, C.: Procesamiento en microondas y técnicas especiales en microondas: Curso Anual de Postgrado – Facultad de Medicina de la UBA y Sociedad Argentina de Histotecnología – año 2202
- ⁷. Taratuto, A.; Schultz, M.: Tratamiento de las muestras del sistema nervioso Central y del nervio periférico: Sociedad Argentina de Histotecnología – 26 y 27 de septiembre de 2003
- ⁸. González, E.: Jornadas de Histotecnología para Hueso y Médula Ósea – Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela – Facultad de Medicina - Universidad de la República – Montevideo Uruguay – 31 de julio de 2004
- ⁹. Santini Araujo, H. (consultor): Hospital General de Clínicas José de San Martín – UBA –
- ¹⁰. Orrea, S. et col: Cátedra de Anatomía Patológica. Facultad de Odontología – UBA –
- ¹¹. Narvaiz, M; Nastasi, C.: Academia Nacional de Medicina
- ¹². Visnovich, A.; Pena, M.: C.E.P.A.C.I.D.
- ^{13,14,15,16}. Aragón P.: Formas y Técnicas de Inclusión en Parafina – 19: Cuadernillo de Procedimientos y Técnicas Básicas aplicadas a la Histotecnología. Sociedad Argentina de Histotecnología – San Miguel de Tucumán – Mayo de 2007 –

Reconversión Antigénica



Introducción

Para la técnica histológica en general, es fundamental poder mantener los tejidos lo más parecido a su estado original para lo cual, la preservación de la morfología es de vital importancia. Para ello es necesario "fijarlos" en forma óptima con los tiempos adecuados en cada caso, pero a su vez, este proceso de fijación es crucial al momento de realizar técnicas de inmunohistoquímica.

Ya hemos explicado también que el procesamiento del material también es de significativa importancia para tener buenos resultados, los cambios de alcoholes, el solvente y la temperatura de la parafina, deben estar controlados para evitar la retracción tisular y que el tejido no presente esa apariencia de "achicharrado" o "tierra seca".

Desgraciadamente, en muchas oportunidades el histotécnico desconoce el tiempo de fijación y en más de una oportunidad, la concentración del formol. **Teniendo en cuenta que esos parámetros son FUNDAMENTALES**, es importante utilizar en lo posible, **casos testigo donde exista el antígeno a demostrar**, para poder corroborar que el procedimiento técnico esta bien desarrollado.

Un poco de historia

Inicialmente, se utilizaron enzimas proteolíticas para mejorar la visualización de los antígenos, a riesgo por supuesto de sobreexponer el tejido y destruir los determinantes antigénicos. El uso de estas enzimas, debe estar por demás controlado.

En 1991, la restauración de la inmunoreactividad fue reportada por Shi et al, quien utilizó soluciones conteniendo varios metales y expuestos al calor de microondas. El término de "rescate antigénico" (RA) fue utilizado por primera vez.

Las pruebas incorporando buffer citrato pH6 fueron posteriores, como así también una serie de modificaciones de los métodos de RA.

En muchos casos, algunos anticuerpos mostraron mayor intensidad de visualización, y en otros, se pusieron de manifiesto antígenos que no habían sido reactivos en material fijado en formol e incluido en parafina

Actualmente, cada anticuerpo específico, trae en su hoja de especificaciones, recomendaciones sobre el método a utilizar, pH y tiempos de exposición, pero es imprescindible estandarizar el procedimiento de acuerdo a las condiciones de cada uno de los laboratorios.

Principios del método de RA

Básicamente el método consiste en aplicar con un medio acuoso, calor a los cortes en parafina de tejido fijado en formol después de desparafinar e hidratar los mismos.

Los cortes son sumergidos en una solución de "rescate" siendo la más común la solución de buffer citrato a pH 6.

La recuperación de inmunoreactividad depende directamente del tiempo de exposición al calor, y de la temperatura alcanzada. Los métodos más comunes utilizan horno de microondas, olla a presión, vaporiera, baño térmico y en algunos casos autoclave.

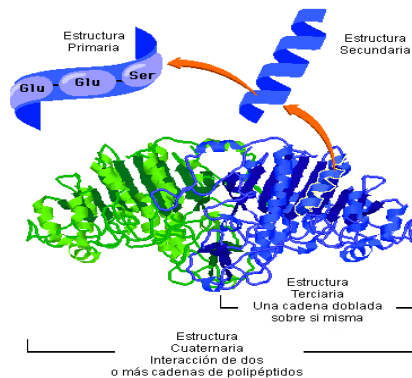
La temperatura óptima no está establecida, sin embargo, los métodos en general, llegan a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua.

Los tiempos de exposición son variables (oscilan desde los 15 a los 60 minutos), dependiendo en gran parte del tiempo de fijación que haya tenido el tejido. El enfriamiento debe ser lento y requiere aproximadamente de 20 a 30 minutos.

Pero vayamos por partes para poder comprender mejor:

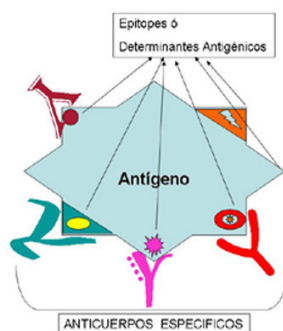
En las técnicas Inmunohistoquímicas, en general lo que vamos a poner de manifiesto son proteínas

Durante la reacción de fijación, las proteínas pueden **perder su conformación espacial**.



- ✓ Podemos encontrar las proteínas con diferente estructura: primaria, secundaria terciaria y cuaternaria
- ✓ El formol no altera la estructura secundaria ni primaria de las proteínas, pero sí la terciaria y cuaternaria.

En cada corte histológico vamos a tener diferentes ANTÍGENOS



-Un Antígeno, es generalmente una proteína.

-Está presente en el tejido y puede tener muchos "EPITOPES" diferentes (también denominados "determinantes antígenicos").

-Son los sitios donde se producirá la reacción primaria Antígeno-Anticuerpo.

-Cada Epitope se unirá a un anticuerpo específico diferente

Los determinantes antígenicos, en algunos casos, pueden ser "formol-resistentes" por lo que no presentarán dificultad al momento de realizar la IHQ. Pero en los casos donde se ven afectados por la fijación, la proteína pueden **perder su conformación espacial o quedar enmascaradas o escondidas** impidiendo el reconocimiento del anticuerpo específico, siendo necesario realizar procedimientos que nos permitan liberar esos sitios antígenicos y revertir el efecto "cross-linking".

Es de tener en cuenta también, que **no** todas las estructuras modificadas por el formol pueden recuperarse con los métodos convencionales de rescate antígeno (RA).

Es importante reiterar que la pérdida de la inmunoreactividad de un tejido, depende del tiempo de exposición al fijador y del pH del mismo, pero no son los únicos factores que lo afectarán.

Hemos visto también, que en toda técnica de inmunomarcación, la preservación del antígeno es crucial para resultados adecuados en su demostración. Los métodos de fijación, procesamiento del tejido, preparado citológico o material en estudio, influirán en la *labilidad del antígeno*.

Los métodos de "rescate o recuperación antigénica", ya sean con calor o con enzimas proteolíticas, tienen por objeto permitir al anticuerpo unirse a esas partes específicas, los epítopes, que han quedado "enmascarados", por los efectos de la fijación.

Términos utilizados para indicar que es necesario realizar este procedimiento

- Rescate Antigénico/ Antigen Retrieval
- Rescate de Epitopes/Epitope Retrieval
- Rescate de Epitopes inducido por calor/HIER
- Desenmascaramiento de antígenos/ Unmasking

Métodos de R.A que utilizan calor

- 1- Es imprescindible contar con un equipo que genere calor

Microondas.	Vaporiera
Olla a presión	Baño térmico
Olla a presión en microondas	Autoclave

- 2- Soluciones de "rescate"

- Son soluciones buffer cuya composición química, permite junto al efecto del calor, dejar liberados a los epitopes.
- Podemos trabajar con soluciones comerciales a distintos pH y/o soluciones preparadas en nuestros laboratorios a distintos pH.
- Tanto en la solución comercial como en las que preparamos nosotros, el pH que utilizaremos dependerá de las especificaciones del anticuerpo.
- Los protocolos de RA deben estandarizarse de acuerdo a las necesidades y posibilidades de cada laboratorio, y es necesario tener en cuenta algunos puntos que detallamos a continuación:

La relación temperatura (T) – tiempo (t) ES INVERSA

Esto quiere decir que, a mayor temperatura, menor es el tiempo necesario para obtener buenos resultados.

Las temperaturas superiores a los 90°C son mejores en resultado, un protocolo desarrollado a temperaturas menores, requerirá mucho más tiempo de exposición al calor.

Se cree que el desenmascaramiento de los antígenos se produce por las altas temperaturas, sin tener la necesidad que los buffer de rescate hiervan. La ebullición del buffer de rescate, tiene efectos indeseados sobre los cortes histológicos como por ejemplo el secado de los bordes del corte donde de ninguna forma podremos tener una marcación confiable.

El pH de la solución de recuperación es muy importante

Si bien en nuestra estandarización podemos utilizar buffer citrato pH6, en algunos casos puntuales donde se indique expresamente, debemos trabajar con pH alto (8 a 10), de lo contrario nuestro resultado será negativo. Generalmente a pH 8 ciertos antígenos lábiles, se demuestran sin dificultad. A mayor pH se observa una pérdida en la morfología tisular. No obstante, algunos antígenos **muy lábiles** a los efectos de la fijación requieren pH 9 y hasta pH 10, entonces la pérdida de la morfología en la observación microscópica resulta inevitable.

Infrecuentemente es necesario trabajar a pH bajo (pH 4), donde ocurre pérdida en el detalle morfológico, pero al igual que los pH muy altos (10), obligatorios para la demostración del antígeno.

Las hojas de especificaciones son una herramienta muy útil al momento de elegir la dilución óptima de un anticuerpo y el método de RA a utilizar. Si bien la elección de la fuente de calor **dependerá de nuestras posibilidades, es importante respetar el pH del buffer de rescate sugerido.**

Horno de Microondas:

Como en todo procedimiento, es importante la estandarización del método (volumen de solución de recuperación antigénica, tiempo de exposición, cantidad de preparados, potencia utilizada, etc.)

La presencia de bandeja giratoria otorga un calentado más uniforme.

Sin embargo, a pesar de ser un método rápido y eficiente, se debe tener en cuenta que no todos los microondas son iguales y que con el uso pierden su potencia. Adicionalmente los protocolos de procedimiento pueden variar según el antígeno a demostrar, por ejemplo más ciclos de microondeado para

antígenos de demostración más dificultosa. Esto puede provocar desprendimiento de los cortes y contracción tisular no deseada. Varios autores indican entonces, ciclos más cortos y repetidos a potencias que oscilan entre 5 a 8.



IMPORTANTE!!! No permitir que hierva la solución de rescate, para ello, debemos realizar pruebas de Tiempo-Temperatura y es aconsejable trabajar a "baño María" para no exponer directamente los portas en la solución de rescate a la fricción molecular

El uso de microondas acelera el tiempo de calentamiento. Sin embargo, aunque trabajemos a baño María para evitar la ebullición de la solución de recuperación, al producirse la evaporación del buffer de rescate, los cortes pueden quedar expuestos directamente a la acción de las microondas produciendo un defecto irreparable (**el corte no solo se secó, sino que también se cocinó**) y al momento de revelar, la coloración inespecífica no permitirá evaluar los resultados.

Es importante determinar el tiempo y la potencia necesarios para alcanzar la temperatura deseada. Es más efectiva la realización de varios ciclos de calentamiento que extender el calentamiento en un solo ciclo teniendo en cuenta el rellenado del coplin por la evaporación.

Con el uso, los hornos de microondas van perdiendo potencia, por lo tanto, ante la menor indicación de la pérdida de intensidad en la visualización de los resultados, deberemos re-estandarizar nuestro protocolo

Olla a presión:

Utilizando este medio de calor, la agitación molecular se produce por presión atmosférica, la excesiva exposición a ambos factores (calor-presión) puede alterar la morfología de tejidos con colágeno y elastina como la piel.

Es recomendable también en el uso de olla a presión, trabajar con buena cantidad de buffer de rescate si se colocan los portaobjetos directamente en las canastas de coloración. En caso de trabajar con coplin, se aconseja hacerlo en baño maría teniendo especial cuidado que el volumen del agua agregada no haga volcar los coplin



La diferencia existente entre los efectos del tratamiento con *buffers* en microondas y con la olla a presión, es que en el primero "la agitación molecular", se produce por una radiación electromagnética, con alta frecuencia de oscilación y corta longitud de onda, mientras que en la segunda, la agitación molecular se produce por presión atmosférica. Se pueden combinar ambos efectos físicos (microondas-presión), para obtener con mejores resultados el "desenmascarado", de algunos epitopes de difícil demostración.

Vaporiera - Baño Termostatzado



Según nuestra experiencia, el uso de estas dos fuentes de calor, son mejores en cuanto a que es menos factible que ocurran artefactos técnicos, la temperatura es controlada, estable, constante, los vapores ayudan a mantener la humedad y es improbable que el buffer de rescate llegue a hervir.

Al iniciar la estandarización del protocolo, pudimos verificar que a los 30 minutos, el buffer llega a los 95°C aproximadamente. Lógicamente al colocar los portaobjetos, la temperatura disminuye, y son necesarios unos 45 minutos para que el RA se lleve a cabo.

Este procedimiento es más lento que el microondas, pero más confiable.

Rescate antigénico con Enzimas proteolíticas

El uso de enzimas proteolíticas, tiene por objeto CORTAR, la cadena polipeptídica enrollada en forma aleatoria por el efecto cross linking durante la fijación.

De esta forma, permite que los epitopes o determinantes antigénicos, queden accesibles al anticuerpo específico.

Como paso previo a la inmunomarcación, se utilizan entonces una variedad de enzimas, entre ellas: Proteinasa K, Tripsina, Pepsina, Proteasas de varios tipos, etc., (ya sea en su forma comercial prediluida o en su extracción purificada, generalmente en polvo). Estas enzimas actúan sobre un sustrato (en éste caso sobre un antígeno), con temperatura, pH y tiempo de exposición determinados para cada una de ellas, por un lado y además por los parámetros de fijación y procesamiento utilizado para el antígeno a demostrar. Es decir cada enzima actúa sobre parámetros propios, que debemos conocer, antes de utilizarla.

El efecto proteolítico de estas enzimas, ayuda al desenmascarado de epitopes, pero también pueden producir "efectos de sobredigestión", con pérdida de la morfología. Por lo tanto es necesario la utilización de controles positivos, la optimización de la técnica, que, según varios autores depende del tiempo de fijación de la muestra, y probar distintos tiempos de exposición además de cierto y acotado margen de temperatura, ya que por lo general las enzimas pueden desnaturalizarse y perder su capacidad biológica, por arriba de los 40°C (la temperatura de exposición variará entonces entre temperatura ambiente a 37°C hasta 40°C como máximo, mientras que el tiempo de exposición varía entre cinco a veinte minutos o más).

Las enzimas más utilizadas en la actualidad son: la pepsina (digestión fuerte), la tripsina (digestión moderada) y la proteinasa K (digestión suave).

Bibliografía:

Aragón P.A. y Chaves C. Fijación y procesamiento de biopsias. Servicio de Anatomía Patológica Hospital de Clínicas José de San Martín. Servicio de Anatomía Patológica Hospital Ramos Mejía. 2002.

Chaves C. Reconversión antigénica. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Ramos Mejía. 2002

Della Speranza V. Concepts in Epitope Retrieval for Immunohistochemistry. Histologic. Vol. XXXIV, No. 2, Nov. 2001. (La mayor parte de este trabajo es traducido de este texto).

Fraenkel-Conrat H., Olcott H.S. The reaction of formaldehyde with proteins. Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J Biol Chem.* 1948;174: 2673-2684.

Morgan J.M., Navabi H., Jasani B. Role of calcium in high temperature antigen retrieval at different pH values. *J Pathol.* 1997; 182: 233-237.

Taylor C.R., Shi S-R, Cote R.J. Antigen retrieval for immunohistochemistry: status and need for greater standardization. *App/ Immunohistochem* 1996; 4: 144-166.

Aldana Marcos. H Aldana Marcos, H: "Efectos de la fijación y sistemas de rescate antigénico" Histoinforme 1: 5-8 -Sociedad Argentina de Histotecnología- Mayo 2003-

Principios básicos en las técnicas de Inmunohistoquímica

Parte II

EL ANTICUERPO



Las inmunoglobulinas o **anticuerpos**, son glicoproteínas sintetizadas en linfocitos B o en sus derivados y se fijan con notable especificidad a los sitios antigénicos de otras moléculas.

Todas las Ig constan de dos cadenas livianas (L) idénticas, y dos cadenas pesadas idénticas (H).

Cada cadena puede ser dividida en modo conceptual en **dominios** o regiones específicas con significado estructural y funcional.

La estructura de una Ig, está constituida por dos zonas de polaridad diferente: una porción Fab y una Fc. La región Fab contiene dos regiones con idéntica afinidad para su unión y reconocimiento con el antígeno y debe tener la propiedad de reconocer específicamente el antígeno que se desea demostrar. Es en ésta porción, en sus zonas hipervariables, donde se encuentran los **PARATOPES** responsables de la unión con el antígeno. La porción Fc actúa en la interacción con otros componentes del sistema inmune.

La reacción antígeno anticuerpo:

La interacción antígeno y anticuerpo se verifica en tres niveles denominados reacción primaria, secundaria y terciaria respectivamente.

La **unión primaria** es la que interesa a los fines de la inmunohistoquímica y consiste en el evento básico durante el cual se unen las moléculas del antígeno con las de anticuerpo en un proceso no visible. Como ya hemos visto, para que esta unión pueda ser visualizada, necesita de un marcador, en nuestro caso la enzima peroxidasa.

Las fuerzas comparativamente débiles responsables de mantener la estructura secundaria y terciaria de una proteína, se ven alteradas con relativa facilidad, con la consecuente pérdida de actividad biológica. Por ése motivo, con los métodos de reconversión antigénica, conseguimos reconformar de alguna manera los **epitopes** para su reconocimiento con los **paratopes** de un anticuerpo determinado dirigido contra ellos.

Así en un proceso muy delicado, en el primer paso de la técnica intrínseca cuando colocamos sobre la muestra el anticuerpo primario, se van estableciendo entre los epitopes del antígeno a demostrar y los paratopes del anticuerpo, uniones no covalentes, más lábiles (del tipo puente de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y dispersiones London).

Este proceso sutil, que hemos conseguido fuera de un organismo vivo requiere de un pH determinado que debe estar muy cercano al pH fisiológico (pH 7.4). Como las uniones que enlazan el antígeno con el anticuerpo, son del tipo **no covalente**, varios son los factores que pueden alterar éstos tipos de enlaces. Un anticuerpo puede ser altamente específico respecto al antígeno que se desea demostrar y sin embargo, ante un cambio de pH de la solución de incubación de ése anticuerpo, puede disminuir la "*sensibilidad*" del método, debido a que ante éste cambio de pH, una menor cantidad de antígeno podrá ser marcada en la muestra para inmunodetectar.

Es por eso que ustedes encontrarán en la guía para preparar soluciones los distintos buffers que se pueden preparar o conseguir en el mercado, tanto para las diluciones del anticuerpo primario como para los lavados permanentes que requiere la técnica.

El uso de detergente en los buffers de lavado, facilita la permeabilidad de las membranas y la penetración de los reactivos.

ANTISUEROS:

Se denominan así a las soluciones que contienen inmunoglobulinas de determinada especificidad, existiendo los de métodos de obtención policlonal y los de métodos de obtención monoclonal.

Los antisueros **policlonales** contienen inmunoglobulinas que fueron sintetizadas en un animal, por distintas células plasmáticas, con la consecuente proliferación de varios clones de linfocitos B, que reconocen de forma específica cada uno de sus determinantes antigénicos. El resultado es la producción de una gran

variedad de inmunoglobulinas dirigidas contra distintos determinantes, que difieren en tamaño, carga y afinidad.

Los antisueros **monoclonales** contienen inmunoglobulinas que fueron sintetizadas en un animal previamente inmunizado contra un determinado antígeno. Posteriormente se fusiona el núcleo de una célula plasmática linfocito B de ese animal con el citoplasma de un plasmocito neoplásico, obteniéndose células híbridas que sintetizan las cadenas de inmunoglobulinas codificadas como las producía la célula linfocito B normal, es decir provienen de una única célula madre. El híbrido resultante de la fusión entre la célula neoplásica (mieloma) y un linfocito B específico para un determinado antígeno, después de varias divisiones, da lugar a un clon, la totalidad de cuyos híbridos posee el mismo tipo de inmunoglobulinas. En definitiva un antisuero monoclonal es el producto de un clon único de células secretoras de inmunoglobulinas. Por ello, todas las moléculas de inmunoglobulina producidas, presentan idénticas características inmunológicas: especificidad, afinidad, carga, peso molecular, isotipo y propiedades.

Cuando trabajamos con antisueros, sean concentrados o prediluidos, debemos seguir las indicaciones del fabricante, en cuanto a la temperatura de conservación. Si han de ser congelados, conviene fraccionarlos a fin de no someter al antisuero a continuos cambios de temperatura cada vez que se va a preparar una dilución. Una vez efectuadas, las diluciones finales se pueden conservar en heladera, por un tiempo predeterminado. Si se trata de diluciones primarias, de donde luego se obtienen las finales, conviene freezerlas. Si los antisueros vienen en forma liofilizada, se siguen las indicaciones del fabricante para su reconstitución.

DEFINICIONES Y CONCEPTOS:

- **INMUNOGENICIDAD:**

Capacidad de una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo, ya sea por síntesis de inmunoglobulinas o por estimulación de células inmunológicamente competentes. La inmunogenicidad depende de la naturaleza química del antígeno. Para que una molécula sea inmunogénica debe tener la suficiente complejidad estructural, como para interactuar con los distintos componentes del sistema inmune.

1. Las moléculas de peso molecular menor de 10.000 son poco inmunógenas.
2. A mayor complejidad química, mayor inmunogenicidad.
3. Para la obtención de la respuesta inmunológica, debe existir una diferencia antigénica con el animal inoculado, de donde se obtendrá el antisuero específico, que será un animal de especie diferente al de la obtención del antígeno.

- **ANTIGENICIDAD:**

Particularidad de un antígeno que permite ser reconocido por un anticuerpo. Hemos visto ya que los antígenos demostrables pueden perder en mayor o menor medida su capacidad antigénica, debido a los procesos de desnaturalización de la fijación, y cuáles son los procedimientos para recuperar o reconvertir sus epitopes.

Los *haptenos* son moléculas *capaces de reaccionar en forma específica con un anticuerpo pero no de inducir su síntesis*, para lo cual es necesario el complejo **hapteno – proteína**.

- **ESPECIFICIDAD:**

Se define como el hecho por el cual, las inmunoglobulinas de un determinado antisuero sean capaces de unirse sólo a una sustancia (en cuyo caso se dice que ese antisuero es *específico para esa sustancia*), o por el contrario que un determinado antisuero se una a varias sustancias.

Esta última circunstancia puede ocurrir por dos razones:

- a. Que los anticuerpos estén poco purificados y existan en solución varios de ellos, dirigidos algunos, contra antígenos distintos del que se desea demostrar. (Reacción **inespecífica**).
- b. Porque distintos antígenos posean determinantes antigénicos comunes, por lo que serán reconocidos por los mismos anticuerpos. Esto es lo que denomina **reacción cruzada**, donde se obtendría una reacción específica, pero no deseada.

Criterios de Especificidad de Hairn:

- A) La marcación debe aparecer sólo en los tejidos que contengan el antígeno problema y debe estar limitada a éste antígeno.
- B) No debe producirse marcación utilizando un antisuero libre del anticuerpo específico
- C) La marcación debe inhibirse pretratando el tejido con inmunosuero específico, pero no con suero no inmune (test de bloqueo).
- D) No debe producirse marcación, si el antisuero es primero adsorbido con el antígeno, pero no debe haber diferencia si se usa un antígeno distinto.
- E) La marcación no debe aparecer cuando el antisuero es aplicado a tejidos iguales o del mismo tipo que se esté estudiando, pero libres del antígeno que se desea demostrar. (Salvo que se marquen antígenos para un determinado diagnóstico y se encuentren en el mismo tejido **controles internos** del antígeno a demostrar).

• **SENSIBILIDAD:**

Este concepto en una técnica inmunohistoquímica puede establecerse por los siguientes parámetros:

1. La cantidad mínima de antígeno que se pueda localizar, en comparación con otras técnicas: Cuanta mayor cantidad de antígeno pueda ser detectada, *mayor será la sensibilidad de la técnica.*
2. La dilución de los antisueros localizadores: Cuanto menor sea *la concentración* de antisuero necesario para marcar una cantidad fija de antígeno, o lo que es lo mismo *cuanto mayor (más alta) sea su dilución, mayor será la sensibilidad de la técnica.*
3. La cantidad de diagnósticos positivos que se pueden hacer con distintos métodos de inmunomarcación, en un número fijo de casos.

En los métodos de inmunohistoquímica, la sensibilidad depende directamente de la actividad del anticuerpo en el antisuero, de los sistemas de detección que se utilicen, de los métodos de conjugación o de enlace con las sustancias marcadoras que se emplean y de la cantidad de estas moléculas marcadoras por unidad de anticuerpo.

Bibliografía:

Martin D.; Mayer, P.; Rodell, V.: BIOQUÍMICA DE HARPER 9ª edición- Editorial El Manual Moderno – México D.F. 1984
Barrett, J.: Inmunología Básica y su aplicación en Medicina – Editorial Panamericana – Buenos Aires 1978
Molinolo, A.; Fernández Alonso, G.; Meiss, R; Sens, A.: Introducción a las Técnicas de Inmunohistoquímica – Editor E.Herr – Buenos Aires 1983
Taylor,C; Cote,R; Inmunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist – Second Edition – W.B.Saunders Company Philadelphia 1994
Elias, J.M.; Jules, M.: Immunohistopathology. A practical approach to diagnosis. Editorial ASCP Press. Chicago 1990

Sistemas de Detección

Hemos visto que la reacción primaria antígeno-anticuerpo, es un proceso NO visible.

Para visualizar un antígeno unido a un anticuerpo específico, vamos a necesitar reacciones que complementen esa unión primaria, utilizando un marcador o trazador (enzima) y un cromógeno

Podríamos decir entonces, que un Sistema de Detección es una **cadena de reacciones que nos permitirá visualizar la reacción Ag-Ac a través de un cromógeno, y se utiliza siempre después del anticuerpo primario**

Brevemente podemos describir dos métodos

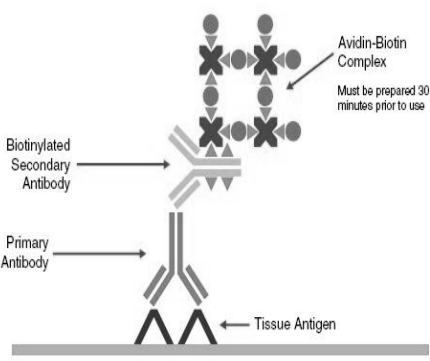
Método directo:

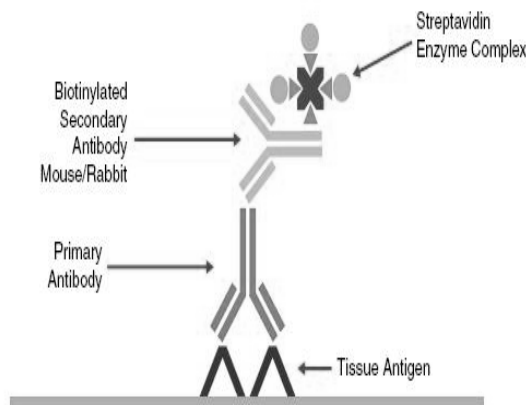
Como ejemplo podemos citar la inmunofluorescencia. Es un método de un solo paso, que involucra un anticuerpo conjugado que reaccionará directamente sobre el antígeno del tejido. Con la unión antígeno-anticuerpo, queda unido también, el fluorocromo que permitirá visualizar esa unión. Este procedimiento no es visible en microscopios de luz convencionales, y si bien es rápido, es poco sensible

Método indirecto:

En este método, el anticuerpo primario solamente reaccionará uniéndose al antígeno del tejido. Es necesario utilizar un anticuerpo secundario o puente que reaccionará con el anticuerpo primario.

Generalmente se lo encuentra conjugado con biotina y enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina

	Método ABC En los años 80, Hsu et al, forman un complejo que une la AVIDINA (obtenida de la clara de huevo) con BIOTINA (obtenida de la yema de huevo) y se lo conoció como método ABC. Ambas moléculas, Avidina y Biotina tienen gran afinidad y generan un enlace irreversible "no inmune" entre ambas. La avidina está formada por 4 subunidades con 4 regiones hidrofóbicas de unión con la biotina. La molécula de biotina es pequeña, y se une fácilmente tanto a anticuerpos como a enzimas (ej: peroxidasa o fosfatasa alcalina).
--	---

Método Streptavidina-Biotina El mismo mecanismo de acción, tiene el complejo en el que se reemplaza la avidina por STREPTAVIDINA la que tiene gran afinidad con la biotina y las enzimas. Esta molécula de streptavidina, se unirá a la biotina del segundo anticuerpo, dejando expuestas las enzimas a través de las cuales visualizaremos la reacción primaria.	
---	--

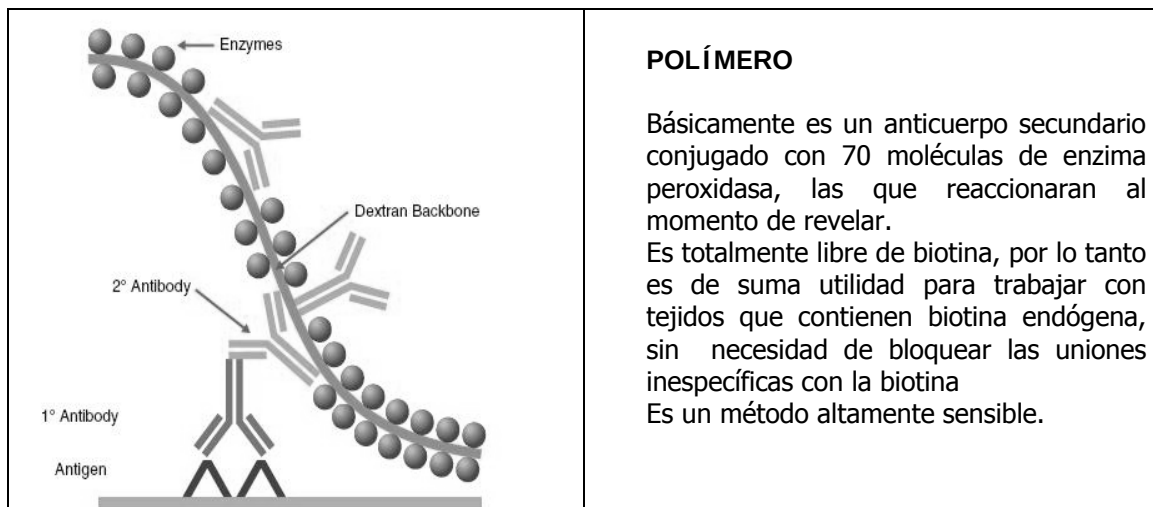
LSAB y ABC multilink (para utilizarse con anticuerpos en ratón(Mouse-monoclonal) conejo y cabra,(rabbit y goat, policlonales)

Ventajas

- Altamente sensibles
- Compatibles con una gran variedad de anticuerpos mono y policlonales
- Más baratos
- Aplicables a paneles básicos de patología quirúrgica
- Aplicables a varias especies

Limitaciones

- Contienen biotina
- En órganos con gran cantidad de biotina endógena, debe bloquearse esta sustancia
- Suman un paso más a la técnica
- Menos sensibles en antígenos de difícil demostración



Polímero monovalente (para usarse con anticuerpos en ratón(mouse) o conejo (rabbit),

Polímero polivalente (para usarse indistintamente con anticuerpos en ratón o conejo)

Ventajas

- ❖ Altamente sensibles
- ❖ Aplicables a la mayoría de los anticuerpos
- ❖ Permiten detectar cantidades mínimas de antígeno
- ❖ Permiten diluciones más altas
- ❖ Libres de biotina
- ❖ Ahorran un paso de la técnica

Limitaciones:

- ✓ No permite utilizarlo en diversidad de especies
- ✓ Más caros
- ✓ Menos sensibles en citología
- ✓ Las formas polivalentes no dan buenos resultados para antígenos nucleares
- ✓ Son poco sensibles para algunos antígenos de membrana

En la actualidad existen una gran variedad de marcas comerciales con diferentes presentaciones (mayor o menor cantidad de determinaciones, listos para usar o concentrados, monovalentes, polivalentes, etc.) La sensibilidad de cada uno de ellos depende del complejo de que utilizan.

Enzima-Cromógeno

Los métodos inmunoenzimáticos utilizan reacciones enzima-sustrato para convertir cromógenos incoloros en productos coloreados.

Algunas enzimas son específicas solo para un sustrato, mientras otras pueden atacar muchos sustratos relacionados.

Las enzimas mas utilizadas en inmunohistoquímica son:

* Peroxidasa de Rábano

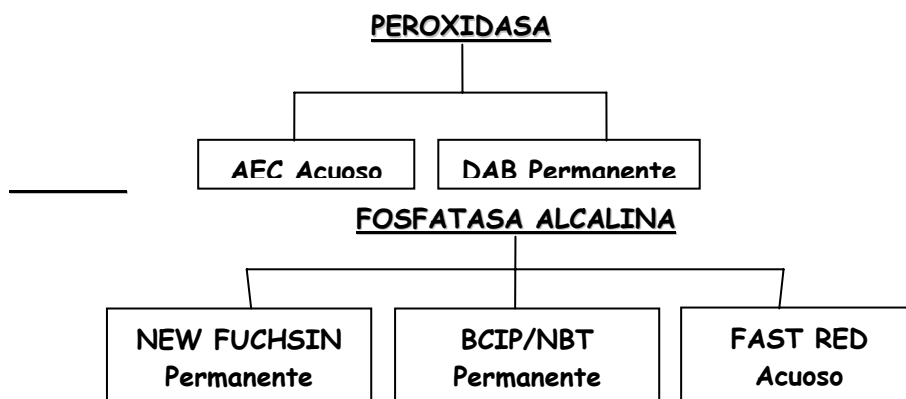
se reconoce tanto en la bibliografía como en los catálogos comerciales con la sigla **HRP**.

Los cromógenos utilizados comúnmente con los sistemas de detección que contienen HRP son **DAB**(3-3' diaminobenzidina) y **AEC** (aminoetilcarbazol)

* Fosfatasa Alcalina Intestinal de Ternero: es reconocida con la sigla **AP**, y en este caso, se utilizan cromógenos diferentes a los que usamos con la enzima peroxidasa: **New Fuchsin**, **BCIP/NBT**, **fast red**

El último anticuerpo con el que incubamos, posee la enzima a detectar

Cromógenos que podemos utilizar con cada una de ellas



Bibliografía:

Technical Immunohistochemistry: Achieving Reliability and reproducibility of Immunostains. Rodney T.Miller, M.D, Director of Immunohistochemistry ProPath Lab,Inc(2001).

Hand out Curso de Inmunohistoquímica Básica. Hospital Garrahan. Mayo 2002. HT: Cristina Chaves, Servicio de Patología del Hospital Ramos Mejía.

www.dakousa.com (Dako Envision Doublestain System)

www.zymed.com

Simultaneous Double Immunoenzymatic labeling: A New Procedure for the Histopathologic Routine. Pascal Chaubert, MD; Marie-Martine Bertolet; Magali Correvon; Fred Bosman, MD. Institut Universitaire de Pathologie, Lausanne, Switzerland. Modern Pathology vol 10,Nº6,P585.1997.

Handbook Immunochemical Staining Method. 3rd Edition. Thomas Boenisch,M.S. www.dakousa.com

LOS MARCADORES O TRAZADORES

Los marcadores que permiten la visualización de la unión primaria antígeno-anticuerpo más comúnmente utilizados son los siguientes:

- **ENZIMAS:** Definen a las técnicas inmunoenzimáticas.
- **FLUOROCROMOS:** Técnicas de inmunofluorescencia.
- **ISÓTOPOS RADIOACTIVOS:** Técnicas de radioinmunoensayo.
- **IONES METÁLICOS EN FORMA COLOIDAL:** Técnicas de inmuno-oro. Técnicas de oro coloidal – plata.

De todos ellos elegiremos los marcadores que se utilizan en las técnicas inmunoenzimáticas.

Si se utiliza una enzima como trazador o marcador unido a un anticuerpo u otra sustancia con la que posea gran afinidad (ver sistemas de detección), es posible obtener un producto final **cromogénico** (*que da color*), permitiendo la aplicación a la histoquímica con la luz visible.

Debemos mencionar aquí que es por ello que éste tipo de técnicas se llaman de "**inmunohistoquímica**", porque implican **una serie de reacciones secuenciales de tipo inmunológico (reacciones antígeno – anticuerpo) y reacciones histoquímicas de óxido reducción donde participa activamente la enzima trazadora.**

VISUALIZACIÓN DE LOS MARCADORES ENZIMÁTICOS

Técnicas de inmunoperoxidasa y de inmunofosfatasa alcalina:

Se denominan así, a un conjunto de métodos de inmunomarcación que tienen en común la enzima peroxidasa o la enzima fosfatasa alcalina. Éstas pueden hallarse acopladas a un anticuerpo (a una o varias inmunoglobulinas), o a otras sustancias (generalmente proteicas) y su revelado por cromógenos específicos, a través de una reacción de óxido-reducción, permite la localización del antígeno contra el cual va dirigido un anticuerpo.

Son técnicas sumamente sensibles, lo que permite localizar pequeñas cantidades de antígeno y pueden ser aplicadas a tejidos incluidos en parafina.

Los métodos inmunoenzimáticos utilizan reacciones enzima-sustrato para convertir cromógenos incoloros en productos coloreados.

Las enzimas son catalizadores proteicos y su eficiencia catalítica es extremadamente alta (10.000 a 1.000.000 moles de sustrato por minuto).

La actividad enzimática depende de diversas variables tales como las concentraciones de enzima y sustrato, pH, concentración de sales en el buffer, temperatura y luz.

Para seleccionar la enzima adecuada en una técnica inmunohistoquímica debemos considerar algunos parámetros:

- a) La enzima debe ser altamente purificada.
- b) La conjugación o enlace con un anticuerpo u otra sustancia, no deberá inhibir la actividad de la enzima aunque sí pueda disminuirla.
- c) La enzima conjugada debe ser estable en solución.
- d) La actividad endógena de la enzima solo debe interferir mínimamente con la coloración específica del antígeno.
- e) Los productos de la reacción enzimática deben ser fácilmente detectables y estables.

Las enzimas mas utilizadas en inmunohistoquímica son:

Peroxidasa de Rábano (HRP):

Aislada de la planta del rábano picante. Tiene hematina (grupo con contenido de hierro) como sitio activo. En solución es de color marrón. Puede ser inhibida por exceso de sustrato. El exceso de peróxido de hidrógeno y la ausencia de un donante de electrones, bloquea la actividad endógena de la peroxidasa. Las peroxidasas son enzimas que utilizan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como aceptor de electrones, para catalizar reacciones oxidativas en sustratos, formando precipitados coloreados. Son comunes en leucocitos y en eritrocitos.

Sustratos colorimétricos:

DAB (3,3' diaminobenzidina) produce un precipitado marrón. Insoluble.

AEC (3-amino-9-etilcarbazol) precipitado final rojizo. Soluble en solventes.

4-cloro-1-naftol precipitado azul-negro. Soluble en solventes.

Fosfatasa Alcalina Intestinal de Ternero:

La fosfatasa alcalina no fue usada intensivamente en inmunohistoquímica hasta la publicación del método fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa alcalina. La ventaja comparada con el método PAP es la "no" interferencia de la actividad de la peroxidasa endógena. Actualmente existen en mercado varios sistemas de detección que incluyen la fosfatasa alcalina como enzima trazadora.

REACCIÓN DE OXIDO-REDUCCIÓN

Método de revelado:

Vamos a tomar como ejemplo la enzima peroxidasa para explicar como se produce la reacción de color. Cada enzima tiene parámetros básicos a considerar, en este caso son:

- sustrato específico = H_2O_2 (peróxido de hidrógeno contenido en agua oxigenada)
- pH 7.4
- temperatura ambiente
- tiempo de exposición (control microscópico).

El último reactivo con el que incubamos, posee la enzima marcadora.

En una solución buffer, disolvemos 3-3' DAB (3-3' diaminobenzidina) **que es el sustrato colorimétrico** y agregamos agua oxigenada. La **enzima peroxidasa** actúa sobre el **peróxido de hidrógeno (H_2O_2)** contenido en el agua oxigenada que es su **sustrato específico**, transformándola en **H_2O** y liberando oxígeno naciente.

Esta molécula de oxígeno es captada por el DAB que se transforma de reducido a oxidado. El DAB es el donante de electrones, lo que produce una polimerización oxidativa y ciclado del DAB determinando la aparición de un precipitado marrón insoluble, en el sitio de la reacción primaria antígeno - anticuerpo.

Como paso previo a la inmunomarcación, cuando trabajamos con enzima peroxidasa (HRP) es necesario inhibir la actividad remanente que ha quedado en las células, después de los procedimientos de fijación, procesado e inclusión.

SUSTANCIAS ENDÓGENAS

¿A qué llamamos sustancias endógenas?

A aquellas sustancias que han quedado con una actividad biológica remanente, después de la fijación, procesamiento histológico o citológico y la inclusión.

Dicho de otra manera son aquellas sustancias que necesitamos "inhibir" o "bloquear" por su actividad remanente, concluidos los pasos previos del procedimiento histológico o citológico habitual.

A los fines de las técnicas de inmunoperoxidasa, tenemos que distinguir tres sustancias remanentes:

- a) la actividad de la peroxidasa endógena
- b) la actividad de la biotina endógena
- c) la actividad endógena ligadora de avidina

Inhibición de la peroxidasa endógena:

Consiste en la inhibición de la peroxidasa remanente en el tejido a través del sustrato para la enzima, *el peróxido de hidrógeno (H₂O₂)*. Si éste paso no se efectúa, el revelado del cromógeno se depositará, no sólo en los sitios de inmunorreactividad, mediados por la peroxidasa trazadora de la unión Antígeno – Anticuerpo, sino también en la peroxidasa remanente del tejido, dando marcación inespecífica de fondo. La inhibición ocurre por saturación del sustrato.

Este procedimiento generalmente se lleva a cabo antes o después de la reconversión antigénica de ser necesaria o, para aquellos anticuerpos que no requieren de recuperación, antes de la incubación con el antisuero primario. En cualquier caso, debemos realizarla **siempre antes de la incubación con la sustancia que contenga la enzima trazadora.**

Bloqueo de biotina endógena:

Cuando usamos sistemas de detección que contienen anticuerpos secundarios biotinilados, sobre todo en muestras que provengan de hígado, riñón, tiroides, y en menor medida órganos linfáticos, sistema nervioso central y en el tejido adiposo (mama); es conveniente bloquear la actividad de la biotina endógena. Este procedimiento se lleva a cabo fácilmente ya que el bloqueador de la biotina es la avidina.

Existen kit comerciales de fácil manejo, incubando generalmente antes del antisuero primario. En cualquier caso debemos realizarla **siempre antes de la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado.**

Bloqueo de actividad endógena ligadora de avidina:

La actividad endógena ligadora de avidina, se observa en las técnicas que utilizan la biotina en el sistema de detección. Esta actividad usualmente se observa dentro del citoplasma y de forma más pronunciada en cortes de criostato, aunque también puede darse en tejidos incluidos en parafina.

La base bioquímica para esta actividad endógena radica en el hecho de que mientras la avidina tiene cuatro sitios de unión para la biotina, cada molécula de biotina solo puede unirse a una de avidina y por eso agrega tres sitios potenciales más de unión de biotina directamente al espécimen.

Procedimiento para bloquear actividad endógena ligadora de avidina:

Esta actividad endógena puede ser suprimida mediante incubaciones secuenciales de 10 a 20 minutos de los cortes, primero con 0.001% - 0.1% de avidina en buffer PBS o TRIS seguido de 0.0001% - 0.001% de biotina antes del protocolo de inmunomarcación. También se puede recurrir a kit comerciales, los mismos que utilizamos para bloquear biotina endógena.

Bloqueo de uniones inespecíficas

Llamamos uniones inespecíficas a aquellas que ocurren entre partes de la molécula del antígeno por un lado y del anticuerpo por el otro, que **no son las uniones que se establecen entre los epítopes del antígeno y los paratopes del anticuerpo.** Al ser de similares características (uniones débiles) pueden crear fondo inespecífico y hasta falsos positivos.

Pueden realizarse con suero normal que contiene inmunoglobulinas no dirigidas contra el antígeno. El suero de bloqueo, deberá ser de una especie distinta que la del antisuero primario, o la misma que la del antisuero secundario (generalmente se utiliza caballo o cerdo). La dilución en buffer y el tiempo de incubación varían según el protocolo que se siga.

Existen actualmente proteínas bloqueadoras llamadas "libres de suero" fabricadas generalmente a base de caseína (buen bloqueador de éste tipo de uniones), en medio buffer.

Incubaciones

Las incubaciones, por procedimientos manuales, no automatizados, se realizan en cámara húmeda que consiste en un recipiente humedecido con agua, buffer o solución fisiológica, donde se colocan los portaobjetos.

Antisuero primario o específico:

Es aquel que contiene inmunoglobulinas dirigidas contra un antígeno específico con una dilución predeterminada.

Antisuero secundario:

Es aquel que contiene Ig dirigidas contra la especie de la que se obtuvo el anticuerpo primario. El secundario puede o no estar conjugado o unido a otras sustancias (por ej. biotina o proteína carrier del polímero de enlace).

Sistema de detección:

Si bien hay una sección que trata específicamente los sistemas de detección, vale recordar aquí que son complejos de reacciones encadenadas y consecutivas, que encierran la enzima marcadora, cuyo procedimiento técnico puede constar de uno, dos o varios pasos posteriores a la incubación con el anticuerpo específico. (Según se utilice polímero de enlace, sistemas ABC o LSAB o CSA respectivamente).

Revelado de la enzima:

Se realiza por adición de un cromógeno (por ej. DAB) a un buffer con el agregado del substrato para la enzima (en el caso de la peroxidasa H₂O₂).

Los tiempos de revelado varían de 5 a 20 minutos y la acción se corta sumergiendo los vidrios en agua destilada o buffer.

AUTOMATIZACIÓN

Existen diversos aparatos que automatizan las incubaciones, lavados, revelado y contraste de las técnicas inmunohistoquímicas. Con la automatización se logra una uniforme distribución de los reactivos sobre el tejido, tiempo de incubaciones iguales para todos los vidrios, constante temperatura y protocolo, evitando las variables de resultados de la operación manual.

Bibliografía:

- Manual de Métodos Inmunohistoquímicos de Coloración 3º edición. Editor Thomas Boenisch- DAKO Corporation. Carpintería. USA.
- Taylor,C; Cote,R; Inmunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist – Second Edition
- Mac Manus J.F.A. y Mouri R.: Tratado de Técnica histológica
- Pearse, A.: Tratado de Histoquímica teórica y aplicada – Editorial Aguilar 1960
- Martin D.; Mayer, P.; Rodell, V.: BIOQUÍMICA DE HARPER 9ª edición- Editorial El Manual Moderno – México D.F. 1984
- Molinolo, A.; Fernández Alonso, G.; Meiss, R; Sens, A.: Introducción a las Técnicas de Inmunohistoquímica – Editor E.Herr – Buenos Aires 1983

Principios básicos en las técnicas de Inmunohistoquímica

Parte III

Inmunohistoquímica aplicada a extendidos citológicos

Si bien las técnicas inmunohistoquímicas aplicadas a extendidos citológicos tienen los mismos fundamentos que en cortes histológicos, ciertos parámetros y procedimientos deben tenerse en cuenta.

Fijadores:

El fijador por excelencia en citología es el alcohol 96°. Es un fijador que actúa por precipitación ya que desnaturaliza las proteínas destruyendo los puentes hidrofóbicos que mantienen la estructura terciaria de la molécula proteica y si bien su poder de penetración es menor que otros, su pH está encerrado en la neutralidad lo cual proporciona al antígeno fijado, una mayor afinidad por variedad de antisueros y reactivos. La preservación morfológica y antigénica es excelente.

Debido a su pH neutro y a que los extendidos generalmente no exceden de las 24 hs de fijación, los procedimientos de reconversión antigénica se efectúan en menor medida que en cortes histológicos. No obstante, esto dependerá del tiempo de fijación, del antígeno a demostrar y del anticuerpo y sistema de detección a utilizar.

Los fijadores aglutinantes como Carnoy o Saccomano no son buenos fijadores antigénicos, por lo tanto si se han de usar, es conveniente duplicar o triplicar el volumen del fijador en las centrifugaciones y luego de 30 a 40 minutos, realizar una postfijación con líquidos que contengan altas proporciones de alcohol 96°.

La utilización de formol neutro tamponado quedará circunscripta a la fijación de botones o bloques celulares, ya que éste fijador no permite la adhesión celular sobre el extendido. El formaldehído fija por reticularización, estableciendo fuertes uniones por puentes metileno con gran variedad de grupos funcionales entre las proteínas. Estas uniones "en cruz" o "cross linking" producen el anclaje de las moléculas al citoesqueleto.

Muestras hemáticas:

Uno de los grandes inconvenientes en las inmunomarcaciones de extendidos citológicos son aquellos que contienen una cantidad considerable de sangre y por lo tanto una alta concentración de peroxidasas y catalasas endógenas. El Carnoy por ejemplo, es un fijador que produce cierto grado de hemólisis a un pH considerablemente bajo, lo cual puede afectar de manera irreversible la demostración de ciertos antígenos. Como contrapartida, la técnica de rehidratación celular, permite trabajar a pH cercanos a la neutralidad e inmediatamente finalizado el procedimiento, se fijan los extendidos en alcohol 96°. Esto permite por un lado una fuerte hemólisis y desnaturalización de catalasas y peroxidasas y por otro, una fijación ideal en alcohol 96°.

Sustancias endógenas:

Si bien el fijador produce cierto efecto desnaturalizante, la actividad endógena de enzima peroxidasa o de biotina es mucho mayor que en cortes histológicos. Por lo tanto la inhibición de la peroxidasa endógena es un punto crítico en los pasos de la técnica. Se debe aumentar la concentración de sustrato (**H₂O₂**) y/o los tiempos de incubación cuando nos encontramos con extendidos muy gruesos. En cuanto a la actividad de biotina endógena se tendrá especial cuidado en extendidos que provengan de órganos tales como hígado, bazo y riñón. En éstos casos o se bloquearán los sitios de unión de la biotina endógena con una solución al 0.001 a 0.1 % de avidina en PBS por 20 a 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación con biotina al 0.001 a 0.2 % en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Pueden utilizarse opcionalmente, sistemas de detección libres de biotina como los polímeros de enlace, aunque en base a nuestra experiencia resultan más sensibles para los extendidos citológicos, los que contienen biotina. Otra forma más económica de bloquear los sitios de unión, es el tratamiento de los extendidos en una solución de dos claras de huevo diluidas en 200ml de agua destilada, seguido de una incubación de leche en polvo descremada al 5 % en PBS. Estos pasos pueden realizarse antes o inmediatamente después de la incubación con el anticuerpo específico.

Material de estudio:

Es de vital importancia el aprovechamiento de las muestras a través de suficientes centrifugaciones, obtención de botones celulares, inclusión de sedimentos y coágulos de fibrina (frecuentemente queda atrapada celularidad representativa en ésta proteína), habilidad para el manejo de las muestras, realización de extendidos finos, fijación inmediata. Aunque sobradamente conocidos éstos parámetros son de vital importancia al momento de demostrar un antígeno en un extendido citológico.

Obtención de material para inclusión:

Siempre que se pueda, es ideal obtener un bloque o botón celular para inclusión, ya sea a través de punciones, o incluyendo el sedimento que puede quedar en el fondo de los recipientes que contienen los extendidos o inclusive sedimentos de centrifugaciones. La información que nos brindan los cortes histológicos puede resultar muy útil para el diagnóstico citológico y resulta ideal para utilizar en técnicas de inmunomarcación, ya que nos permite la obtención de más de un vidrio de determinada población celular a la que frecuentemente se le debe realizar más de una determinación.

Aprovechamiento de los extendidos disponibles:

No siempre disponemos de material de inclusión o de uno o varios extendidos no coloreados para realizar las técnicas. Por lo tanto, frecuentemente se realizan marcaciones sobre extendidos ya coloreados con Papanicolaou. La tinción de base no afecta la observación microscópica de la inmunotinción posterior. La tinción de PAP, puede decolorarse fácilmente, previa extracción del cubreobjeto en xileno, con cambios en alcohol etílico absoluto, seguidos de 96°, alcohol 70° y agua.

Cuando sólo disponemos de algunos extendidos, se elaborará un panel de acuerdo a un rango prioritario de demostración de antígenos. En el caso de que el extendido tenga material representativo de punta a punta del portaobjeto, pueden efectuarse hasta tres marcaciones en el mismo porta. Si la demostración de un antígeno requiere por ejemplo de cierto método de reconversión antigénica y debe marcarse otro que no la requiera, puede dividirse el material a partir de cortar el portaobjeto con un diamante, obteniendo dos o tres vidrios que contengan suficiente material para inmunomarcar.

Métodos de recuperación antigénica en citología:

Ya hemos visto que el fijador habitual en citología, suele ser el alcohol 96°. Los alcoholes fijan por deshidratación coagulando las proteínas, sin la formación de compuestos aditivos, permiten una buena penetración del anticuerpo y no bloquean los determinantes inmunoreactivos. Sin embargo producen frecuentemente cambios conformacionales.

La digestión proteolítica después de la fijación con alcohol es inútil y puede resultar en la destrucción del antígeno ya que las enzimas proteolíticas directamente digieren los enlaces peptídicos, al no encontrar las uniones puente metileno provocados por la fijación con formaldehído.

Se han usado con éxito métodos de recuperación por calor. Se ha demostrado que a través de ciertas modificaciones pueden utilizarse procedimientos exitosos para la recuperación de receptores de estrógeno y progesterona, Ki 67, LCA, Her2Neu, CD20, CD3, AE1-AE3, CK7, CK20, TTF1, marcadores neuroendócrinos, S100, etc. En contraste con el material fijado en formol e incluido en parafina, el éxito de éste método no está tan relacionado al modo de fijación. Se ha propuesto que podrían reestablecerse los puentes hidrofóbicos y que la inmunorreactividad sería facilitada por un aumento en la permeabilidad de las membranas de la célula, proporcionando así acceso a antígenos celulares y nucleares previamente enmascarados. La modificación incluye la incorporación de una pequeña cantidad de detergente en la solución de recuperación y reducir los tiempos de exposición a temperaturas entre 80°C a 94°C, para mantener la morfología celular.

El buffer de recuperación para citología sigue siendo el citrato buffer a pH 6, o rescatadores comerciales a base de citrato. A pH 10, la morfología se pierde notablemente y a pH 9 se comprueba un mayor desprendimiento celular. El pH de rescate para una buena conservación morfológica y antigénica oscila entre 6 y 8 y los procedimientos que han dado mejores resultados son los que utilizan vapor.

También se ha propuesto que la inmunorreactividad de ciertos antígenos de membrana, se potencia por medio de la exposición a solventes de lípidos como el cloroformo, ya que ciertas proteínas están parcialmente enterradas en la doble capa lipídica de la membrana celular, por lo que una exposición al cloroformo contribuye al desenmascamiento antigénico. Con éste método pueden demostrarse variedad de antígenos, por ejemplo citoqueratinas de distinto peso molecular, filamentos intermedios, CD56, LCA, HMB, etc.

El tratamiento con cloroformo es muy sencillo: una vez retirado el cubre, se lava el extendido con varios cambios de alcohol etílico absoluto por inmersión y se lo coloca en cloroformo P.A. toda la noche, o al menos por unas 6 hs. A continuación, se coloca el extendido nuevamente en alcohol etílico absoluto, pasaje por 96° alcohol 70° y se continúa la técnica convencional.

Revelados:

Al momento de revelar la actividad enzimática, debemos tener en cuenta:

- La disposición tridimensional de las células
- Por sus características naturales, algunas células fagocíticas (polimorfonucleares) pueden tener cierta tendencia a captar distintos reactivos produciendo artefactos que deben tenerse en cuenta al momento de realizar un diagnóstico, evitando errores de interpretación.
- Se deberá tener especial atención en los tiempos de revelado y se efectuará un estricto control bajo microscopio óptico.
- El contraste nuclear con hematoxilina se hará con mayor tiempo de coloración y virado.

Testigos positivos:

- ❖ Extendidos diagnosticados
- ❖ Extendidos adicionales
- ❖ Células reactivas a determinados anticuerpos
- ❖ Botones celulares

Recolección de células para testigos positivos:

1. Fluidos corporales y punciones con aguja fina: Si la celularidad lo permite se realizan portas extras que se guardan por un tiempo limitado, según el fijador utilizado.
2. Tejidos sólidos: Al cortar la muestra sin fijar, se raspa ligeramente con una hoja de bisturí, realizando luego los extendidos
3. Aguja de punción aspirativa: Se enjuaga la aguja en solución fijadora, realizando luego los extendidos.
4. Cultivos celulares

Limitaciones de la técnica:

Pueden existir variaciones en los resultados por:

- Fijación
- Métodos de pretratamiento
- Procedimiento técnico
- Diferencia de sensibilidad entre los clones de anticuerpos según sean aplicados a cortes histológicos o muestras citológicas
- Interpretación de inmunorreactividad entre los observadores
- Imposibilidad de reproducir una población celular determinada

Recomendaciones:

- Fijación inmediata, para interrumpir los procesos de autólisis.
- Las muestras deben ser adecuadamente rotuladas de acuerdo al fijador utilizado.
- Si se ha de usar fijador de Saccomanno, respetar la proporción por lo menos 2 a 1 el volumen de la muestra.
- El material debe ser procesado inmediatamente.
- Usar portas silenizados o con carga positiva para evitar que se desprenda el material.
- Los extendidos finos en monocapa independientemente del método que se realice, minimizan los problemas de fondo y favorecen una "limpieza" de proteínas inespecíficas.
- Aplicar técnicas de rehidratación de ser posible, siempre antes de la fijación.
- No desechar restos de material: Pueden servir para inclusión en parafina
- Debe poder contarse con los datos clínicos del paciente, además de la indicación del órgano del cual procede el material.
- Correcta titulación de los anticuerpos a utilizar.
- Obtención de testigos positivos.
- Leer las indicaciones del data sheet.
- No realizar Digestión enzimática en muestras remitidas en alcohol.

Bibliografía:

- Rodney T. Miller: Technical Immunohistochemistry 2001 Pág 33. 2002
- Thomas Boenisch Basic Enzymology www.dakousa.com 2001
- Ng W, Choi F, Cheung L. Wu C: Rehydration of air-dried smears with normal saline: Application in fluid Cytology. Acta Cytol 1994, 38:56-64
- Leong AS: Immunostaining of cytologic specimen. Am J Clinical Pathology 1996, 105:139-140
- Gómez Morales, M; Navarro, N; Víguer García Moreno, J; García del Moral, R: Laboratorio y Atlas de Citología – Interamericana-McGraw-Hill- 1998
- Macrea. E.: Boletín técnico para histotecnólogos. Vol XXXVI, Nº2 December 2003, SAKURA. Resumen publicado en "Histoinforme" Vol II Año XV Julio 2004

Problemas, Causas y Soluciones

	<u>PROBLEMA</u>	<u>Causa Probable</u>	<u>Accion Sugerida</u>
1	No existe marcación en ningún vidrio	a) los reactivos no fueron utilizados en el orden correcto b) El buffer de lavado tiene azida sódica	a) Revise el orden de los reactivos b) Use buffer SIN azida sódica
2	Débil marcación en Todos los vidrios	a) los cortes retienen mucho buffer de lavado b) Anticuerpo demasiado diluido Poco tiempo de incubación . Poca concentración de la soluc. DAB H ₂ O ₂ c) El antígeno que se quiere demostrar requiere de reconversión antigénica	a) Seque muy cuidadosamente el exceso de buffer alrededor del corte b) Aumentar los tiempos de incubación y controlar las concentraciones y tiempos de revelado c) Aplique métodos de reconversión antigénica
3	Excesiva coloración de fondo (background)	a) Las muestras tienen alta cantidad de peroxidasa endógena b) tiene restos de parafina c) Los vidrios no fueron lavados correctamente	a) Aumentar el tiempo de inhibición de la peroxidasa endógena b) Renueve el xileno de desparafinar c) Utilice soluciones abundantes y frescas en los lavados

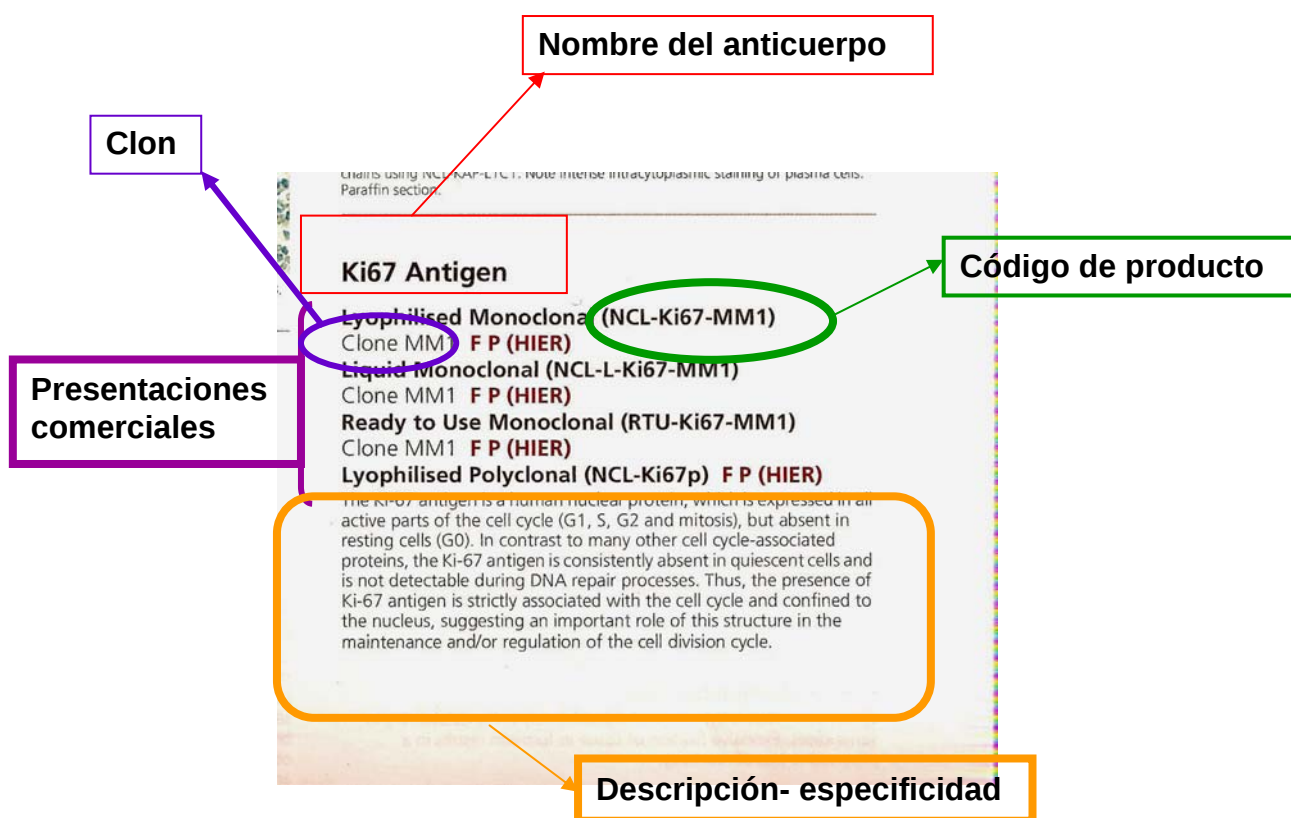
3	Excesiva coloración de fondo (background) (viene de hoja anterior-----)	d) La solución cromógena ha reaccionado excesivamente a temperatura ambiente e) los cortes se secaron durante el la técnica f) uniones inespecíficas	d) Utilice tiempos mas cortos en la incubación con la solución cromógena e) Utilice cámaras húmedas. Seque de a un vidrio por vez y aplique el reactivo antes de seguir con otro f) chequear la fijación y si tiene necrosis el material. Utilizar suero normal o proteína de bloqueo
4	El tejido se despegas del portaobjeto	Uso de portaobjetos comunes sin adhesivo tisular o carga positiva	Utilice portas pre tratados
5	Exceso de marcación inespecífica	Anticuerpos demasiado concentrados Demasiado tiempo de incubación	Modificar los tiempos.

Compra de Insumos

Anticuerpos Específicos:

Es muy importante tener algunos conceptos claros al momento de solicitar la compra de un anticuerpo, para ello necesitamos

- 1- conocer cuál es el antígeno que se quiere marcar
- 2- sobre qué material vamos a trabajar (tejidos humanos, animales, citología, cortes congelados, cortes en parafina, etc.)
- 3- saber interpretar los catálogos donde encontraremos la siguiente información:



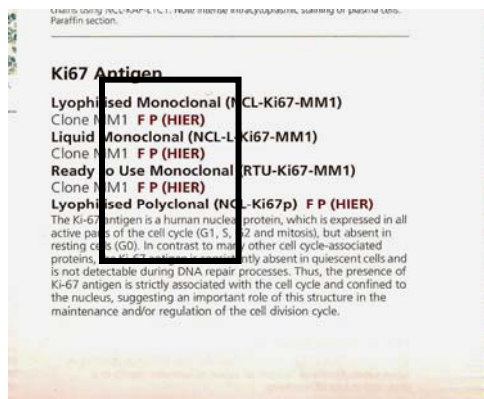
Nombre del Anticuerpo y Clon: puede variar de acuerdo a la marca.

Código de producto: es distinto en todas las marcas

Presentaciones comerciales: indican si el anticuerpo es concentrado, liofilizado, listo para usar o prediluido, si es mono o policlonal

Descripción-especificidad: indica puntualmente hacia donde está dirigido el anticuerpo, donde se expresa, y en algunos casos, indica diluciones de uso, lo que nos dará la pauta del rendimiento que podremos tener del anticuerpo

Es importante también, tener en cuenta las siglas que se encuentran en el texto, por Ej.:



Las siglas nos indicaran en qué tipo de tejidos podremos utilizarlo y qué pre-tratamiento necesitan. Y esta información deberá complementarse con la hoja de especificaciones del anticuerpo que nos indicará tiempos, ph de soluciones, y si son métodos con

Siglas más comunes que encontraremos de acuerdo a la marca comercial:

En cuanto a que tipo de material y tecnica podemos utilizarlo

- ❖ **F** Frozen (cortes por congelación)
- ❖ **P** Paraffin (cortes en parafina)
- ❖ **FFPE** Formol Fixed Paraffin Embeed (fijación en formol e inclusión en parafina)
- ❖ **I** Immunofluorescence (inmunofluorescencia)
- ❖ **C** Flow Cytometry (citometria de flujo)
- ❖ **E** Electron Microscopy (microscopia electrónica)
- ❖ **O** Other applications (otras aplicaciones)

En cuanto al pre tratamiento requerido

- ❖ **A.R** Antigen Retrieval (rescate antigénico)
- ❖ **E.R** Epitope Retrieval (rescate de epitopes)
- ❖ **HIER** Heat Induced Epitope Retrieval (rescate de epitopes inducido por calor)
- ❖ **Enzyme** (utiliza enzimas, la misma estará indicada en la hoja de especificaciones)
- ❖ **Antigen Unmasking** (desenmascaramiento de antígenos)

Al momento de realizar un pedido de anticuerpos, es imprescindible la fluida comunicación con quien vaya a interpretar la inmunohistoquímica, ya que en la lectura del catalogo, muchas veces encontramos el mismo nombre del anticuerpo específico con diferente código y especificaciones similares.

La interpretación sea para diagnostico o no NO ES LA MISMA.

Por ejemplo podemos citar el Antígeno Carcino Embrionario. El monoclonal da negativo en los hepatocarcinomas y el indicado en este caso es el policlonal que sí es positivo en esta patología.

Muchas veces este tipo de diferencias no está explícito en los catálogos.

También puede suceder, que una marca comercial, no tenga específicamente lo que se busca, por lo tanto es aconsejable, consultar catálogos de diferentes, no solo por la diferencia de precios que podemos encontrar, sino para poder estar seguros que NO se encuentra a la venta el anticuerpo específico que buscamos.

Sistemas de detección

Como hemos dicho anteriormente, es aconsejable estandarizar el protocolo de la técnica, eso nos permitirá elegir el/los sistema/s de detección adecuado/s, si tendremos que bloquear sustancias inespecíficas o no, etc.

Al decidir sobre sistemas de detección, además de los datos mencionados anteriormente, podemos ver que el catálogo, nos indica además:

- la cantidad de determinaciones que podremos realizar con el volumen de reactivos de cada presentación comercial (por Ej.: 50 test, 150test, etc.)
- si es concentrado o listo para usar
- si el anticuerpo secundario es polivalente o no (que sirve tanto para anticuerpos monoclonales como policlonales)
- si es biotinilado o no
- si el complejo de detección es streptavidina-biotina, avidina –biotina, polímero, etc., y cuál es la enzima que contiene.

Es importante evaluar también COSTOS, en un principio y hasta estandarizar el protocolo, y teniendo en cuenta que los proveedores muy difícilmente nos facilitan para probar antes de comprar, tal vez sea de utilidad comprar un sistema de detección de pocas determinaciones para evaluar si los resultados son acordes a lo esperado.

En general, nuestra experiencia esta basada en trabajo con tejido humano. Actualmente existe también una amplia gama de anticuerpos para trabajar en otras especies. Es importante la comunicación con el representante comercial

Sustrato-Cromógeno

La elección dependerá de la enzima que contenga el sistema de detección y si utilizaremos medios de montaje permanente o no.

La indicación del rendimiento esta indicada, como así también si es concentrado o listo para usar.

Las nuevas tecnologías han desarrollado productos que permanecen estables, en algunos casos por dos o tres días. Esto tiene de ventaja que no es necesario el descarte ni la neutralización previa, ya que se utiliza en su totalidad

Consideraciones importantes:

- ✚ -El laboratorio debe exigir la participación en la adjudicación de reactivos para inmunohistoquímica.
- ✚ -Solo quienes van a realizar técnicas de inmunohistoquímica conocen realmente cuál es la necesidad.
- ✚ Al momento de solicitar la compra de un anticuerpo específico es fundamental una descripción minuciosa del mismo. Tengamos en cuenta que en los lugares donde se realizan las compras por licitación, se nos pide que adjudiquemos los productos de menor precio.
- ✚ -La experiencia ha demostrado, que las firmas comerciales, al no disponer de un producto, ofrecen otro como alternativo que no siempre cumple con los requisitos solicitados.
- ✚ -Lea MUY BIEN lo que le ofrecen antes de adjudicar un producto
- ✚ -La única herramienta que disponemos para justificar una adjudicación es la descripción del producto solicitado en forma detallada
- ✚ -Ante cualquier duda que surja al momento de realizar los requisitos de compra (descripción del producto) como así también, al momento de adjudicar, contactar con el representante para aclarar. Tengamos en cuenta que en la mayoría de los casos UNA VEZ ADJUDICADO NO HAY MARCHA ATRÁS.
- ✚ -Asesorarse previamente sobre marcas y rendimientos.
- ✚ -Elegir la presentación comercial que se adapte a nuestras necesidades, si necesitamos un anticuerpo específico de alguna patología poco frecuente en nuestro laboratorio, vale considerar las opciones de menor volumen o listas para usar

Organización de un laboratorio de inmunohistoquímica

Lugar físico y requerimientos mínimos

El sector del laboratorio destinado a inmunohistoquímica, debe estar debidamente diferenciado del resto y debe contar con material de laboratorio exclusivo para el uso de las técnicas inmunohistoquímicas.

Se debe contar con

- 🚧 Personal Técnico con criterio
- 🚧 Orden y limpieza

EQUIPAMIENTO

- 🚧 Una heladera con temperatura estable entre 2°C y 8°C para el guardado de anticuerpos, sistema de detección y reactivos auxiliares.
- 🚧 Un freezer -20°C para el guardado de alícuotas
- 🚧 Equipo para realizar rescate antigénico por calor (microondas, u olla a presión, o vaporiera a gas o eléctrica, o baño termostatzado, etc.)

MATERIAL DE LABORATORIO

- 🚧 Cámaras húmedas para incubaciones
- 🚧 Tubos con tapa para guardar diluciones
- 🚧 Micropipetas de volumen variable (0.5ul a 50ul) dependiendo de la necesidad
- 🚧 Micropipetas de volumen fijo (50ul o 100 ul,)
- 🚧 Pipetas de vidrio graduadas, con o sin aforo, de diferentes volúmenes
- 🚧 Propipetas (para no aspirar con la boca de las pipetas de vidrio)
- 🚧 Pissetas para lavados
- 🚧 Frascos de coplin plásticos resistentes a microondas
- 🚧 Frascos de coplin de vidrio para lavados
- 🚧 Elementos para secado de portaobjetos (rollo de cocina, gasas, etc.)
- 🚧 Tubos tipo Ependorff para alicuotar

REGISTROS

- 🚧 Libro de registro de marcaciones realizadas
- 🚧 Carpeta con protocolos de trabajo de cada laboratorio en particular
- 🚧 Carpeta con hojas de especificaciones de los anticuerpos específicos y auxiliares
- 🚧 Planillas de guía

Orden para el guardado de los anticuerpos

Es aconsejable guardar tanto los anticuerpos puros, como el stock y las alícuotas agrupados



Esto va a permitirnos controlar nuestro stock
Visualizar y buscar rápidamente en la heladera

LOS ANTICUERPOS NO DEBEN PERMANECER MUCHO TIEMPO FUERA DE LA HELADERA

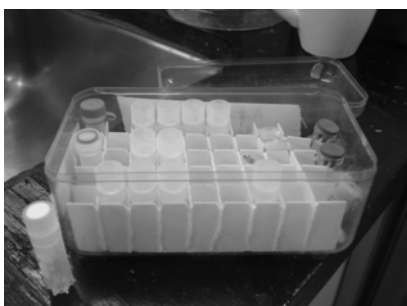
Cada laboratorio debe estructurar el orden de acuerdo al panel de anticuerpos que maneja.



A modo de ejemplo, podemos dividir los grupos de anticuerpos específicos en

- ✓ Linfoides
- ✓ Infecciosos
- ✓ Filamentos intermedios
- ✓ Tumores
- ✓ Neuro
- ✓ Proliferación celular
- ✓ Panel de mama

Este mismo orden, es aconsejable que se mantenga también cuando comenzamos a tener stock de reserva.



Las diluciones y las alícuotas
descongeladas
se guardan agrupadas de igual
modo

Alicuotado de anticuerpos

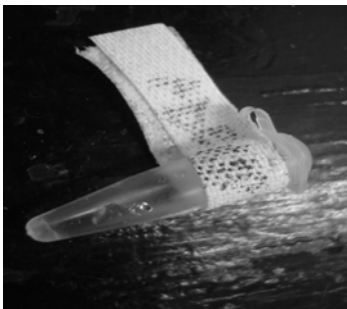
Algunos anticuerpos, se presentan liofilizados (en polvo) para reconstituir con agua destilada PURA. Los mismos indican que estando ya en forma líquida, deben guardarse en freezer a -20°C y alicuotados, o sea, fraccionados en pequeñas cantidades para su uso paulatino.

El volumen de cada alícuota esta relacionado con la dilución de trabajo

Para poder fraccionar adecuadamente los anticuerpos específicos, es necesario contar con micropipetas que nos permitan manejar volúmenes muy pequeños (ej, $1\mu\text{l} = 1$ microlitro)

Este procedimiento de alicuotado, es también útil para preservar aquellos anticuerpos que están cercanos a la fecha de vencimiento o aquellos que se utilicen muy poco y se estime se vencerán estando casi completos

(este punto es importante de considerar al momento de solicitar la compra de un anticuerpo)



En el freezer debemos mantener el mismo orden que en la heladera, o sea, guardado por grupos.

- Cada alícuota debe tener en el tubo Eppendorff indicado el volumen que tiene dentro y el nombre del anticuerpo, ya que cuando la saquemos para utilizar, no podrá volver a congelarse y debe guardarse con el resto de los anticuerpos en uso.
- El envase que contenga las alícuotas debe ser individual para cada anticuerpo específico y es necesario que cuente con datos tales como: nombre del anticuerpo, fecha de vencimiento, cantidad de alícuotas que contiene, volumen de cada alícuota, y cualquier otro dato que consideremos de importancia



- ❖ **CONTROLAR LA TEMPERATURA DEL FREEZER**
- ❖ **NUNCA GUARDAR EN EL FREEZER EL ANTICUERPO COMPLETO**
- ❖ **NUNCA RE-CONGELAR UNA ALICUOTA**, cada vez que se descongela y se vuelve a congelar, el anticuerpo va perdiendo la capacidad de unirse al antígeno
- ❖ **NUNCA CONGELAR LOS ANTICUERPOS PARA INMUNOFLOURESCENCIA**
- ❖ **NUNCA CONGELAR ANTICUERPOS PRE-DILUIDOS**

Planilla de guía

Una herramienta de gran utilidad es el diseño de planillas que nos permitan tener los datos de los reactivos con los que estamos trabajando, En las mismas, podemos completar datos como

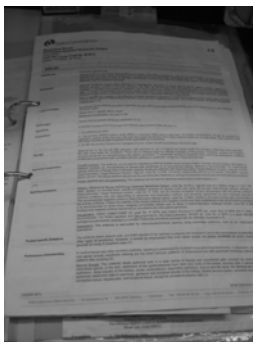
- o nombre del anticuerpo
- o dilución de uso
- o marca
- o vencimiento
- o si lleva reconversión con calor o digestión
- o si hay stock ó está alicuotado

Lista de anticuerpos

CLIC	ABREV.	ANTICUERPO	CÓDIGO	MARCA	VTO	RESC	DIG	UBICACIÓN	OBSERVACIONES
Predil	Feto	Alfa Feto Proteína	A008	Dako					
	1 AT	Alfa 1 Antitripsina	A0012	Dako	7/02	X			
	EMA	Ag. Epitelial de Memb.	M0613	Dako		X			
	CEA	Ag. Carcino Embrionario	Nci-Cea	Novocastra	3/99	X			
	CD99	Ewing Sarcoma	M3601	Dako	10/09	X			
	NSE	Enolasa	18-0196	Zymed	9/04				
	B2 mc	Beta 2 Microglobulina	A0072	Dako	4/00				
Predil	NKI-C3	NK-C3 Melanoma	AM077-5	Genex	8/00				
	NB84	Neuroblastoma	Nci NB84	Novocastra	5/01	X			
	MYF 4	Myf 4 (Miogenina)	M3559	Dako	4/06	X			
	Myo D 1	MyoD1	NCL-MyoD	Novocastra	9/06				
	PLAP	Plac. Alkaline Phosph.	NCL-Plap	Novocastra	10/05	X			
	S100	S100	Z0311	Dako	8/03	X			
	S100	S100	Nci-S100	Novocastra	8/01				
	BCL 2	BCL 2	MU287 UC	Genex	11/02	X			
	AP0	Apoptot. Surfactante	M4501	Dako	3/04	X			
	Act	Actina	M0635	Dako	1/04	X			
	AETAE3	Citoqueratinas	M0315	Dako	10/02	X			
	Desmina	Desmina	M0760	Dako	7/02	X			
	Vim	Vimentina							
	CK7	Citoqueratina 7	M0708	Dako	11/02	X			
	CK18	Citoqueratina 18	Nci-CK18	Novocastra	1/00	X			
	CK19	Citoqueratina 19	Nci-CK 19	Novocastra	11/99	X			

Actualizar los datos ante cambios que se produzcan en cuanto a marcas, vencimientos, diluciones, etc.

Hojas de especificaciones

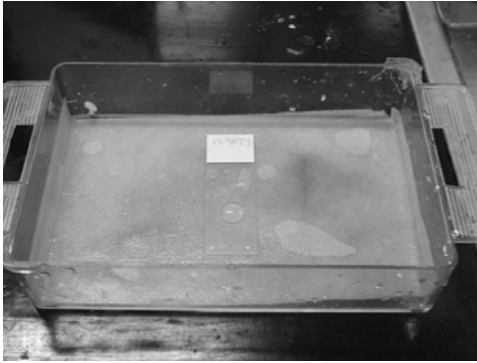


Son material de consulta permanente, por lo tanto se aconseja tenerlas en carpeta, conservando el orden de los grupos y por supuesto, sobre la mesada de trabajo

Consejos de orden para trabajar

- Antes de desparafinar los cortes, agrupar los que necesitarán reconversión antigénica, y los que necesitarán digestión enzimática.
- Dentro de cada uno de estos grupos, seleccionar y agrupar los que llevarán bloqueo de uniones inespecíficas, o los que se utilizarán con sistema de detección por polímero.
- A su vez, cada grupo puede dividirse por anticuerpo específico a utilizar, eso nos permitirá calcular la cantidad de dilución a preparar e incubarlos al mismo tiempo.
- Si se va a trabajar con vaporiera o baño termostatzado, precalentar las soluciones al mismo tiempo que por separado se realiza la inhibición de peroxidasa endógena.

Cámaras Húmedas



Son necesarias para realizar las incubaciones.

Se deberá colocar en la base un papel de filtro humedecido con tris buffer

Las mismas deberán ser lo más herméticas posibles para evitar que los preparados se sequen, sobre todo si vamos a trabajar con incubaciones durante toda la noche a 4°C.

Elementos que serán sometidos a reconversión antigénica

Existen canastas y coplin plásticos suficientemente resistentes a temperaturas cercanas a los 100°C.

Asegúrese que le vendan lo que corresponde, aclare que serán expuestos a altas temperaturas.

Si no son adecuados, al retirarlos de la fuente de calor, los encontraremos deformados.

Recuerde NO utilizar elementos metálicos en horno de microondas.

Consulte con el proveedor las especificaciones técnicas del producto.

Preparación de Soluciones Molares

La cantidad de una sustancia cuyo peso en gramos es numéricamente igual a su peso molecular se denomina **MOL** de esa sustancia.

Ej ¿cuánto pesa 1 mol de sulfato de sodio? Busque la fórmula molecular en la etiqueta o en un catálogo como si quisiera comprar el producto- Sulfato de sodio = Na_2SO_4 .

En general figura el peso molecular con FW (fórmula Weight) =142.

Si no figura el peso calcúlelo con la tabla periódica Ej: Na_2SO_4

EL PESO MOLECULAR ES LA SUMA DE LOS PESOS ATÓMICOS

Ej de cálculo:

Un átomo de Na pesa = 22,9898. Como la molécula tiene dos átomos multiplico el peso atómico x2 =45.9796

Un átomo de S pesa=32.9738.

O pesa=15.9994 Hay 4 átomos de oxígeno en la molécula, por lo tanto multiplico el peso atómico x 4=63.9976

Ahora SUMO TODO = 142.95

1Mol de sulfato de sodio pesa = 142.95

Las soluciones que contienen 1 mol de sustancia en un volumen final de 1 litro (1000 ml ó 1000 cc) se denominan **soluciones molares**

¿cómo preparar un litro de una solución molar?

- 1- consiga la formula molecular del soluto (sustancia que en una solución se halla en menor proporción. Solución = solvente + soluto)
- 2- pese el soluto
- 3- Disuelva el soluto en una pequeña cantidad del agua destilada
- 4- Agregue en un matraz el soluto diluido y agregue el resto de agua hasta completar el litro de solución. LISTO

Para soluciones de diferente molaridad

Ej: Solución 2M= 2x peso molecular en gramos en 1000ml

Solución 0.1M = 0.1 x peso molecular en gramos en 1000ml

EJEMPLO: Solución de sulfato de Sodio 0.1M

Teniendo en cuenta lo visto anteriormente Na_2SO_4

Na = 22,9898 x2 =**45.9796**

S = **32.9738**

O =15.9994 x 4=**63.9976**

SUMAR TODO = **142.95**

Solución 1M de sulfato de sodio= 142.95gr en 1000ml e agua destilada

Solución 0.1M de sulfato de Sodio= (0.1x142.95)= 14.295gr en 1000ml de agua destilada

Preparación de soluciones molares de líquidas

Primero piense en estos datos:

-volumen de la solución que desea preparar Ej: V=100ml de ácido clorhídrico

Molaridad de la solución que desea preparar Ej:100ml de HCl 0.5M

Tome la botella de HCl y obtenga los siguientes datos

Densidad (δ) (unidades g/cm^3 o kg/l ó gr/ml)Ej: para el HCl : 1.19g/ml

Concentración ó título(unidades % P/P ó gr/100gr de solución) EJ:37gr/100gr

Peso molecular: 36.5

Utilizando la concentración sabemos que 100gr de solución de HCl poseen 37gr de HCl
¿cuántos gramos de solución necesita para tener un mol de HCl?

$$\begin{array}{l} 37\text{gr de HCl} \dots\dots\dots 100\text{gr de solución} \\ 36\text{ gr de HCl} \dots\dots\dots X = 98.64\text{gr} \end{array}$$

Pero no puedo ir a pesar a la balanza HCl, muy bien, sabemos que la fórmula de densidad es $\delta = \text{Peso} / \text{Volumen}$

$$\delta = 1.19\text{g/cm}^3 = \frac{P}{V} \text{ por lo tanto } V = \frac{P}{1.19\text{g/cm}^3} = \frac{98.64\text{ g}}{1.19\text{ g/cm}^3} \quad V = 82.89\text{ cm}^3$$

Ahora, si para preparar una solución 1M de HCl necesito 82.89 cm³ de HCl puro, cuánto necesitare para preparar una solución 0.5M

$$\begin{array}{l} 1\text{M} \dots\dots\dots 82.89\text{ cm}^3 \\ 0.5\text{M} \dots\dots\dots X = 41.44\text{ cm}^3 \text{ de HCl} \end{array}$$

Pero este volumen utilizaria si quisiera preparar 1 litro de solución, (recuerde que una solución 1 molar es siempre para un litro de solución final). Como quiero preparar solo 100 cm³ hago esta cuenta

$$\begin{array}{l} 1000\text{ cm}^3 \dots\dots\dots 41.44\text{ cm}^3 \text{ de HCl} \\ 100\text{ cm}^3 \dots\dots\dots X = 4.144\text{ cm}^3 \text{ de HCl} \end{array}$$

Ahora en un matraz tendria que agregar 80ml de agua destilada, los 4.144 cm³ de HCl y completar hasta 100 cm³

IMPORTANTE: NUNCA AGREGAR AGUA A UN ACIDO PURO, reacciona violentamente. Se debe poner primero parte del agua destilada, el ácido y luego completar hasta el volumen deseado.

Preparación de Soluciones Normales:

Una solución normal puede definirse como 1 equivalente-gramo de peso de soluto disuelto en 1 litro de solución. A su vez el equivalente-gramo es definido como la cantidad de sustancia que reemplazará o reaccionará con 1.008gr de hidrógeno.

Hay fórmulas que pueden usarse para calcular el peso equivalente

EJ:

$$\text{Peso equivalente: } \frac{\text{peso molecular}}{\text{Número total de oxidación de los cationes}}$$

$$\text{Peso equivalente: } \frac{\text{peso molecular}}{\text{Número total de oxidación de los aniones}}$$

Por ejemplo, para preparar 1 litro de soluciones 1n de los siguientes compuestos, la cantidad requerida en gramos será:

Para el HCl 36.5 (igual a su peso molecular ya que posee un solo hidrógeno reemplazable)
Peso equivalente del HCl = $\frac{36.5}{1} = 36.5$

Para el H₂SO₄ (ácido sulfúrico) es 49 (ya que posee dos hidrógenos reemplazables, los gramos requeridos serán la mitad de los que se necesitan para una solución molar)

$$\text{Peso equivalente del H}_2\text{SO}_4 = \frac{98}{2} = 49$$

Ahora, ¿cuántos ml de ácido sulfúrico concentrado serán necesarios para preparar 3 litros de una solución 0.8N?

Miremos en la botella el **Peso Molecular = 98**
Densidad = 1.84g/ml
Concentración = 98%

Necesitamos V=3 y N=8

Comencemos como antes: utilizando la concentración sabemos que 100gr de H₂SO₄ contienen 98gr de H₂SO₄. Cuántos gramos necesito para una solución 1N?

Peso molecular es 98, peso equivalente $\frac{98}{2} = 49$

98gr.....100gr de solución
49gr.....X = 50 gr.

Sabiendo la densidad (**δ**) = **1.84gr/ml** **despejamos el volumen = 27.17 cm³**
Si para preparar una solución 1N de H₂SO₄ necesito 27.17 cm³ ¿cuánto necesitaré para una solución 0.8N?

1N.....27.17 cm³
0.8N.....X = 21.736 cm³

Este volumen necesitaria para preparar 1 litro de solución (igual que para molaridad, una solución **1N** es siempre para un litro de solución).

Para preparar 3 litros:

1litro.....21.736 cm³
3litros.....X= 65.19 cm³

Recordar: colocar primero el agua destilada, al menos tres cuartas partes del volumen final deseado, luego agregar el ácido, y finalmente completar hasta los 3 litros