

Guía de Inmunohistoquímica para Técnicos

de Dios Soler, Marcela
Guía de inmunohistoquímica para técnicos / Marcela de Dios Soler; Gabriela Acosta Haab. - 1a ed. -
Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer, 2018.
Libro digital, PDF/A

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-3945-59-5

1. Enfermedades de la Mama. I. Acosta Haab, Gabriela II. Título
CDD 610.737



AUTORIDADES

Presidente de la Nación

Ing. Mauricio Macri

Secretario de Salud de la Nación

Dr. Adolfo Rubinstein

Directora del Instituto Nacional del Cáncer

Dra. Julia Ismael

Coordinadora Administrativa del Instituto Nacional del Cáncer

Nahir Elyeche

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE CÁNCER DE MAMA
• INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER •

**Coordinadora del
Programa Nacional de Cáncer de Mama**
Verónica Pesce

Programa Nacional de Cáncer de Mama

Alejandro Di Sibio
Susana Blanco
Daniel Andisco
Martín Darraidou
Marcela de Dios Soler
Marta Donia
Patricia Provenzano
Natalia Sragowitz
Paula Granda
Inés Libois
Cecilia Piedrabuena
Nadia Robles
Sandra Vera
Laura Limardo

Autoras

Marcela de Dios Soler
Gabriela Acosta Haab

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	7
FASE PREANALÍTICA	8
Prefijación	8
Fijador	8
Fijación	9
Postfijación.....	10
FASE ANALÍTICA.....	11
Procedimientos de recuperación antigénica para tejidos fijados en formol.....	11
Recuperación antigénica inducida por calor.....	12
Digestión enzimática	13
Recuperación antigénica por calor + digestión enzimática	14
Bloqueo de enzimas endógenas	14
Anticuerpo Primario.....	15
Anticuerpo.....	15
Antígeno	16
Reacción antígeno-anticuerpo	16
Tipos de Anticuerpos.....	17
Anticuerpos Policlonales	17
Anticuerpos Monoclonales	17
Título de Anticuerpos.....	18
Incubación de Anticuerpos	19
Tiempo de incubación	19
Temperatura de incubación	19
Tinciones No Deseadas	19

Reactividad cruzada	19
Tinción inespecífica de fondo	20
Falso Negativo	21
Elección de Anticuerpos Primarios	21
Diluyentes	24
Sistemas de Detección	26
Método de Estreptavidina- Biotina.....	26
Procedimiento ABC utilizando amplificación catalizada de la señal (CSA).....	27
Sistemas de detección indirectos basados en polímeros	28
Sistema EPOS (Enhanced Polymer One-Step Staining)	28
Método de polímero en DOS Pasos	28
Metodo EnVision	28
Método PowerVision.....	29
Método de polímero en tres pasos.....	29
Enzimas y cromógenos.....	30
Peroxidasa (HRP):.....	30
Fosfatasa alcalina	30
FASE POSTANALÍTICA	31
Controles.....	31
Controles de reactivos:	31
Controles de tejido:.....	31
ASPECTOS PRÁCTICOS.....	39
DIRECCIONES DE INTERÉS	44
BIBLIOGRAFÍA.....	44

INTRODUCCIÓN

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica esencial y de uso rutinario en anatomía patológica. Contribuye en el diagnóstico específico de las enfermedades, en particular las neoplásicas; permite una adecuada clasificación en función de linaje u origen (tales como carcinoma, melanoma, linfoma, etc.); brinda información pronóstica y sus resultados, evaluados en el contexto clínico, contribuyen a la elección del tratamiento de los pacientes.

Basada en la alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo la IHQ permite, mediante el empleo de anticuerpos específicos y sistemas de detección, determinar la expresión de biomarcadores (proteínas). Se puede realizar sobre tejidos en fresco, fijados en formol y coágulos citológicos incluidos en parafina, permitiendo la evaluación simultánea de la morfología.

Es una técnica compleja, en la cual el resultado final está influenciado por múltiples parámetros de las fases preanalítica, analítica y post-analítica. Dependiendo de la selección y el rendimiento de estos parámetros, el resultado final de la técnica utilizando el mismo anticuerpo primario puede mostrar un rango de negativo a positivo para el antígeno objetivo.

Para que su empleo sea de máxima utilidad y los resultados obtenidos sean reproducibles y confiables es imprescindible la estandarización de cada uno de los pasos o fases desde la obtención de la muestra, con la adecuada fijación de los tejidos, hasta el ajuste de la técnica, lectura y valorización de los resultados obtenidos a los criterios establecidos mediante controles de calidad internos y externos.

Una adecuada técnica de IHQ debe asentarse en una base sólida. En este sentido deberá prestarse especial atención a los factores que la influyen de manera más importante:

Tabla 1 • Fases que deben estandarizarse para una adecuada técnica de inmunohistoquímica.

FASE PREANALÍTICA	FASE ANALÍTICA	FASE POSTANALÍTICA
1. Prefijación	1. Recuperación antigénica	1. Diseño de controles
2. Fijador	2. Bloqueo de enzimas endógenas	2. Controles positivos
3. Fijación	3. Anticuerpo 1 ^{ro}	3. Controles negativos
4. Postfijación: <ul style="list-style-type: none"> • Procesamiento. • Deshidratación, lavados e Impregnación en Parafina. • Cortes de parafina. • Almacenamiento 	4. Diluyente	4. Interpretación
	5. Sistema de detección	
	6. Cromógeno	5. Indicadores críticos de coloración
	7. Contracolor y montaje	

FASE PREANALÍTICA

La mayoría de las variables preanalíticas impactan en el resultado de la técnica de inmunohistoquímica. La tasa de pérdida de integridad de epítopes antigénicos depende de ellas. Una fijación inadecuada impide cualquier resultado fiable y la falta de reproducibilidad de la técnica de inmunohistoquímica es en parte consecuencia de aquella.

Prefijación

Los factores que influyen en el resultado de la IHQ comienzan con la toma de la muestra.

El tiempo de isquemia hace referencia al período que transcurre entre la interrupción del flujo sanguíneo y el inicio de la fijación. Un tiempo de isquemia prolongado conlleva acidosis tisular, degradación enzimática y alteración de la inmunoreactividad. Se distinguen:

TIEMPO DE ISQUEMIA CALIENTE (IC) es el tiempo que transcurre entre la interrupción del flujo sanguíneo y la exéresis.

TIEMPO DE ISQUEMIA FRÍA (IF) es el tiempo que transcurre desde que la muestra de tejido es obtenida (exéresis) y sumergida en formol. La demora en la fijación (mayor tiempo de isquemia fría) altera de manera significativa no solo a las proteínas ya sea aumentando, disminuyendo o de-localizando la inmunoreactividad sino también al material nuclear (ADN y ARN), cuya adecuada conservación es imprescindible para la realización de técnicas moleculares. Las guías internacionales recomiendan un tiempo de isquemia fría no superior a 1Hs.

El deterioro de los epítopes antigénicos causados por la IF no puede ser revertido mediante la recuperación antigénica.

Otras variables de prefijación que puede influir en el resultado de la IHQ son la coagulación de proteínas por calor, resultante del uso del electrobisturí en el procedimiento quirúrgico, y el secado del tejido.

Fijador

El formol o formalina (solución acuosa de formaldehído) es el fijador universalmente aceptado no solo para los tejidos sino también para la inclusión de coágulos citológicos obtenidos de punciones. Es un fijador de tipo reticulante que desnaturaliza (cambia la configuración espacial) las proteínas rompiendo en forma masiva los puentes de hidrógeno determinantes de su estructura y creando uniones o puentes entrecruzados "cross-linking" al reaccionar con grupos funcionales (amino, sulfhidrilos, guanidilos, hidroxilos alifáticos, etc.) de los aminoácidos, en especial lisina, tirosina, arginina, fenilalanina y triptófano. En un primer momento forma bases de Schiff y enlaces hemiacetales originando un grupo hidroximetileno. Esta unión, que es reversible, hace que muchas enzimas queden inactivas lo que ayuda a evitar la degradación del tejido por las enzimas hidrolíticas pero no fijan el tejido. Posteriormente los grupos hidroximetileno reaccionan con grupos funcionales de otra o de la misma proteína formando puentes cruzados de metileno (intra e intermoleculares) irreversibles. El resultado final es una red en la cual los epítopes quedan enmascarados (interferencia estérica).

El formaldehído es bien tolerado por los tejidos y tiene buena penetración, aunque la fijación es lenta (requiere un mínimo de 24 hs. para completarse). Se prepara al 10% partiendo del formol comercial (formaldehído al 40%) lo que hace que la solución tenga una concentración final de formaldehído del 4%. Se utiliza a esta concentración porque concentraciones muy elevadas pueden provocar que la fijación del tejido periférico impida la entrada y fijación del tejido de la zona central (efecto barrera).

El formol comercial contiene además un 7-15% de metanol que actúa como estabilizante para evitar la polimerización del formaldehído. Por ello la fijación en formol es en realidad una fijación doble (formol y metanol).

A temperatura ambiente el formol diluido en agua es bastante inestable de manera que en un mismo laboratorio la cantidad de aldehído disponible para la fijación varía diariamente en función de la temperatura ambiente. También influyen la estabilidad del formol el tipo y pH del agua (no es lo mismo el agua corriente que el agua destilada o bidestilada) utilizada.

Una solución amortiguadora, buffer o tampón es toda aquella solución cuya composición le permite estabilizar el valor de pH de la misma. El pH es importante porque casi todos los procesos biológicos son pH dependientes y mínimos cambios conllevan un apreciable cambio en la velocidad de un proceso.

El formol buffer se tampona a pH 7 con el objetivo de evitar su acidificación a ácido fórmico y una disminución de la cinética de fijación. A pH neutro el formol se encuentra casi exclusivamente en su forma monomérica hidratada (metilenglicol) y el metanal libre (formaldehído) que es lo que realmente fija se encuentra en una concentración del 0.1%. En los tejidos, el metilenglicol se deshidrata en carbonil formaldehído. Toda esta reacción química lleva un tiempo por eso la unión y la fijación no son inmediatas.

El etanol y metanol son fijadores que inducen la precipitación o coagulación de las proteínas y deshidratación con grave alteración de su estructura, sin embargo, muestran una buena conservación de carbohidratos. Con ellos la preservación morfológica es pobre (retracción celular) y provocan endurecimiento de las muestras.

Fijación

La fijación tiene como objetivo preservar los tejidos, de los fenómenos de autólisis y putrefacción (por inactivación de enzimas lisosomales intracelulares e inhibición del crecimiento de bacterias y mohos, respectivamente), conservando la morfología celular lo más parecido posible al estado vivo. La autólisis es un proceso de autodigestión que comienza de manera inmediata a la remoción del tejido y es acelerado por el incremento de la temperatura.

La fijación siempre ha sido un dilema ya que si bien existe la necesidad de tener un efecto protector (la desnaturalización de las proteínas, producida por la fijación, causa la inactivación de las enzimas y así se detiene la autólisis) los fijadores alteran la composición química y física de los tejidos. En el primer caso las proteínas desnaturalizadas difieren de las proteínas sin desnaturalizar en el perfil químico y antigénico ya que cambia de su configuración espacial.

Lo recomendable es la fijación en formol buffer 4% PH7-7.4, con una relación tejido- fijador alta (1:10) porque el formol se va incorporando progresivamente al tejido. El tiempo necesario para lograr la saturación del fijador es de 24 a 72 horas. Muestras fijadas menos o más de este tiempo óptimo pueden dar resultados falsos (negativos o positivos). Un defecto de subfijación es más crítico que la sobrefijación. No deben utilizarse para estudios de IHQ, Hibridación In Situ ni biología molecular muestras fijadas menos de 6 horas.

Tabla 2 • Fijación en formol.

FASE 1	PENETRACION	MUY RÁPIDA: 1 mm en 1Hs.
FASE 2	UNION	MUY LENTA: máximo nivel se alcanza después de las 24 Hs
FASE 3	FORMACION DE ENLACES (FIJACION)	LENTA

La penetración del formol es 12 veces más rápida que la unión de este a las proteínas y esta es a su vez 4 veces más rápida que la fijación (formación de puentes metilo).

El formol en forma de metilenglicol penetra en el tejido aproximadamente 1mm por hora desde la superficie. Sin embargo penetración no es igual fijación. El metilenglicol sufre la conversión a formaldehído, que es lo que realmente fija, a una velocidad lenta (horas). Una pieza que lleva 4 horas en formol mostrara una penetración de 4mm pero en ese momento la unión del formol a las proteínas (Fase 2) será menor del 20% y la formación de enlaces cruzados (fase3- fijación) será aún menor.

El tiempo que demora el formol en unirse a las proteínas y fijar los tejidos es una variable dependiente del formol y no del tamaño de la pieza. Las piezas pequeñas tardan en fijarse exactamente el mismo tiempo que las piezas grandes.

En el caso de piezas de gran tamaño es recomendable realizar a la brevedad cortes seriados de aproximadamente 5mm y mantener las lonjas separadas mediante el empleo de gasa o toallas de papel para asegurar la penetración del formol. Es también recomendable cambiar el formol una o dos veces a lo largo del proceso total de fijación.

La unión del formol a los tejidos decrece con el tiempo. Por ello la permanencia de las piezas en el formol más allá de las 72 hs. no mejora la fijación.

Cuando el tejido ha estado menos de 24 horas en formol se produce una fijación híbrida: periféricamente se fija con formol mientras la parte profunda central lo hace gracias a los alcoholes que se emplean durante el procesamiento. Esto hace que el área profunda sea más sensible a los métodos de recuperación antigénica pudiendo originar falsos positivos.

Un tiempo de fijación largo incrementa el enmascaramiento antigénico y requerirá mayor recuperación antigénica.

Un aspecto que debe evitarse es que el tejido se seque en cualquiera de las etapas ya sea durante la extracción (el tejido no deberá quedar secándose sobre una gasa), el procesamiento o durante la realización de la técnica de IHQ. El secado puede causar cambios morfológicos especialmente pobre definición de la cromatina y cambios estructurales en especial a nivel de los bordes. Pudiendo por un lado inhibir la unión antígeno-anticuerpo y por otro, como el tejido seco es más absorbente incrementar la unión inespecífica e interferir con la interpretación.

En caso de requerirse decalcificación se elegirán los más suaves, preferiblemente el EDTA 10% PH7. Si se han empleado ácidos, es crítico realizar un lavado de duración variable con agua corriente, de mayor duración cuanto más haya durado la decalcificación.

Es recomendable hacer constar en el pedido de estudio de anatomía patológica: tiempo de IF, tiempo de fijación y el tipo de fijador empleado. Conocer estos datos tendrá valor al momento de la interpretación, solución de problemas técnicos y explicación de resultados inesperados.

Postfijación

- Luego de fijar y seleccionar los sectores de tejido, incluir bloques de hasta 2 cm de ancho y 3 mm de espesor para un adecuado procesamiento.
- A posteriori deshidratar en alcoholes graduados, aclarar (de alcohol el tejido) en xilol e incluir en parafina líquida. La temperatura no debe exceder los 58°C.
- No son recomendables los métodos de procesamiento rápido basados en el uso de microondas, excepto instrumentos validados.
- Corte secciones de 3-4µ de espesor y monte en portas de vidrio limpios silanizados o de carga positiva para evitar que el tejido se desprege. La carga electrostática positiva

resultante en el portaobjetos interactúa con las cargas negativas de las proteínas atrayéndolas. Despegamientos parciales pueden originar falsos positivos debido al atrapamiento de reactivos. Al levantar los cortes deben eliminarse todos los pliegues que podrían ocasionar artefactos de tinción.

- Los cortes deberán secarse a una temperatura de entre 37°C-45°C durante 12 horas o a 60°C durante una hora. Calentamientos excesivos en seco pueden originar pérdida de antigenicidad (falsos negativos).
- Si bien cortes de parafina podrán almacenarse a temperatura ambiente, en el freezer envueltos en papel aluminio o embebidos en parafina durante semanas a meses, es importante tener en cuenta que con el paso del tiempo se produce pérdida de antigenicidad (variable según el antígeno) por inestabilidad de epítopes secundario a fotooxidación y desecación (falsos negativos).
- El procesamiento inadecuado con deshidratación incorrecta del tejido, así como el almacenado de los tacos de parafina en condiciones de alta humedad conllevan a la degradación de antígenos y reduce la inmunoreactividad. El efecto de la humedad tiene mayor efecto deletéreo en función de la temperatura.

FASE ANALÍTICA

La fase analítica comienza con el desparafinado y termina con el montado de los cortes contracolorados. Las variables de esta fase, las cuales a diferencia de las preanalíticas pueden controlarse y modificarse dentro del laboratorio de patología, son:

1. Recuperación antigénica.
2. Bloqueo de enzimas endógenas.
3. Anticuerpos primarios.
4. Diluyentes.
5. Sistema de detección.
6. Enzimas y cromógenos.

1. Procedimientos de recuperación antigénica para tejidos fijados en formol

Para que la reacción antígeno-anticuerpo tenga lugar, el anticuerpo debe reconocer la estructura tridimensional del antígeno. En el caso de tejidos frescos y/o congelados, los antígenos se mantienen en un estado similar al nativo, pero al fijarlos con preservantes como la formalina, paraformaldehído, alcohol, ácido pícrico con frecuencia se desnaturalizan y repliegan en estructuras que no pueden ser reconocidas por el anticuerpo generado frente a la proteína nativa. Los cambios conformacionales que destruyen epítopes o los alteran, disminuyendo su reactividad con el anticuerpo, pueden ocurrir de varias maneras. Las alteraciones más comunes ocurren químicamente por la fijación y físicamente por el calor. Muchos epítopes son sensibles al calor, y durante el paso de inclusión, se calientan los tejidos al punto de la fusión de la parafina, normalmente entre 50–60°C. Pueden también dañarse si los tejidos son tomados usando pinzas calientes. Es por ello que es esencial no sobrecalentar en ninguna de las fases del proceso, ya sea el tejido durante la inclusión o los cortes durante el secado, si se desea una inmuno sensible. Los cambios conformacionales de los epítopes antigénicos por acción del calor no pueden ser revertidos mediante la recuperación antigénica.

La recuperación antigénica (RA) es el procedimiento mediante el cual se restaura la estructura molecular del antígeno y se recupera la inmunoreactividad, permitiendo obtener resultados inmunohistoquímicos óptimos. Los métodos por los cuales puede obtenerse son:

- A. Recuperación antigénica inducida por calor
- B. Digestión enzimática
- C. Recuperación antigénica inducida por calor + Digestión enzimática

La RA insuficiente o errónea es la causa más frecuente de una técnica de IHQ inadecuada (falsos positivos o falsos negativos). Ver Tabla 3.

A. Recuperación antigénica inducida por calor

La recuperación antigénica (*antigen retrieval*–AR-) fue desarrollada en la década del 90, a partir de una serie de estudios publicados en 1940 indicando que los puentes de metilo entre las proteínas y el formol podían romperse con temperaturas superiores a 100°C o tratamiento alcalino. A posteriori se utilizaron otras denominaciones como recuperación de epítopes inducida por calor (*Heat-induce epitope retrieval* -HIER-) o desenmascaramiento antigénico.

Si bien el mecanismo de acción de la HIER no se conoce de manera exacta la hipótesis más fuerte es que dependería de la hidrólisis de los enlaces cruzados inter e intramoleculares exponiendo nuevamente la secuencia lineal aminoacídica de los antígenos.

La HIER incrementa la sensibilidad permitiendo el empleo de diluciones más altas del anticuerpo primario, en ocasiones de manera simultánea disminuye el “fondo” y favorece la estandarización al minimizar las posibles diferencias en la inmunotinción secundarias a los distintos tiempos de fijación.

Más del 95% de los anticuerpos empleados de rutina en IHQ requieren HIER.

Las variables con mayor influencia en la eficiencia de la HIER son: temperatura, tiempo, tiempo de fijación del tejido; naturaleza y PH del buffer de recuperación. La HIER se realiza fundamentalmente mediante incubación en buffer de Citrato o EDTA con temperatura de 90-100°C. El mayor inconveniente de esta forma de recuperación es que algunos epítopes se dañan de forma irreversible y esto acontece más fácilmente en tejidos subfijados.

Si bien para la mayoría de los antígenos, la condición óptima de recuperación podrá ser a 97°C durante 20 min, algunos pocos necesitaran recuperación más prolongada a menor temperatura. Se ha sugerido que la recuperación más prolongada a 90°C permite una mejor preservación de la morfología.

En tejidos sobrefijados la obtención de buenos resultados puede requerir mayor temperatura y/o tiempo (más de 40 minutos) de HIER.

Es muy importante tener en cuenta que la HIER es un evento transitorio por lo cual la incubación con el anticuerpo primario debe efectuarse inmediatamente después.

Una HIER excesiva en relación a la fijación de la muestra puede ocasionar:

- Fondo excesivo que suele ser debido a desenmascaramiento de biotina endógena o excesiva concentración del anticuerpo primario.
- Desprendimiento y/o rotura de los cortes en especial si tienen abundante colágeno y grasa. Se puede solucionar realizando cortes más finos que se adhieren mejor que los cortes gruesos y aumentando el tiempo y/o temperatura de secado.
- Disminución de la apetencia tintorial de los núcleos con la contratinción
- Tinción nuclear o nucleolar inespecífica
- Tinción de borde en especial en muestras pequeñas

La HIER puede realizarse en microondas, baño térmico, olla a presión, cámara de presión Pascal y platinas (inmunotinción automatizada) con ajuste adecuado para cada uno de ellos de la temperatura y tiempo de recuperación (Ver Tabla 3).

TABLA 3 • Recuperación antigénica: equipos. Ventajas y desventajas de cada uno.

EQUIPO	VENTAJAS	INCONVENIENTES	TEMPERATURA Y TIEMPO
MICROONDAS	Comodidad. No hay que estar pendiente del T ni la T.	Recuperación desigual. Inherente al principio de calentamiento del MO. Recuperación variable según el modelo de MO y el número de vidrios.	100°C. 20 minutos.
OLLA A PRESIÓN	Rapidez. Se toma el T a partir del momento en que la válvula alcanza la segunda marca.	Alteración morfológica. Hay que estar muy pendiente de tiempo. Manipulación de la olla peligrosa.	120°C. 2-5 minutos.
BAÑO TÉRMICO	Reproducibilidad. Condiciones fácilmente estandarizables.	Requiere más tiempo. Si no es digital hay que controlar la temperatura permanentemente.	95-99°C 20-40 minutos.
CÁMARA DE PRESIÓN PASCAL	Fiabilidad. Parámetros de presión y calor controlados automáticamente y confirmables mediante bandas reactivas.	Posible desprendimiento y/o rotura de los cortes.	125°C 1-5 minutos.

Una vez efectuada la recuperación se dejara enfriar a temperatura ambiente en el mismo tampón, a fin de que las proteínas recuperen su estructura secundaria y terciaria y entonces puedan ser reconocidas por el anticuerpo primario.

Otro de los influyentes críticos en la eficiencia de la HIER es la naturaleza y pH del buffer de recuperación (Citrato, pH6; TrisHCL, pH8-10; EDTA, pH8; TE, pH9; Buffers comerciales).

Para el 90-95% de los epítopes la HIER con Buffer pH 8-9 es preferible a la HIER con Buffer pH6. La HIER con buffers de PH alto en relación a la HIER con buffers de PH bajo permite en muchos casos disminuir el tiempo de incubación y/ o aumentar la dilución del anticuerpo primario.

Buenos resultados se han descrito con el empleo de buffers modificados pH 6 (Ej. Dako) con algunos anticuerpos que típicamente requieren digestión enzimática como CD5 (Leu1), CD7 (CBC3.7); CD30 (D6/B5); EP-CAM (EP-4 o MOC-31 o VU-1D9); CD21 (1F8); CD35 (Ver- MAC-DRC); GP200 (SPM 314 o 66.4C2); CD61 (Y2/51); NGFR (MRQ-21). Mandatoria para los primeros 3.

La condición óptima de HIER no es universal sino que varía según el anticuerpo, clones y sistema de detección utilizados. Se sugiere realizar una nueva puesta a punto toda vez que se incorpore un nuevo anticuerpo, un nuevo clon de un anticuerpo ya conocido o un nuevo sistema de detección.

A tal fin se podrá testear primero el pH utilizando en un caso citrato pH6 y en otro EDTA a pH 8 (en ambos casos la temperatura será de 100°C). Una vez seleccionado el mejor PH optimizar la temperatura y el tiempo.

B. Digestión enzimática

Menos de un 2 % de los anticuerpos habitualmente usados requieren utilizar digestión con enzimas proteolíticas (proteínasa K, pepsina, tripsina, pronasa) sin calentamiento. El método es difícil de controlar y standarizar. La digestión óptima (Ver tabla 4) va a depender de: Tipo y concentración de la enzima; temperatura y tiempo de digestión; tipo de tejido; tipo de fijación y en especial el rendimiento a menudo está muy influenciado por el tiempo de fijación en formol

de manera que el tiempo de digestión deberá ajustarse en cada caso, esto en la rutina puede ser difícil de lograr considerando que las muestras de tejido inevitablemente muestran una gran variación en el tiempo de fijación. Los tejidos fijados en forma prolongada van a requerir digestiones más prolongadas.

Los inconvenientes de este método son que favorece el mayor desprendimiento del tejido y resulta con mayor “fondo”.

TABLA 4 • Condiciones de trabajo para las distintas enzimas de digestión.

Enzima	Concentración típica de trabajo	Temperatura de activación	Tiempo típico de incubación
Proteinasa K	0.1%, PH8	25-37°C	5-10 minutos
Tripsina	0.1-0.25%, PH6	37°C	10 minutos
Pepsina	0.2-0.4%, PH2	37°C	5-20 minutos
Proteasa XXIV	0.05%-01%, PH7.6	37°C	5-10 minutos
Proteasa XIV	0.05%-01%, PH7.6	25-37°C	10-30 minutos

C. Recuperación antigénica por calor + digestión enzimática

Muy poco usada, la digestión puede hacerse antes o después de la RA por calor. Requiere una cuidadosa calibración. Entre los anticuerpos que se benefician con el tratamiento combinado se encuentran WT1 (6H-F5 y EP122), PAX8 (ZR1), PMS2 (EP51) y proteínas de la matriz extracelular como COLL-3 (polyclonal), COLL-4 (CIV-22), Tenascin (T2H5), LAM5 (γ) (D4B5).

2. Bloqueo de enzimas endógenas

Los dos tipos de enzimas utilizadas para la coloración en IHQ (peroxidasa y fosfata alcalina) se encuentran normalmente en una variedad de tejidos. Si la actividad endógena de estas enzimas no es bloqueada, al actuar sobre el sustrato y el cromógeno incorporados durante la etapa de coloración, se originaran señales que podrán interferir en el momento del análisis.

La enzima a bloquear dependerá de la enzima que se vaya a usar para la coloración, solo se bloqueara la FA cuando el sistema de coloración a utilizar se base en FA.

La actividad de peroxidasa se puede definir como cualquier actividad que da como resultado la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) originando agua y oxígeno atómico. Tal actividad es una propiedad común de todas las hemoproteínas, cuyo sitio activo tiene un grupo con contenido de hierro (hematina). Dentro de las hemoproteínas se encuentran hemoglobina (glóbulos rojos), mioglobina (células musculares), citocromo (granulocitos, monocitos) y catalasas (hígado y riñón). La actividad de la peroxidasa también puede encontrarse en tejido adyacente a áreas vascularizadas, debido a la difusión de células sanguíneas antes de la fijación. La actividad de la peroxidasa puede ser inhibida por exceso de sustrato (H_2O_2). El complejo que se forma entre la peroxidasa y el exceso de peróxido de hidrógeno es catalíticamente inactivo y en ausencia de un donante de electrones (cromógeno) causa el bloqueo de la actividad endógena de la peroxidasa.

El bloqueo de la peroxidasa puede realizarse antes o después de la incubación con el anticuerpo primario, pero es importante saber que el H_2O_2 puede dañar algunos epítopos antigénicos por ello existen clones que exigen realizar el bloqueo luego de la incubación con el anticuerpo primario Ej CD4 (1F6), Bcl6 (PG-B6p), Pax5 clones (1EW) y (24), etc. Consultar las especificaciones del anticuerpo primario brindadas por el fabricante.

La fosfatasa alcalina es una enzima que tiene varias isoformas y es producida en hígado, hueso, túbulos proximales del riñón, neutrófilos, folículos y zona del manto en tejido linfoide, intestino y placenta. La adición de levamisol al cromógeno/substrato inhibirá la actividad de la fosfatasa alcalina endógena, con la excepción de la isoforma intestinal. Si es necesario, esta puede bloquearse con un lavado ácido débil, como HCl 0.03–0.5N.

La biotina es otro componente endógeno que puede interferir con la apropiada interpretación de los patrones de coloración cuando se usan sistemas de detección basados en estreptavidina/biotina (LSAB o ABC modificado) ya que la estreptavidina posee cuatro lugares de unión para la biotina. Por el contrario la biotina no interfiere con los sistemas de detección basado en polímeros. Los tejidos con mayor contenido de biotina son riñón e hígado menos cantidades se encuentran en el tracto gastrointestinal, tejido linfoide (histiocitos paracorticales), pulmón, tejido nervioso central, mama y bazo. Para bloquear esta unión, un bloqueo de avidina/biotina puede aplicarse a los cortes del tejido que contengan cantidades de moderadas a altas de esta vitamina. El bloqueo se realiza en dos etapas: primero los cortes son incubados con avidina (1mg/ml durante 20 minutos) que bloquea la biotina endógena y luego incubados con biotina (0.1mg/ml durante 20 minutos) que bloquea la avidina añadida.

3. Anticuerpo Primario

Anticuerpo: Molécula con capacidad de unirse en forma específica a otra molécula o proteína llamada antígeno. Son glicoproteínas con forma de “Y” pertenecientes al grupo de las inmunoglobulinas (Ig), producidas por las células plasmáticas en respuesta a un estímulo antigénico.

Cada Ig está compuesta de dos cadenas pesadas -H- (*Heavy*) idénticas y dos cadenas livianas -L- (*light*) idénticas (Ver figura1). La diferencia entre las distintas clases y subclases de Ig radica en las propiedades antigénicas y estructurales de las cadenas H (α , δ , ϵ , γ , μ). Las dos cadenas L son de clase kappa o de clase lambda. En cada molécula de Ig existen áreas globulares llamadas dominios que pueden ser -C- constantes (extremo carboxilo terminal) o variables -V- (extremo amino terminal). El dominio variable de la cadena liviana (VL) y el dominio variable de la cadena pesada (VH) forman juntos el sitio de unión con el antígeno llamado paratope.

La digestión de la molécula de Ig con la enzima papaína da lugar a dos fragmentos específicos de unión al antígeno -*Fab*- (*antigen binding*) y un fragmento cristalizable o *Fc* (Ver figura 2). El *Fc* proporciona determinantes antígenicos que son comunes a todos los individuos de la especie, hecho de gran importancia en IHQ para la detección del anticuerpo primario por medio de anticuerpos secundarios antiespecie. El anticuerpo secundario debe ir dirigido contra la especie del primario, por lo que es fundamental conocer este dato. Si el anticuerpo primario se produjo, por ejemplo, en ratón, el secundario deberá ser un anti-ratón obtenido en una especie diferente a ésta. Un sistema de detección anticonejo no permitirá detectar anticuerpos primarios de ratón.

En IHQ de las cinco clases de Ig existentes (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), la IgG (en particular IgG1 e IgG2a) y en menor medida la IgM son las utilizadas con mayor frecuencia.

Figura 1 • Diagrama mostrando la estructura de una molécula de Ig. Incluye dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas livianas (L) idénticas.

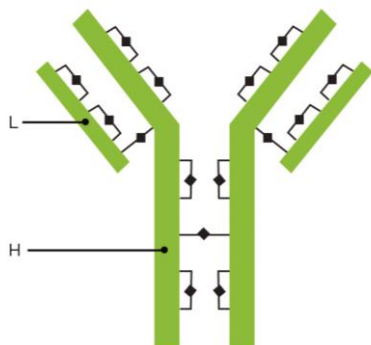
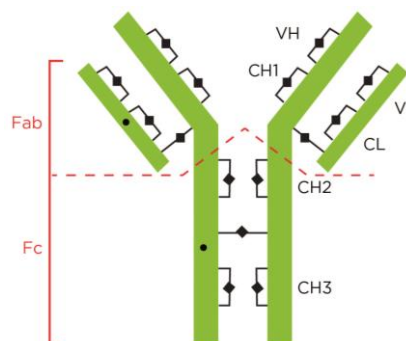


Figura 2 • Las cadenas H y L están compuestas de dominios variables (V) y constantes (C).



Los anticuerpos que empleamos en IHQ son creados mediante la administración de antígenos específicos en animales. Se utilizan Ig porque son fáciles de producir y son solubles (no se hallan vinculadas a una célula).

Antígeno: Sustancia o molécula capaz de desencadenar una respuesta inmunológica y de unirse a un anticuerpo. En IHQ un antígeno es toda aquella sustancia o molécula que queremos detectar. En general son proteínas pero pueden ser lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos. La unidad más pequeña de un antígeno que puede ser reconocida y unirse a un anticuerpo específico recibe el nombre de epítipo o determinante antigénico. Cada antígeno posee varios epítopes cada uno de los cuales es reconocido individualmente por un anticuerpo específico. Los determinantes antigénicos pueden ser *continuos*, compuesto por una secuencia lineal de 3 a 8 aminoácidos o más frecuentemente *discontinuos* o *conformacionales* constituidos por secuencias aminoácidas distantes puestas en contacto por el plegamiento conformacional de la estructura proteica.

Distintos antígenos pueden compartir uno o más determinantes antigénicos (esto explica las reacciones cruzadas).

Reacción antígeno-anticuerpo: El principio básico de cualquier técnica de IHQ es el de que un anticuerpo específico se unirá con un antígeno específico para dar un complejo anticuerpo-antígeno exclusivo. Se trata de una reacción altamente específica y reversible. Mínimas alteraciones en el antígeno pueden impedir que ella ocurra. Los anticuerpos no se unen de manera covalente a los antígenos sino que interactúan con ellos por complementariedad espacial. La interacción ocurre entre la región variable del anticuerpo (parátipo) y el epítipo. Los anticuerpos son inicialmente atraídos por interacciones electrostáticas (cargas electrostáticas positivas o negativas entre el anticuerpo y las opuestas en el antígeno) y luego la unión es estabilizada mediante enlaces débiles como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, que por lo general solo son efectivas en distancias cortas.

Los anticuerpos no sólo difieren con respecto a los epítopes antigénicos que reconocen sino también difieren en sus afinidades hacia el mismo. La afinidad de un anticuerpo está en parte determinada por la misma secuencia de aminoácidos de la región variable que determina la especificidad, sin embargo mayor especificidad no es sinónimo de mayor afinidad. En la afinidad "intrínseca" quien contribuye de manera más importante en la estabilización de la unión es la

suma de las fuerzas de atracción y de repulsión. El término afinidad describe la fuerza del enlace entre un único epítipo y el punto de unión del anticuerpo (parátipo).

En IHQ lo que importa es la afinidad “funcional” de un anticuerpo definida por el tiempo que requiere para alcanzar el equilibrio con el antígeno tisular. Si alícuotas iguales de dos anticuerpos de título idéntico son incubados con el antígeno tisular, el anticuerpo que alcance primero el nivel de la máxima intensidad de coloración, es el de la afinidad funcional más alta. El término “avidez” es usado como sinónimo de afinidad funcional y también se lo utiliza para describir la suma total de todas las afinidades intrínsecas encontradas en una población de anticuerpos policlonales.

La especificidad es la probabilidad de un anticuerpo particular de unirse a un epítipo antigénico preciso y de no reaccionar con epítipos frente a los cuales no está dirigido. Es una capacidad discriminatoria entre epítipos. Por lo tanto un anticuerpo es muy específico cuando no presenta reacciones cruzadas y la posibilidad de obtener falsos positivos es muy baja.

La sensibilidad se refiere a la cantidad mínima de antígeno que el anticuerpo es capaz de demostrar. Un anticuerpo muy sensible es capaz de unirse a su antígeno aunque este se encuentre en baja concentración. Un anticuerpo poco sensible requiere altas concentraciones del antígeno para que la unión antígeno anticuerpo tenga lugar. Por lo que un anticuerpo poco sensible puede originar falsos negativos.

Tipos de Anticuerpos

Anticuerpos Policlonales: Los anticuerpos policlonales, antisueros o sueros policlonales, son una mezcla de Ig sintetizadas por diferentes clones de células plasmáticas y que reaccionan con distintos epítipos sobre el antígeno para el cual fueron creados (ver figura 3). Se obtienen por extracción del suero de un animal (habitualmente conejos) previamente inmunizado con el antígeno que se pretende estudiar.

Ventajas: La presencia de anticuerpos humanos contra proteínas del conejo es mucho más rara que contra proteínas de otros animales. Al detectar varios epítipos antigénicos tienen gran avidez y alta sensibilidad ya que aunque alguno de los epítipos se destruya durante el procesamiento quedarán otros epítipos que serán reconocidos, proporcionando así un ensayo más robusto (es raro obtener falsos negativos). Menor costo

Desventajas: Mayor incidencia de reacciones cruzadas (inespecificidad - background) porque reconocen muchos sitios antigénicos. Reconocen antígenos conformacionales. El lote de cada anticuerpo es irreproducible. No se sabe que epítipo está reconociendo. Disponibilidad limitada.

Anticuerpos Monoclonales: Pueden producirse en ratones o conejos. Son el producto de un clon único de células plasmáticas, de manera que las moléculas de anticuerpos son todas inmunohistoquímicamente idénticas con una sola especificidad (reaccionan con un único epítipo en el antígeno contra el cual han sido originados) y una sola afinidad (ver figura 4).

Ventajas: Alta Especificidad, pureza, disponibilidad comercial, reproducibilidad. Reconocimiento de epítipos lineales. Si bien son menos sensibles (con posibilidad de falsos negativos) que los anticuerpos policlonales, porque reconocen un solo epítipo antigénico, en la práctica

generalmente puede compensarse con el uso de sistemas de detección de gran sensibilidad y sistemas de amplificación.

Desventajas: Imposibilidad de eliminar reactividad cruzada en caso de epitopes compartidos por dos o más antígenos. Menor estabilidad al PH y concentración salina que los anticuerpos policlonales. Más caros.

Ciertos monoclonales de conejo han mejorado significativamente la demostración de antígenos desafiantes, como Cíclina D1, receptor de estrógeno y CDX2, proporcionando mayor sensibilidad y robustez al estudio IHQ, mientras que en otros casos la especificidad entre monoclonal de conejo y ratón es análoga.

Por ello la elección final para usar un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo monoclonal de conejo o un policlonal debe ser determinado en forma individual teniendo en consideración que el resultado final depende de muchos parámetros.

Figura 3 • Anticuerpos policlonales uniéndose a diferentes epitopes del Antígeno

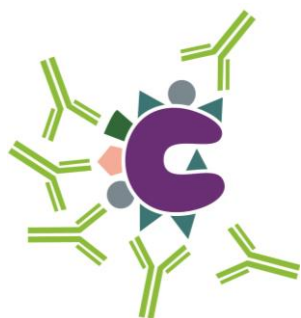


Figura 4 • Anticuerpos monoclonales uniéndose a epitopes específicos del Antígeno



Los anticuerpos policlonales contiene un espectro de afinidades por ello es menos probable que con los lavados se produzca una pérdida importante de coloración. Por el contrario los anticuerpos monoclonales tienen una afinidad uniforme, y si la afinidad es baja, la pérdida de coloración seguramente se deba a la disociación del anticuerpo de su epitope. Es por ello que, de ser posible, deberán ser seleccionados anticuerpos monoclonales de alta afinidad.

Durante los lavados de los espécimen deben evitarse los factores (altas concentraciones de sal, alta temperatura y un pH bajo) que debilitan la unión antígeno-anticuerpo. La agitación suave durante los lavados ayuda a reducir la coloración de fondo.

Título de Anticuerpos

El título de un anticuerpo es la dilución del anticuerpo que resulta en una máxima coloración específica con el mínimo fondo. La dilución correcta, de manera precisa y consistente, de los anticuerpos contribuirá a la calidad de la tinción. Un anticuerpo diluido en exceso ofrecerá una técnica poco sensible con riesgo de falsos negativos. La titulación correcta deberá permitir observar tinción en tejidos con baja expresión del antígeno en cuestión.

En general los fabricantes ofrecen reactivos prediluidos o recomiendan las condiciones del anticuerpo que incluyen rangos de dilución, tiempo y temperatura de incubación y método de detección. La dilución óptima deberá determinarse mediante titulación. La forma recomendada

a tal fin consiste en seleccionar una temperatura y tiempo fijos de incubación (Ej 37° C durante 30 minutos; 4°C durante 12hs), testear una serie de diluciones experimentales (1:25; 1:50; 1:100; etc.) y seleccionar la dilución óptima.

El termino efecto prozona se refiere al resultado paradójico en el cual al concentrar en exceso, determinados anticuerpos, la señal disminuye o incluso desaparece.

Incubación de Anticuerpos

Tiempo de incubación: Además de la concentración (título) la reacción antígeno anticuerpo se verá influida por el tiempo y la temperatura de incubación. Conforme aumentan estos parámetros, mayor será la formación de complejos antígeno anticuerpo. Existe una relación inversa entre tiempo de incubación y título del anticuerpo. A mayor título del anticuerpo menor será el tiempo de incubación requerido para obtener resultados óptimos. El tiempo de incubación deberá ser el necesario para que el antígeno tisular se sature de anticuerpo.

Los tiempos de incubación pueden variar entre 30 minutos (usualmente el equilibrio no se alcanza con tiempos de incubación menores a 20 min) y 48hs. Para que un anticuerpo reaccione con suficiente intensidad con el antígeno en un corto periodo de tiempo, el anticuerpo deberá ser de alta afinidad y estar en una relativamente alta concentración. Los tiempos prolongados de incubación básicamente permiten economizar porque pueden usarse diluciones más altas. No se obtiene ningún beneficio prolongado la incubación más allá del tiempo en el que el antígeno tisular se satura con el anticuerpo.

El tiempo habitual de incubación en la técnica manual es de 1 hora a T° ambiente; 30-60 minutos o 37°C y de 12 horas o más en la heladera. Es de gran importancia estandarizar el tiempo de incubación a fin de evitar variaciones en la calidad de la técnica.

Temperatura de incubación: El equilibrio de la reacción antígeno anticuerpo se alcanza más rápidamente a 37°. Temperaturas altas de incubación permiten mayor dilución del anticuerpo o disminución del tiempo de incubación. Lo más habitual es efectuar la incubación a T° ambiente o a 4°C (heladera). En todos los casos deberá realizarse en cámara húmeda con estricto control a fin de evitar la evaporación y el secado de los cortes, en especial en caso de incubar a 37°C.

La incubación a temperatura ambiente tiene como desventaja que impide estandarizar la técnica porque la temperatura varía diariamente.

La incubación a temperatura superior a los 37°C puede significar mayor fondo y además algunos anticuerpos no funcionan a temperaturas altas.

Tinciones No Deseadas

Se refiere a cualquier tinción positiva en el tejido en estudio que no es resultado de la reacción específica del anticuerpo con el antígeno contra el cual está dirigido.

Reactividad cruzada: Puede ocurrir cuando uno o varios epítopes del antígeno blanco están también presentes en otras proteínas del tejido (epítopes compartidos), en este caso el anticuerpo (mono o policlonal) va a reaccionar con todos ellos. Ej. El Pax8 (MRQ-50) muestra reacción cruzada con otras proteínas de la familia PAX (pax5 y Pax6); el CEA reacciona frente al antígeno NCA presente en los polimorfonucleares y frente a la glicoproteína biliar 1 de los canalículos biliares. Otra posibilidad es que un antígeno reaccione con varios anticuerpos diferentes.

Más raramente puede resultar de cambios inducidos dentro de uno o varios epítopes, durante la HIER, llevando a la posible pérdida de especificidad del anticuerpo por su antígeno. Anticuerpos de baja afinidad pueden unirse a epítopes similares o disimilares en antígenos no relacionados.

Tinción inespecífica de fondo: Suele ser el resultado de una combinación de interacciones hidrofóbicas, iónicas y electrostáticas entre proteínas tisulares y los reactivos empleados en la técnica de inmunohistoquímica. Estas fuerzas encargadas de la unión antígeno anticuerpo no ocurren de manera exclusiva entre el antígeno y los anticuerpos sino que se producen, en mayor o menor medida, con todas las proteínas tisulares en medio acuoso.

La hidrofobicidad hace referencia a la atracción mutua, con tendencia a unirse, de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano de una misma proteína o de proteínas diferentes, expeliendo agua de la molécula. Esta fuerza natural que por un lado confiere estabilidad a la estructura terciaria de las proteínas y estabiliza los complejos inmunes formados, es por otro lado una de las responsables de la coloración de fondo en inmunohistoquímica.

En el tejido, las proteínas se tornan más hidrofóbicas por la fijación de manera que la magnitud de los enlaces cruzados hidrofóbicos será mayor en tejidos sobrefijados, es por ello que una vez optimizados, los procedimientos de fijación, deben mantenerse y controlarse. Por otro lado la biotilación aumenta la hidrofobicidad de los anticuerpos.

Dado que los reactivos más importantes utilizados en la técnica son proteínas (las Ig están entre las proteínas más hidrofóbicas) serán susceptibles de unirse de manera inespecífica con proteínas de los tejidos.

Algunos de los tejidos que normalmente tienen una mayor coloración de fondo como resultado de las interacciones hidrofóbicas son: tejido conjuntivo (en particular el colágeno y en menor medida proteoglicanos y elastina), epitelio escamoso (queratinas) y adipocitos (lipoides).

La unión hidrofóbica entre el anticuerpo primario monoclonal y las proteínas del tejido también pueden ser influenciada por la formulación del buffer diluyente. A mayor proximidad entre el pH del diluyente y el punto isoelectrico (p_i) del anticuerpo, mayor será la interacción hidrofóbica. A menor fuerza iónica (concentración de sales) del diluyente, menor será la fuerza de atracción hidrofóbica.

Los bloqueantes de proteínas (suero normal, albumina de suero bovino al 1% (BSA) o caseína) tiene como objetivo minimizar la absorbancia de los reactivos inmunohistoquímicos por parte de proteínas tisulares inespecíficas. Al ocupar los sitios de unión de las proteínas tisulares con proteína bloqueante antes de (o durante) las incubaciones con los reactivos inmunohistoquímicos, las señales inespecíficas se puede reducir en gran medida. A tal fin se podrá: incubar los cortes con suero normal (que deberá ser de la misma especie de la del anticuerpo secundario) de manera inmediatamente previa a la incubación con el anticuerpo primario. Adicionar al dilutor del anticuerpo primario albumina o caseína. Añadir tween 20 (0.01-0.05%) al recuperador antigénico, al dilutor del anticuerpo primario o al TBS a utilizar en los lavados que siguen a la incubación con el anticuerpo primario y tras los pasos siguientes. En el caso de los anticuerpos policlonales se puede lograr elevando el pH del diluyente.

De igual manera las interacciones iónicas y electrostáticas se encuentran entre los factores que pueden contribuir a la coloración de fondo como resultado de la interacción iónica de los anticuerpos de carga positiva o negativa con las proteínas del tejido de carga opuesta.

Otras causas de tinción no deseada están relacionadas a:

- Actividad de enzimas y biotina endógenas (Ver bloqueo de peroxidasa). En ocasiones puede verse actividad intersticial de la peroxidasa como resultado de la difusión de sangre previa a la fijación.
- Tinción de fondo específica como resultado de la difusión del antígeno a ser coloreado desde sus sitios de síntesis o almacenamiento hacia el tejido circundante. Ej difusión de la tiroglobulina hacia el tejido estromal circundante. De forma similar, la tinción de fondo específica puede resultar cuando el marcador del tejido se encuentra también en concentraciones altas en el plasma sanguíneo y ha perfundido el tejido antes de la fijación. Ej coloración del parénquima amigdalino con cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas particularmente cuando la fijación no fue realizada rápidamente y cuando los antisueros usados no se diluyeron suficientemente.
- Lesión física del tejido (tricción), secado del tejido antes de la fijación, penetración incompleta del fijador en el tejido.
- El secado de los cortes en cualquiera de las etapas de la técnica puede originar tinción inespecífica especialmente a nivel de los bordes (*edge effect*). Aun cuando durante la incubación no ocurre un secado total, la evaporación del diluyente del anticuerpo o del sistema de detección originara una concentración de los mismos que pueden originar problemas de fondo.
- En el caso de los anticuerpos policlonales puede deberse a la presencia de anticuerpos naturales o contaminantes.
- Tinción inespecífica secundaria a la HIER Ej. Tinción nucleolar inespecífica con CD20 en células no tumorales. Tinción atípica de membrana y citoplasma en el cáncer de mama con Ki67 (MIB1).

Los aspectos más importantes para asegurar la especificidad de la técnica son: adecuada dilución del anticuerpo primario, evitar la evaporación durante la incubación y que los lavados sean rigurosos (es más eficaz realizar 3 lavados cortos de 3 minutos cada uno que uno largo).

Falso Negativo

Falta de reactividad de un anticuerpo frente al antígeno para el que está diseñado. Suelen ser los más difíciles de detectar. Puede ser debidos a: factores preanalíticos (tiempo excesivo de IF, sobrefijación, inadecuado desparafinado); Factores analíticos (HIER inadecuada, dilución excesiva del anticuerpo primario u otro de los reactivos utilizados, tiempo de incubación insuficiente, omisión de alguna de las etapas u orden inadecuado de las mismas, empleo de reactivos vencidos) o Factores postanalíticos (deshidratación y montaje luego del uso de cromógenos solubles en alcohol, contratinción excesiva, interpretación errónea).

Elección de Anticuerpos Primarios

La selección del anticuerpo primario y las condiciones analíticas aplicadas tienen un impacto significativo con respecto a la sensibilidad y especificidad del diagnóstico IHC y por lo tanto en el manejo de los pacientes. Siempre deben utilizarse anticuerpos de buena calidad. Un anticuerpo primario ideal debe ser altamente sensible, altamente específico, reproducible y robusto (no influenciado por factores preanalíticos).

Antes de comprar un anticuerpo es conveniente realizar un análisis exhaustivo, de cada uno de los clones disponibles para el anticuerpo en cuestión. Deberá evaluarse: sensibilidad; especificidad; utilidad para el propósito; dependencia de la composición química de los reactivos, de la secuencia de aplicación de los mismos y de la plataforma de tinción IHC utilizada por el laboratorio. Es también importante tener en cuenta que la sensibilidad de un mismo clon

puede variar según el fabricante. A fin de tomar la mejor decisión se podrán consultar las recomendaciones dadas por el fabricante, datos de protocolos establecidos (www.nordiqc.org) y/o publicaciones.

Cada decisión podrá aparejar grandes diferencias en el resultado final. Muchos anticuerpos como por EJ. El cóctel de anticuerpos monoclonales de ratón AE1 / AE3 contra “Pan-citoqueratina” y el anticuerpo policlonal de conejo contra S100, llevan años o décadas en el mercado y, todavía proporcionan excelentes resultados de tinción, mientras que otros anticuerpos con baja sensibilidad y/o especificidad deben ser reemplazados en cuando se dispone de un anticuerpo nuevo y mejorado. De igual manera para ciertos epítopes, muchos diferentes anticuerpos, incluidos monoclonales de ratón, monoclonales de conejo y policlonales, se pueden usar con resultados similarmente buenos, mientras que para otros epítopes, la elección del anticuerpo primario es mucho más crítica. Por ejemplo, para la Ciclina D1 solo los monoclonales de conejo clones SP4 y EP12 pueden ser utilizados para obtener buenos resultados.

Errores más comunes relacionados con la elección del anticuerpo 1rio

- Anticuerpo de baja sensibilidad: Existen diferencias de sensibilidad efectiva para muchos de los anticuerpos más comúnmente usados y es obligatorio visualizar todo el rango de expresión del antígeno diana en la muestra de tejido analizada. Un ejemplo importante ocurre con el CD5 cuya demostración es importante durante la inmunofenotipificación de los linfomas de células B pequeñas. Las células B neoplásicas típicamente solo expresan cantidades limitadas de CD5, en comparación con la alta expresión de los linfocitos T normales mezclados. Los anticuerpos poco sensibles como es el caso de clon CD5/54/F6 pueden mostrar un resultado de tinción de IHC aceptable en las células con altos niveles del antígeno diana (células T), pero un rendimiento inferior en células con niveles bajos (células B neoplásicas). Por el contrario los clones 4C7 y SP19, de ratón y conejo respectivamente, detectan CD5 en sitios de expresión baja y alta. (Ver tablas 5 y 6). Otros Ej de clones con baja sensibilidad son ALK (ALK1) y GATA3 (HG3-31).

La baja sensibilidad es difícil de identificar y causa de falsos negativos. Para evaluar la sensibilidad deben utilizarse controles con baja expresión del antígeno en cuestión.

- Anticuerpo de baja especificidad y/o pobre relación señal - fondo (Ver tabla 5). Otros Ej incluyen MUM1 Clon MRQ-43&BC5; CK-HMW clon 34BE12; RP clon 1E12; P40 y SOX10 policlonales.

TABLA 5 • Clones de anticuerpos sensibles y específicos (NordiQC)

Antígeno	clon	Alto expresador	Bajo expresador sensibilidad	No expresador especificidad
CD3	LN10,2GV6	✓	✓	-
CD3	Poly A0452	✓	✓	(+)- (Epitelio)
CD5	SP19	✓	✓	-
CD5	4C7	✓	✓	(+)- (Epitelio)
CD8	4B11,C8/144B	✓	✓	-
CD8	SP57	✓	✓	(+)- (Epitelio)
MUM1	EUA32,MUM1p	✓	✓	-
MUM1	MRQ-43	✓	✓	(+)- (Epitelio)
OCT3/4	C10,N1NK	✓	✓	-
OCT3/4	MRQ-10	✓	✓	(+)- (Neuroendo)
PLAP	NB10	✓	✓	-
PLAP	8 ^a 9	✓	✓	(+)- (musculo)
WT1	WT49	✓	✓	-
WT1	6F-H2	✓	✓	(+)- (Epitelio)

TABLA 6 • Clones de anticuerpos pocos sensibles o poco específicos (NordiQC)

Antígeno	clon	Alto expresador	Bajo expresador	No expresador
CD5	CD5/54/F6	✓	FN	-
CD23	MHM6	✓	FN	-
CD31	1A10	✓	FN	-
CD31	SP38	✓	FN	-
CD138	5F7	✓	FN	-
CDX2	SP34	✓	FN	FP
CEA	TF-3H8-1	✓	✓	FP
CGA	DAK.A3	✓	FN	-
CK20	PW31	✓	✓	-
CK-LMW	35BH11	✓	FN	-
MLH1	EPR3894	✓	✓	FP
MSH2	EPR3943	✓	✓	FP

- Anticuerpo no adecuado al propósito: Además de la sensibilidad y especificidad, al momento de seleccionar un anticuerpo debe tenerse también en consideración si el anticuerpo y/o el clon seleccionados van a ser útiles para el propósito para el cual lo queremos emplear (especificidad para diferentes usos). Un Ej de esto es el anticuerpo monoclonal contra citoqueratina de alto peso molecular (CK-HMW) de ratón clon 34 β E12. Este anticuerpo se ha demostrado particularmente valioso para la demostración de citoqueratina de alto peso molecular en células basales de las glándulas próstáticas permitiendo el diagnóstico diferencial de invasividad y no invasividad. Por el contrario y a pesar del idéntico fin, el uso del clon 34 β E12 no es recomendable en el caso de patología mamaria ya que muestra falsos positivos por reacción cruzada. En este caso se recomienda el empleo del Clon D5/16B.
- Otros puntos a considerar en el rendimiento:
 - Dependencia de la composición química de los reactivos (tipo y PH del buffer de HIER): Si el laboratorio realiza la HIER de todos sus anticuerpos en EDTA PH8, sería inconveniente seleccionar un clon que requiera HIER en buffer citrato PH6.

- Dependencia de la secuencia de aplicación de los reactivos: Ej. clones cuyo rendimiento se ve perjudicado si el bloqueo de la peroxidasa endógena se realiza mediante el uso de un H₂O₂ 3% antes de la incubación con el anticuerpo primario.
- Dependencia de plataforma y/o sistema de detección: Existen clones cuyo rendimiento se ve perjudicado por el uso de determinadas plataformas o sistemas de detección. Siguiendo con el ejemplo de los clones 1F6 (CD4) y PG-B6p (bcl6) el inconveniente que presentan en relación a la secuencia de aplicación de los reactivos puede ser subsanado en caso de técnica manual pero su uso en plataformas automatizadas que no permiten modificar el protocolo podría no proporcionar el resultado de tinción deseada (Ver tabla 7).

TABLA 7 • Dependencia de la secuencia de aplicación de los reactivos y de plataformas (NordiQC)

ANTÍGENO	CLON	XT/ULTRA	AUTOSTAINER	BOND-MAX
CD4	1F6,4B12	FN (1)	✓	✓
CD4	SP35	✓	✓	✓
CD5	4C7	FP	✓	✓
CD5	SP19	✓	✓	
CD79a	JCB117	Débil	✓	
CD79	SP18	✓	✓	✓
ASMA	1A4	✓ (Débil)	✓	✓
PAX5	24	FN	✓	Débil/Negativo
PAX5	SP34	✓	✓	✓
BCL6	PG-B6p	FN (1)	✓	✓
BCL6	G1191E/A8	✓	✓	✓
Oct2	OCT-207	FN	✓	✓
Oct2	MRQ-2	✓	✓	✓

FN (1): Falso negativo por bloqueo de peroxidasa endógena luego de la HIER y antes de la incubación con el anticuerpo primario.

- Titulación incorrecta (muy concentrado/muy diluido).
- El anticuerpo seleccionado también debe proporcionar alta robustez y dar un resultado consistente y confiable solo mínimamente influenciado por las variantes preanalíticas y otras variables inevitables de la técnica. Anticuerpos que requieren HIER debería ser preferibles a aquellos que requieren pretratamiento enzimático, ya que la HIER reduce el impacto de las variaciones en el tiempo de fijación con formol en comparación con el pretratamiento enzimático. Un Ej es lo que ocurre con los dos anticuerpos monoclonales de ratón contra la citoqueratina de amplio espectro clones AE1 / AE3 y MNF116 si los comparamos, ambos reaccionan con los subtipos más relevantes de citoqueratina sin embargo, el clon MNF116 requiere pretratamiento enzimático, reduciendo la solidez de la técnica cuando se la compara con el ensayo usando el clon AE1 / AE3.

4. Diluyentes

La conformación del anticuerpo depende en gran medida del medio acuoso y las formulaciones de los diluyentes pueden alterar la estabilidad y las propiedades de unión de los anticuerpos, afectando tanto la especificidad por el epítopo como las interacciones "no específicas" con la Fc de la molécula de anticuerpo.

El pH del diluyente puede ser un determinante importante de la efectividad y deberá optimizarse para cada anticuerpo. También afecta negativamente el funcionamiento de los anticuerpos el añadido de iones Na⁺ al buffer de Tris.

Casi todos los anticuerpos monoclonales pueden diluirse más alto y teñirse más intensamente a pH 6.2-7.3 y casi todos se tiñen más intensamente en ausencia de NaCl. De manera que la recomendación es realizar la dilución con Tris sin Na+ añadido (Tris 0.05M PH 6.2-7.3). El PH adecuado deberá definirse para cada anticuerpo.

Un pH 7.3-7.4 es un buen punto de partida para la optimización y en función de la relación señal/fondo disminuir o elevar el pH del tampón diluyentes en 0,5 unidades de pH.

Los anticuerpos monoclonales son más sensibles al pH y a los iones del tampón diluyente que los anticuerpos policlonales.

Algunos Anticuerpos que se benefician con PH 6.2

ALK (1A4), Calretinina (CAL6), CD4 (EP204), CD5 (SP19), CMYC (EP121),GATA3 (L20-823), GPC3 (1G12), IMP3 (69.1), MLH1 (ES05 & GM011), MSH2 (G219-1129), MSH6 (EP49), NKX 3.1 (poly), SALL4 (6E3), PAX8 (ZR1), PMS2 (EP51), SOX10 (EP268), SOX11 (C1 & MRQ58), TdT (SEN28 & EP266), UP-II (BC21), WT1 (WT49).

Alguno Anticuerpos que se benefician con PH 7.3

BCL2 (124), BCL6 (clones LN22; PG-B6p y GI191E/A3), Calretinina (DAK-Calret1), CD163 (MRQ26), CD21 (2G9), CD5 (4C7), Receptor de estrógeno (SP1), HHV8 (13B10), Mammaglobina (304-1A5), MUC5AC (CLH2), MUC6 (CLH5).

Se demostró que el empleo de PBS como diluyente disminuye la sensibilidad de la reacción inmune entre la mayoría de los antígenos tisulares y anticuerpos monoclonales.

En términos generales, cuanto más diluido es el anticuerpo, menos estable es la solución de trabajo. Las soluciones de anticuerpos altamente diluidas no deben usarse por más de unos días.

El pH de los tampones basados en Tris es sensible a los cambios de temperatura por ello deberán ser preparados a la misma temperatura a la que serán utilizados. Teniendo en cuenta que la refrigeración y la calefacción pueden causar cambios en el pH deberá permitirse que los reactivos se equilibren a la temperatura ambiente antes del uso.

La solución salina tamponada con fosfato (PBS) no debe ser utilizada como diluyente a menos que sea específicamente recomendado por el fabricante del anticuerpo.

En el caso de equipos automatizados el efecto total del dilutor de anticuerpo se puede ver además influenciado por la plataforma elegida.

Cuando se utiliza la fosfatasa alcalina como enzima marcadora evite usar Buffer de fosfato ya que estos inhiben la actividad de la enzima.

Otra opción es el uso de dilutores comerciales cuyo uso debe evaluarse teniendo en cuenta que su formulación en muchos casos puede alterar significativamente la estabilidad y las propiedades de unión del anticuerpo afectando la especificidad por el epítopo y las uniones inespecíficas. La mayoría de ellos se basan en Tris-HCl pH 7-7.6 y frecuentemente contienen, un detergente, NaCl y estabilizantes como la azida sódica, un agente antibacteriano que pueden reducir la reactividad de los anticuerpos e interferir con la unión de la enzima peroxidasa a su sustrato inhibiendo el desarrollo del color. Algunos diluyentes también contienen componentes reductores de fondo basados en proteínas tales como albúmina de suero bovino o proteínas séricas. Los diluyentes que contienen suero deben usarse con precaución ya que la unión al

anticuerpo primario puede causar una reducción en la sensibilidad, y la unión al anticuerpo secundario pueden dar lugar a resultados positivos falsos.

5. Sistemas de Detección

Para que la unión del anticuerpo con el antígeno pueda ser vista al microscopio es necesario emplear sistemas de detección y métodos de coloración que permitan su visualización.

A. Método de Estreptavidina- Biotina

Este método de coloración inmunohistoquímico, está basado en la alta afinidad que la estreptavidina (glicoproteína de alto peso molecular contenida en la bacteria *Streptomyces Avidinii*) tienen por la biotina. Antes de la estreptavidina (Método ABC modificado) se utilizaba la avidina, proteína presente en la clara de huevo, (Método ABC). La biotina (vitamina de bajo peso molecular que se encuentra en la yema de huevo) se conjuga fácilmente con anticuerpos y enzimas marcadoras por ligarse de forma covalente a cadenas laterales amino o carbonilo. Pueden unirse hasta 150 moléculas de biotina por una sola molécula de anticuerpo.

La estreptavidina posee cuatro sitios de unión para la biotina, pero a causa de la orientación molecular de los sitios de unión, menos de cuatro moléculas de biotina se unirán realmente.

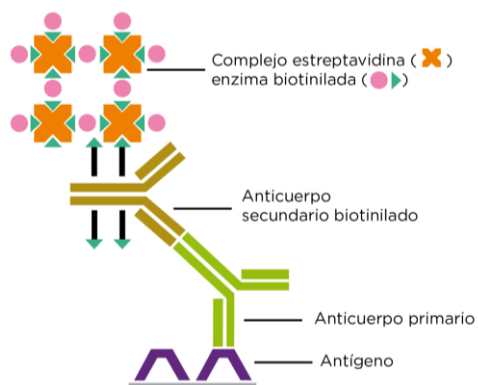
El único requerimiento es que la enzima (peroxidasa/fosfatasa alcalina) tenga al menos dos moléculas de biotina unidas. De manera que el anticuerpo secundario conjugado con biotina actúa como puente entre el anticuerpo primario, unido al epítipo antigénico, y el complejo "estreptavidina/enzima biotinilada". A su vez la enzima biotinilada actúa de puente entre las estreptavidinas (Ver figura 5).

Otra opción es el uso de estreptavidina directamente marcada con la enzima (*Labeled streptavidin-biotin-LSAB-*) (Ver figura 6). La ventaja de este método respecto al ABC son su mayor sensibilidad y la estabilidad del complejo estreptavidina-enzima que a diferencia del complejo ABC, que debe prepararse en el momento de su empleo, puede ser diluido y almacenado durante largos periodos de tiempo.

Ambos métodos (ABC modificado y LSAB) concluyen con la solución de sustrato cromógeno, que es convertido en un producto final de color marrón por las múltiples enzimas peroxidasa unidas al sitio antigénico blanco. En ambos métodos múltiples moléculas de peroxidasa se unen a cada anticuerpo primario y así, en comparación con los métodos directos, la unión con el antígeno es considerablemente amplificada.

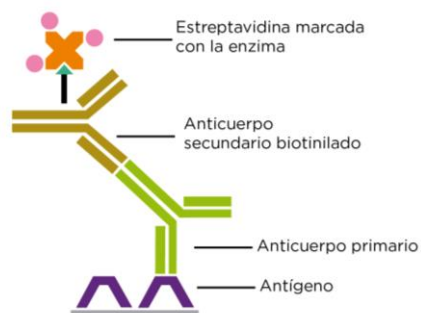
El principal inconveniente de estos métodos basado en biotina es que si bien la fijación en formol y la inclusión en parafina enmascaran la biotina endógena podrán dar "fondo" en especial en hígado y riñón.

Figura 5 • Método ABC modificado



Los pasos en la tecnología ABC modificada incluyen paso1 Anticuerpo 1rio. Paso2 anticuerpo 2rio biotinilado. Paso 3 Complejo estreptavidina/enzima biotinilada

Figura 6 • Método LSAB

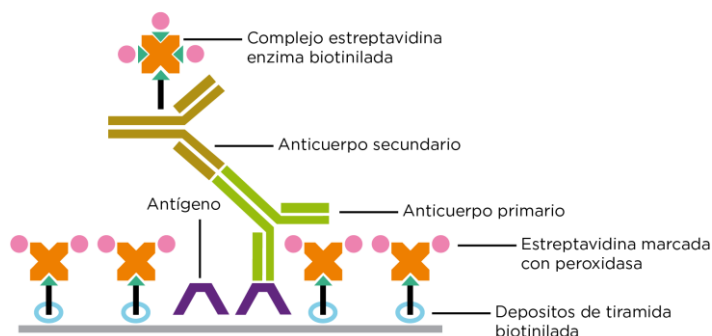


Los pasos en la tecnología LSAB incluyen paso1 Anticuerpo 1rio. Paso2 anticuerpo 2rio biotinilado. Paso 3 estreptavidina marcada con la enzima.

Procedimiento ABC utilizando amplificación catalizada de la señal (CSA)

La amplificación catalizada de la señal (CSA) utiliza un reactivo de amplificación siguiendo al uso del complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa del protocolo ABC modificado. El reactivo de amplificación contiene un substrato fenólico (tiramida biotinilada) que es catalizado por la peroxidasa unida al complejo estreptavidina-biotina para formar fenoles biotinilados insolubles los cuales se unen a proteínas próximas a la peroxidasa y por lo tanto al sitio de unión antígeno anticuerpo. En un paso siguiente las biotinas depositadas reaccionaran con nuevos complejos de estreptavidina marcada con peroxidasa produciendo el depósito de moléculas de enzima adicionales. La aplicación de tiramida biotinilada y complejos de estreptavidina-peroxidasa puede repetirse en varios ciclos incrementando así la señal, aunque también aumenta el fondo, por ello en la práctica no suele realizarse más de 2 o 3 ciclos (Ver Figura 7).

Figura 7• Tecnología usando CSA



En la tecnología utilizando CSA siguiendo el uso del complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa del protocolo ABC pasos 5 a 7. Los pasos serán: Paso 8 incorporación del reactivo de amplificación (tiramida biotinilada) que será catalizado por la peroxidasa unida al complejo estreptavidina-biotina para formar fenoles biotinilados insolubles, los cuales se depositan en la proximidad del antígeno. Paso 9 Aplicación de estreptavidina-peroxidasa para la detección de las biotinas depositadas. Los pasos 8 y 9 pueden repetirse 2-3 ciclos.

B. Sistemas de detección indirectos basados en polímeros

1. Sistema EPOS (Enhanced Polymer One-Step Staining)

Esta tecnología utiliza una molécula inerte hidrosoluble de dextrano conjugada covalentemente tanto con el anticuerpo primario como la enzima. Pueden adherirse unas 10 moléculas de anticuerpo y hasta 70 moléculas de enzima.

Ventajas: Es una técnica muy rápida porque consta de un único paso (técnica directa). Evitan el uso de biotina y por lo tanto la coloración inespecífica que resulta de la biotina endógena. Amplifica hasta 10 veces la señal primaria obtenida con los complejos tradicionales de estreptavidina- biotina. Prolongando los tiempos de incubación con el anticuerpo primario y el polímero marcado se pueden utilizar diluciones de anticuerpo varias veces más altas que aquéllas usadas en los protocolos ABC modificado o LSAB habituales. Desventaja: Poca versatilidad ya que solo pueden utilizarse los anticuerpos primarios que hayan sido conjugados con el polímero por el proveedor.

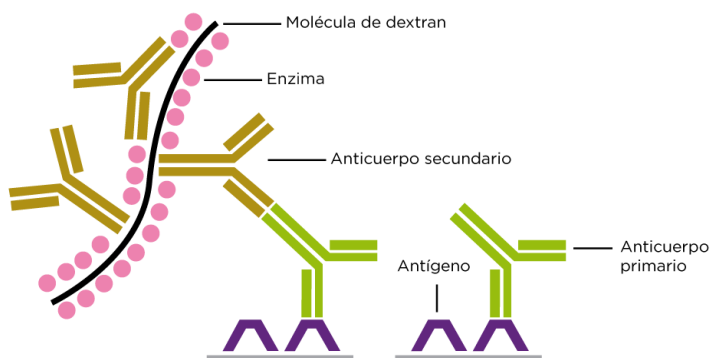
2. Método de polímero en DOS Pasos

- Metodo EnVision

El anticuerpo secundario está unido a la molécula de dextrán, de tal forma que la coloración es realizada primero por incubación con el anticuerpo primario seguido por el polímero. La conjugación de anticuerpos secundarios tanto anti-conejo como anti-ratón hacen al sistema útil para anticuerpos primarios poli y monoclonales. El polímero lleva incorporadas unas 20 moléculas de anticuerpo antiespecie y alrededor de unas 100 moléculas de enzima (peroxidasa o fosfata alcalina) (Ver figura 8).

No hay acuerdo en relación a la sensibilidad de este sistema de detección algunos consideran que su sensibilidad es mayor que la del método ABC, otros opinan que tiene similar sensibilidad pero evita los inconvenientes de la biotina endógena y el fondo y otros lo consideran inferior al método LSAB.

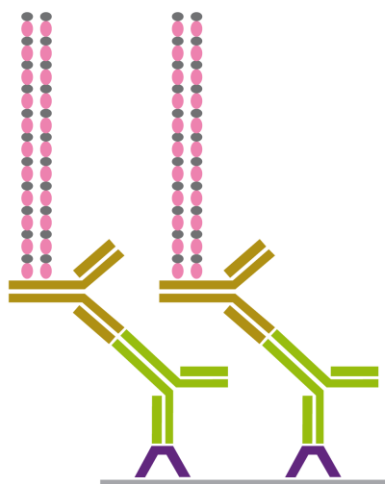
Figura 8 • Método EnVision



- Método PowerVision

Emplea pequeñas moléculas capaces de polimerizar con el anticuerpo secundario y con moléculas de enzimas de manera lineal y compacta a modo de “rascacielos”. Esta disposición permite la unión de múltiples conjugados a antígenos próximos, a los cuales el dextrano por su alta masa molecular y su compleja disposición tridimensional podría ver comprometido su acceso. Este sistema incrementa la sensibilidad y eficiencia (Figura 9).

Figura 9 • Método PowerVision



3. Método de polímero en TRES pasos

El agregando de un amplificador en un paso adicional, promueve una mejora en la sensibilidad. Sin embargo, debido al gran tamaño molecular de los polímeros conjugados, el acceso a ciertos epítopes puede verse dificultado, presumiblemente debido a impedimento estérico.

6. Enzimas y cromógenos

Basándose en la reacción enzima–sustrato los métodos de coloración inmunoenzimáticos utilizan enzimas para convertir cromógenos, sin color, en productos finales coloreados como resultado de su oxidación. Las enzimas son proteínas catalizadoras (sustancia que acelera o retarda una reacción química). Las dos enzimas usadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina.

Peroxidasa (HRP): Enzima aislada de la raíz de la planta del rábano. La hematina de la peroxidasa forma un complejo con el peróxido de hidrógeno (sustrato) dando como producto de reacción H_2O y oxígeno atómico (O). El oxígeno liberado provoca la oxidación del cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) originando un producto de color pardo e insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos lo que va a permitir la deshidratación de los cortes y el montaje en medio permanente.

Ventajas de la peroxidasa: Fácil de obtener en forma purificada. Estable. Pequeño tamaño que no interfiere con la unión de los anticuerpos. Amplio rango de cromógenos utilizables.

Inconvenientes de la Peroxidasa: Presencia en el tejido de peroxidasa endógena. La presencia de peroxidasa endógena se detecta mediante controles negativos en los que se incubó el tejido únicamente con el sustrato H_2O_2 y el cromógeno.

Fosfatasa alcalina: La enzima, obtenida del intestino del ternero, hidroliza los ésteres de naftol fosfato (Sustrato) dando origen a compuestos fenólicos y fosfatos. Los fenoles reaccionan con sales incoloras de DIAZONIO, (cromógeno) para producir colorantes insolubles azo. Varias combinaciones diferentes de sustratos y cromógenos se han utilizado exitosamente.

Cromógenos: Rojo Rápido (Fast Red TR) y Azul Rápido (Fast Blue BB) producen un color rojo o azul brillante en su producto final, respectivamente. Ambos son solubles en solventes alcohólicos u otros solventes orgánicos, por esto es imperativo usar un medio de montaje acuoso. Fucsina nueva también da un producto final de color rojo. A diferencia del Rojo Rápido TR y Azul Rápido BB, el color producido por la Fucsina Nueva es insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos, permitiendo deshidratar al espécimen antes de ser montado con cubreobjetos. La intensidad de la coloración obtenida de la Fucsina Nueva es mayor que la que se logra con el Rojo Rápido TR o el Azul Rápido BB.

Causas de falla de la técnica de inmunohistoquímica en la fase analítica

De acuerdo al estudio publicado por NordiQC luego de la evaluación de más de 300000 casos durante el periodo 2003-2015 con participación de más de 700 laboratorios de 80 países del mundo las causas más frecuentes de falla en la fase analítica fueron:

TABLA 8 • Causas más frecuentes de errores en la fase analítica (NordiQC)

1. ELECCIÓN INADECUADA DEL ANTICUERPO	17%
• Anticuerpo poco sensible o poco específico	
• Anticuerpo poco robusto	
• Anticuerpo listo para usar pobremente calibrado	
• Anticuerpo dependiente de la plataforma	
2. DILUCIÓN INADECUADA DEL ANTICUERPO PRIMARIO	20%
3. INSUFICIENTE O ERRÓNEA RECUPERACIÓN ANTIGENICA	27%
4. SISTEMA DE DETECCIÓN POCO SENSIBLE O PROPENSO A ERRORES	19%
5. OTRAS	17%
• Alteración morfológica secundaria a excesiva temperatura o tiempo de la recuperación antigénica o digestión enzimática	
• Secado del tejido	
• Protocolos dependientes de la plataforma	
• Excesivo contracolor	

FASE POSTANALÍTICA

Controles

Los Controles de la técnica de IHQ pueden ser:

1. De reactivos
 2. De tejidos
1. **Controles de reactivos:** Proporcionan información valiosa de la especificidad del anticuerpo primario y la técnica incluyendo sistemas de detección, demostrando que la reacción anticuerpo-antígeno se debe a la expresión del objetivo de interés. Habitualmente nos referimos a ellos como controles negativos. La positividad de controles negativos para el anticuerpo en cuestión debería permitir la identificación de falsos positivos y reacciones cruzadas. La rigurosidad de estos controles es básicamente función del fabricante.
 2. **Controles de tejido:** Se usan típicamente para mostrar que la técnica de IHC fue exitosa y útil para demostrar el objetivo de interés. Habitualmente nos referimos a ellos como controles positivos. Pueden ser internos o externos.

Controles de tejidos internos: Son células o tejidos que expresan el antígeno de interés y están presentes en la estructura normal de la muestra del paciente. Proporcionan información sobre parámetros preanalíticos y analíticos de la prueba IHQ.

Si los controles internos son positivos en general solo podemos concluir que las condiciones de procesamiento del tejido permiten la realización de técnicas de inmunohistoquímica y que la técnica se ejecutó de manera exitosa. Brindan también información en relación a la especificidad del anticuerpo primario Ej. Los linfocitos T deberán ser negativos para CD19, CD20, CD79a. Las células B de la zona del manto deberán ser negativas para Ki67, Bcl-6. Las células epiteliales deberán ser negativas para CD3, CD5, MUM1.

Uno de los inconvenientes más importantes de los controles internos es que no siempre están presente en la muestra analizada y cuando están, los niveles de expresión pueden no ser relevantes para la calibración de la prueba. A menudo, los componentes normales del tejido pueden expresar fuertemente el antígeno de interés, de modo que un resultado positivo puede dar una falsa seguridad del rendimiento de la prueba. Los anticuerpos poco sensibles pueden mostrar un resultado de tinción de IHC aceptable en las células con altos

niveles del antígeno diana, pero un rendimiento inferior en células con niveles bajos de expresión antigénica. Ej. CD5, CD15, CD34, CD45, CD56, S100, RE, RP etc. Por este motivo la positividad de los controles internos no excluye la posibilidad de falso negativo, tomando en consideración el distinto nivel de expresión antigénica existente entre controles normales y células tumorales.

De manera genérica los controles internos positivos no se recomiendan como evaluadores de la sensibilidad del anticuerpo.

Por el contrario en algunos casos la interpretación del resultado depende directamente de la clara demostración del control interno positivo, en estos casos los controles internos son esenciales y superiores a los controles externos como por Ej la evaluación de la CK5 en la próstata y la interpretación de proteínas expresadas ubicuamente MMR, PTEN y SMAD4/Dp4 donde la pérdida de expresión de proteínas en el tumor adyacente es diagnóstica.

Si los controles internos son negativos el estudio deberá repetirse o concluirse como inadecuado por las condiciones de procesamiento del tejido, para la realización de técnicas de inmunohistoquímica.

Controles de tejidos externos: Son la herramienta más valiosa para monitorear la especificidad y la sensibilidad de la técnica de IHC. En la práctica diaria son necesarios para:

- **Calibrar la técnica** permitiendo evaluar la robustez y el impacto de las condiciones preanalíticas E IDENTIFICAR EL MEJOR PROTOCOLO PARA CADA ANTICUERPO (clon, título, condiciones de la recuperación, etc.).

Toda vez que se incorpora un nuevo anticuerpo o se realiza un cambio de clon de un anticuerpo ya conocido se debe optimizar el protocolo de manera de obtener la señal más alta con menos fondo. Entre las herramientas destinadas a facilitar la optimización del protocolo de IHQ se podrán consultar datos de protocolos establecidos y/o publicaciones. El proceso de calibración u optimización debe realizarse en tejido procesado de la misma manera que el material de diagnóstico. Los factores de procesamiento a incluir son fijador(es) utilizado, rango de tiempo en la fijación, métodos de descalcificación (si es relevante) y las condiciones de deshidratación usadas en el laboratorio. Dado que de rutina, el material puede experimentar una enorme gama de tiempos de fijación es esencial que tejidos fijados en diferentes tiempos estén incluidos en el proceso de optimización de la técnica, con el fin de evaluar el impacto del tiempo de fijación.

Para el proceso de optimización técnica, es muy valioso realizar las pruebas en microarrays de tejidos (TMA) compuestos de Punch de diferentes tejidos normales. El uso de un TMA como se muestra en la Figura 10, permitirá evaluar la robustez (influencia de la fijación) e identificar el protocolo que proporciona el mejor resultado técnico para el anticuerpo en cuestión. El anticuerpo se puede aplicar en diferentes concentraciones p.ej. 1/50, 1/200 y 1/400 como punto de partida, y para todos los títulos seleccionados los diferentes métodos de recuperación de epítopes utilizados por el laboratorio pueden ser probados. En esta fase de la prueba se debe incluir la configuración del protocolo recomendado por el fabricante del anticuerpo primario.

Una vez identificado el protocolo que brinda el mejor resultado técnico para el nuevo anticuerpo, este protocolo y, en caso de corresponder, el protocolo del anticuerpo en uso deberá probarse simultáneamente y validarse en el mismo material. En este contexto, es de gran importancia que diferentes tejidos / enfermedades / neoplasias con una amplia gama de niveles de expresión del antígeno diana se prueben. Tejidos con alto nivel, nivel

bajo y ninguna expresión debe estar representado para evaluar tanto la sensibilidad como la especificidad (3 a 10 casos) Ver tablas 9 y 10.

Tanto en el proceso de optimización como en el de validación es muy recomendable que los tejidos normales estén incluidos ya que estos tejidos en general expresarán un nivel más constante de antígeno cuando se compara con neoplasias.

Durante este proceso, es crítico que los patrones de tinción, la distribución y localización subcelular de la tinción, el número de células demostradas y la intensidad de la tinción se evalúen para los anticuerpos que se comparan. En esta fase de evaluación, el foco debe centrarse en las razones por las cuales se inició la prueba (problemas técnicos o problemas de diagnóstico).

Figura 10 • TMA Para optimización del mejor protocolo



- **Controlar el desempeño** monitoreando que el nivel de detección establecido para ese anticuerpo se continúe obteniendo diariamente. Lo ideal es el uso de cortes de tejidos procedentes del propio laboratorio que aseguren que la fijación y el procesamiento fueron los mismos que en la muestra en estudio. Deberá utilizarse un control por cada vidrio (Ver figura 11). La negatividad de estos controles invalida el resultado. Lo recomendado es utilizar un control de tissue microarray en el que se encuentren representados tejido de baja, alta y ninguna expresión del antígeno en estudio (Ver figura 10 y Tablas 9 y 10).

Figura 11



Tabla 9 • Controles tisulares de alta, baja y no expresión (NordiQC)

Antígeno	Alto expresador	Bajo expresador	No expresador
PAN-CK	Apéndice	Hígado	Amígdala
CK-BAJO PESO	Apéndice	Hígado	Amígdala
CK-ALTO PESO	Amígdala	Páncreas	Hígado
CK7	Hígado	Páncreas	Amígdala
CK20	Apéndice	Apéndice	Amígdala
CD3	Amígdala	Apéndice	Amígdala
CD20	Amígdala	Apéndice	Apéndice
CD31	Amígdala	Hígado	Apéndice
DESMINA	Apéndice	Amígdala	Apéndice
ASMA	Apéndice	Hígado	Apéndice
SINAPTOFISINA	Apéndice	Apéndice	Amígdala
CROMOGRANINA A	Apéndice	Apéndice	Amígdala
TTF1	Tiroides	Pulmón	Amígdala
CDX2	Apéndice	Páncreas	Amígdala
S100	Apéndice	Amígdala	Apéndice
KI67	Amígdala	Amígdala	Amígdala

Tabla 10 • Tejidos para control de baja expresión de biomarcadores (NordiQC)

Apéndice	Hígado	Amígdala	Páncreas
CD2	ASMA	Bcl2	CDX2
CD3	CD4	Bcl6	CGA
CD19	CD31	CD2	SYP
CD34	CD34	CD3	CK7
CD117	CD45	CD4	PP
CEA	CD68	CD5	SMAD4
CGA	PAN CK	CD8	
CK20	CK LMW	CD10	
DOG1	CK8	CD20	
MMR	CK18	CD21	
S100	HEPA	CD23	
SYP	Arginasa	CD38	
		CD56	
		CD79A	
		CD138	
		PAN CK	
		CyD1	
		EMA	
		MMR	
		S100	

Indicadores críticos del rendimiento de la técnica de IHQ

Recientemente un Comité Internacional Especial de Expertos Ad Hoc ha desarrollado el concepto de iCAPCs (*Immunohistochemistry Critical Assay Performance Controls*). iCAPCs son en esencia los tejidos de control positivo que han sido bien caracterizados de acuerdo con los criterios acordados y que demuestran niveles predecibles y patrones de expresión y localización celular para proteínas específicas en condiciones definidas. Se ha propuesto que iCAPCs sea el componente clave de selección de controles para el desarrollo de controles destinados al monitoreo diario de tejidos (ver tablas 9 y 10). Algunos Ejemplos:

Pan Queratina

Apéndice (AE): Prácticamente todas las células epiteliales columnares deben mostrar tinción moderada a fuerte predominantemente citoplasmática (con típica acentuación de membrana).

Hígado iCAPCs (BE): La mayoría de los hepatocitos debe mostrar al menos una reacción de tinción citoplasmática débil a moderada con acentuación de membrana.

Amígdala: todas las células epiteliales escamosas deben mostrar una reacción de tinción citoplasmática de moderada a fuerte (AE). Células reticulares intersticiales positivas para citoqueratina con patrón dendrítico/reticular puede mostrar una reacción de tinción citoplasmática débil a moderada (BE).

CK8 y/o CK18 (citoqueratina de bajo peso molecular)

Apéndice (AE): Prácticamente todas las células epiteliales columnares deben mostrar tinción moderada a fuerte predominantemente citoplasmática con típica acentuación de membrana.

Hígado iCAPCs (BE): La mayoría de los hepatocitos debe mostrar al menos una reacción de tinción citoplasmática débil a moderada con una acentuación de membrana.

Amígdala: Todas las células epiteliales escamosas deben mostrar una reacción de tinción citoplasmática de moderada a fuerte (AE). Células reticulares intersticiales positivas para

citoqueratina con patrón dendrítico/reticular puede mostrar una reacción de tinción citoplasmática débil a moderada (BE).

CK5 y / o CK14 (citoqueratina de alto peso molecular)

Amígdala (AE): Prácticamente todas las células epiteliales escamosas a lo largo de todas las capas celulares debe mostrar una reacción de tinción citoplasmática de moderada a fuerte.

Páncreas iCAPCs (BE): Las células epiteliales dispersas de los conductos intercalados deben mostrar tinción predominantemente de membrana débil a moderada.

Hígado (NE): No se debe ver ninguna reacción de tinción.

CK 20

Apéndice: Prácticamente todas las células epiteliales superficiales deben mostrar una tinción citoplasmática de moderada a fuerte (AE). La mayoría de las células epiteliales de las criptas basales deben mostrar una reacción de tinción citoplasmática al menos débil (BE).

Hígado (NE): No se debe ver tinción

Amígdala (NE): no se debe ver ninguna reacción de tinción.

CK 7

Hígado (AE): Prácticamente todas las células epiteliales de los conductos biliares deben mostrar una tinción citoplasmática de moderada a fuerte reacción.

Páncreas iCAPCs (BE): Prácticamente todas las células epiteliales de los conductos intercalados deben mostrar una reacción de tinción citoplasmática de débil a moderada.

Apéndice (NE): En general, no se observa reacción de tinción. Las células epiteliales cilíndricas dispersas y las células endoteliales pueden mostrar una reacción de tinción citoplasmática débil a moderada.

TTF-1

Tiroides (AE): prácticamente todas las células epiteliales deben mostrar una fuerte tinción nuclear.

Pulmón: prácticamente todo los neumocitos y las células basales de los bronquios terminales deben mostrar una reacción de tinción nuclear de moderada a fuerte (AE). Las células epiteliales columnares de los bronquios terminales deben mostrar una reacción de tinción nuclear al menos débil iCAPCs (BE).

Amígdala: no se debe ver ninguna reacción de tinción (NE).

mCEA

Apéndice: Se debe observar una reacción de tinción de moderada a fuerte en el borde en el cepillo de las células epiteliales superficiales. Prácticamente todas las células epiteliales deben mostrar una reacción de tinción citoplasmática débil a moderada (BE). Si el objetivo deseable es la detección de adenocarcinoma, la demostración de la tinción de solo de la superficie de la mucosa puede ser seleccionada como iCAPCs (BE).

Hígado: No se debe ver ninguna reacción de tinción (NE).

Amígdala: Células epiteliales escamosas dispersas como moderada a fuerte reacción de tinción citoplasmática (el número de células demostradas variará de amígdala a amígdala).

CD31

Amígdala: La gran mayoría de las células B de la zona del manto debe mostrar débil a moderada reacción con tinción predominantemente de membrana (BE).

Páncreas: todas las células endoteliales deben mostrar un moderado a fuerte reacción de tinción predominantemente de membrana

Hígado: Todas las células endoteliales de los sinusoides deben mostrar débil a moderada reacción de tinción predominantemente de membrana (BE).

α -actina de músculo liso (α -SMA)

Apéndice (AE): todas las células del músculo liso en los vasos, muscular de la mucosa y la muscular propia del apéndice debe mostrar una reacción de tinción citoplásmica de fuerte a moderada.

Amígdala: Prácticamente todas las células musculares lisas en los vasos deben mostrar una reacción de tinción citoplásmica distintiva moderada a fuerte (AE).

Hígado iCAPCs (BE): la mayoría de las células perisinusoidales deben mostrar una reacción de tinción citoplásmica débil a moderada.

Desmina

Apéndice: todas las células del músculo liso en la muscular de la mucosa y la muscular propia del apéndice deben mostrar tinción citoplásmica moderada a fuerte. La mayoría de las células musculares lisas de los vasos deben mostrar débil a moderada para tinción citoplásmica (BE).

Hígado (NE): No se debe ver ninguna reacción de tinción en los hepatocitos. Las células musculares en los vasos pueden mostrar una reacción de tinción citoplásmica de débil a moderada.

Amígdala (NE): No se debe ver tinción en las células epiteliales ni linfocitos. Las células musculares lisas en los vasos pueden mostrar una tinción citoplásmica débil a moderada.

CD3

Amígdala: Todas las células T, tanto en las zonas T interfoliculares como dispersas dentro de los centros germinales debe mostrar tinción de membrana predominantemente moderada a fuerte (AE)

Apéndice iCAPCs (BE): Los linfocitos T intraepiteliales deben mostrar tinción predominantemente de membrana débil a moderada.

Hígado iCAPCs (BE): Los linfocitos T dispersos deben mostrar tinción predominantemente de membrana débil a moderada.

CD20

Amígdala: Prácticamente todas las células B del centro germinal y las células B de la zona del manto deben mostrar moderada a fuerte tinción de membrana. Las células plasmáticas benignas también pueden mostrar una positividad débil variable.

Apéndice: Los plasmocitos dispersos en la lámina propia a menudo muestran tinción de membrana variable, generalmente débil (BE).

Hígado: Las células B dispersas deben mostrar tinción membrana moderada a fuerte.

Ki-67

Amígdala: Todas las células B del centro germinal, tanto en las zonas oscuras como claras y las células epiteliales escamosas parabasales deben mostrar una reacción de tinción nuclear de moderada a fuerte (AE).

Apéndice: La mayoría de las células epiteliales columnares basales deben mostrar una reacción de tinción nuclear de moderada a fuerte.

Hígado (NE): No se debe ver ninguna reacción de tinción en la gran mayoría de hepatocitos en el hígado normal. Los granulocitos de neutrófilos dispersados no deben mostrar reacción de

tinción nuclear. Cuando las condiciones y los cambios reactivos presentes en el control de los tejidos son inflamatorias, ocasionalmente son aceptables células positivas.

S-100

Amígdala: Células dendríticas interfoliculares dispersas deben mostrar marcación nuclear y citoplasmática moderada a fuerte (AE). Si se usa anticuerpo policlonal de Dako, se puede ver una débil reacción citoplasmática y nuclear en las células dendríticas foliculares (BE).

Páncreas: La mayoría de las células endocrinas de los islotes de Langerhans deben mostrar una coloración nuclear débil a fuerte y citoplasmática. Todos los adipocitos deben ser positivos (BE).

Hígado (NE): No se debe observar tinción en los hepatocitos ni en las células epiteliales de los conductos biliares. Se pueden ver células dendríticas diseminadas.

Cromogranina A

Páncreas (AE): La mayoría de las células endocrinas de los islotes de Langerhans deben mostrar tinción citoplasmática de moderada a fuerte.

Apéndice: La mayoría de las células ganglionares y axones del plexo de Auerbach debe mostrar una reacción de tinción de débil a moderada (BE). Las células neuroendocrinas deben mostrar fuerte tinción citoplasmática (AE).

Hígado: No se debe observar tinción en los hepatocitos ni en las células epiteliales de los conductos biliares. Se pueden ver axones dispersos.

Synaptofisina

Apéndice: La mayoría de las células ganglionares y axones del plexo de Auerbach deben mostrar una reacción de tinción de moderada a fuerte (AE). La mayoría de las células caliciformes deben mostrar una reacción de tinción citoplasmática débil (BE).

Páncreas (AE): La mayoría de las células endocrinas de los islotes de Langerhans deben mostrar una tinción citoplasmática de moderada a fuerte reacción.

Hígado (NE): No se debe observar tinción en los hepatocitos ni en las células epiteliales de los conductos biliares. Se pueden ver axones dispersos.

Controles de calidad externos

Con el objeto de detectar, reducir o corregir deficiencias, los laboratorios pueden someterse a controles externos que certifiquen la calidad de la técnica de inmunohistoquímica que emplean.

Los principales programas son UKNEQAS (*Unite Kingdom National External Quality Assessment Service*), NordiQC (*Nordic Immunohistochemical Quality Control*), CAP Survey Programs (*Programs College of American Pathologists*), SEAP-IAP (Programas de control de calidad organizados por la Sociedad Española de Anatomía Patológica) y CIQC (*Canadian Immunohistochemistry Quality Control Program*).

ASPECTOS PRÁCTICOS

1. Uso y cuidado de los anticuerpos

Evite la contaminación de reactivos utilizando siempre puntas de pipeta limpias.

Evite la exposición prolongada a altas temperaturas o excesiva exposición a la luz, mediante el pronto retorno de los reactivos a las condiciones adecuadas de almacenaje.

Controle y observe las heladeras y freezers utilizados para el almacenaje de anticuerpos y reactivos a fin de mantener temperaturas precisas y consistentes.

Al recibirse los reactivos de inmunohistoquímica deben ser almacenados en forma inmediata según las especificaciones del fabricante.

Almacene las cantidades grandes de reactivos en equipos con alarma de temperatura y sistemas de respaldo de energía.

Almacene los Kits de detección, anticuerpos prediluidos (“listos para usar”) y las soluciones de anticuerpos monoclonales a 2–8°C ya que congelar y descongelar tiene un efecto deletéreo en su funcionamiento.

Es recomendable para cada anticuerpo (por si fuera necesario realizar reclamos) llevar un registro en el que se especifique N° de lote del fabricante (el N° de lote es además un dato requerido por los controles de calidad externos), fecha de recibo, fecha de vencimiento (en especial si se trata de anticuerpos listos para usar) y número de factura.

Los anticuerpos concentrados, en especial si tiene una baja frecuencia de uso, podrán alicuotarse y almacenarse a -20°C. Deberán llevarse a T ambiente lentamente y evitar T superiores a 25°C.

Los anticuerpos prediluidos tienen una vida media de almacenaje más corta. Son rentables si se usan cotidianamente.

Los anticuerpos liofilizados deberán reconstituirse con agua destilada.

2. Silanización

Silane (3-aminopropyl-triethoxy-silane)

Silane.....20 ml

Acetona.....980 ml

1. Poner las canastas en solución de silane durante 2 minutos.
2. Lavar en agua destilada 3 veces.
3. Dejar secar en un lugar en el que no haya polvo (ej. estufa o tapados).
4. Recomendación: Los vidrios tienen que estar bien limpios.

Otra opción en lugar de usar acetona

Preparar una solución (100ml de silane + 900 ml de agua) que nunca se tira y se conserva siempre en la heladera. Poner las canastas con los vidrios en la solución por un tiempo mínimo de 1 hora. Luego lavar dos veces con agua destilada y secar en la estufa.

3. Soluciones

A. Solución Neutra de Formol Buffer (NBF)

Formalina (formaldehído al 40% p/v) 100 mL

Fosfato de sodio, monobásico, monohidrato 4 g

Fosfato de sodio, dibásico, anhidro 6.5 g

Agua destilada hasta 1 litro

Esta solución es estable durante muchos meses a temperatura ambiente.

B. Soluciones de recuperación antigénica

- BUFFER CITRATO (10mM ácido cítrico; 0.05 tween 20; pH6)

Acido Cítrico2.1 grs

Agua destilada.....900 ml

Mezclar hasta disolver. Ajustar a PH 6 con con HCL 1N, luego agregar 0.5ml de tween 20. Llevar a 1000ml con agua destilada. La solución se puede conservar 3 meses a temperatura ambiente o más tiempo en la heladera.

- EDTA (1mM EDTA; 0.05% Tween 20; pH8)

EDTA0.37 grs

Agua destilada..... 900 ml

Mezclar hasta disolver. Ajustar a pH8 con NaOH 1N, luego agregar 0.5ml de tween 20. Llevar a 1000ml con agua destilada. La solución se puede conservar 3 meses a temperatura ambiente o más tiempo en la heladera.

- TRIS EDTA (10mM tris base; 1mM EDTA; Tween 20; PH9)

Tris Base.....1.21 grs

EDTA0.37 grs

Agua destilada..... 900 ml

Mezclar hasta disolver. Ajustar a pH9 con NaOH 1N, luego agregar 0.5ml de tween 20. Llevar a 1000ml con agua destilada. La solución se puede conservar 3 meses a temperatura ambiente o más tiempo en la heladera.

C. Buffers de lavado

Los lavados con buffer después de cada paso de incubación están destinados a eliminar el exceso de reactivo del espécimen y contrarrestar las uniones inespecíficas. Los buffer más comúnmente utilizados son TBS (hydroxymethyl aminomethane buffer salino) y PBS (Fosfato buffer salino).

TBS (PH 7.4-7.6) La solución es PH sensible y el PH se incrementa aproximadamente 0.03 unidades por grado centígrado que disminuye la temperatura. De modo que a 5°C el PH es de 8.18; a 25°C el PH es 7.6 y a 37°C es de 7.30. Siempre sacar de la heladera 30 minutos antes de usar para permitir que el PH de la solución se estabilice

Tris (Hidroxiamino metano).....2.3 grs

Cloruro de sodio.....7.6 grs

Agua destilada.....1000 cc

Agregar el tris y el cloruro de sodio en 800cc de agua destilada y llevar a PH 7.4-7.6 con ácido clorhídrico (aproximadamente 1.2 ml de ácido clorhídrico) completar 1000 ml.

Cuando se utilizan métodos de detección muy sensibles pueden adicionarse detergentes (Tween 20).

PBS Si bien es más barato que el TBS puede causar coloración inespecífica y se ha visto que reduce la especificidad de ciertos anticuerpos como por Ej CD30.

Los complejos inmunes simples que se forman en el tejido pueden disociarse durante los ciclos de lavado. La facilidad y grado de disociación varían de anticuerpo a anticuerpo. Deberán evitarse los factores que debiliten la unión antígeno-anticuerpo tales como altas concentraciones de sal, alta temperatura y un pH bajo durante el lavado de los especímenes.

SUGERENCIAS PARA LA SOLUCION DE LAVADO

Siempre descartar buffer vencidos y no mezclar soluciones viejas con nuevas.

No realizar diluciones mayores a las recomendadas.

Identificar la fecha en la cual se hizo la dilución.

No realizar mezclas de diferentes Buffers

No usar agua corriente. Usar agua destilada o filtrada deionizada

D. Buffer para la dilución de anticuerpos

TRIS 0.05M PH 6.2 -7.3. El PH óptimo debe testearse para cada Anticuerpo.

Agregar 6 grs de tris en 900 ml de agua destilada y ajustar al PH deseado con ácido clorhídrico completar 1000 ml.

4. Dilución de los anticuerpos

Las diluciones se expresan como la proporción de la solución madre (más concentrada) en relación al volumen total. Por ejemplo, una dilución 1:10 se hace mezclando una parte de la solución madre (anticuerpo) con nueve partes de diluyente. Dilución 1:50 una parte de la solución madre con 49 partes de diluyente. Dilución 1:100 una parte de la solución madre con 99 partes de diluyente. Dilución 1:200 una parte de la solución madre con 199 partes de diluyente.

¿Cómo calcular el volumen de la solución madre (anticuerpo) necesario para preparar el volumen final a la concentración que deseamos?

Considerando la aplicación de 100 µl por caso se multiplica por la cantidad de casos y se divide por la dilución elegida.

Ejemplo: 50 casos (100 µl por cada caso) con una dilución 1:50

$(50 \times 100) \div 50$: 100 microlitros de anticuerpo en un volumen final de 5000 microlitros (100µl de anticuerpo + 4900 µl de buffer).

Ejemplo: 50 casos (100 µl por cada caso) con una dilución 1:100

$(50 \times 100) \div 100$: 50 microlitros de anticuerpo en un volumen final de 5000 microlitros (50µl de anticuerpo + 4950 µl de buffer).

Ejemplo: 50 casos (100 µl por cada caso) con una dilución 1:200

$(50 \times 100) \div 200$: 25 microlitros de anticuerpo en volumen final de 5000 microlitros (25µl de anticuerpo + 4975 µl de buffer).

5000 µl es igual a 5ml

Para hacer un volumen muy pequeño de una solución altamente diluida, puede ser necesario hacerlo en dos pasos. Por ejemplo, para preparar 1 ml de una dilución 1: 1000, primero hacer 100 µL de una dilución 1:10 (10 µL de anticuerpo + 90 µL de buffer), y luego 1000 µL de una dilución 1: 100 usando 10 µL de la dilución intermedia + 990 µL de buffer.

5. Pasos de la Técnica Manual con Microondas

A. Desparafinar y rehidratar los cortes

Realice cuatro pases de 5 minutos cada uno en xilol. Elimine el exceso de líquido y realice tres pases de 5 minutos cada uno en alcohol absoluto. Elimine el exceso de líquido y realice tres pases de 5 minutos cada uno en etanol 96%. Elimine el exceso de líquido y coloque los portas en agua destilada durante 1 minuto.

B. Recuperación antigénica

Materiales requeridos

Microondas (MO) con potencia de 750-800 W y placa giratoria (es importante recordar que con el tiempo la potencia del MO disminuye, por tanto se sugiere su renovación en forma periódica).

Coplin/Contenedor apto para MO
Portaobjetos de plástico apto para MO
Buffer de recuperación
Portas silanizados o con carga positiva

Con el objetivo de asegurar la reproducibilidad de la técnica los siguientes elementos deberán estandarizarse:

Potencia del MO
Presencia de una placa giratoria
Volumen de buffer por contenedor
Número de vidrios por contenedor
Número de contenedores

Protocolo

Nunca colocar materiales metálicos en el MO. Se recomienda usar guantes al manipular partes sumergidas en cualquier reactivo

- I. Colocar los vidrios en el portaobjetos de plástico. Completar todos los lugares que queden con portas en blanco.
- II. Llenar el contenedor con buffer de recuperación (TRIS/EDTA/TE/CITRATO según corresponda), de manera que queden cubiertos completamente los vidrios. Tapar el contenedor dejando una apertura mínima a fin de evitar el aumento de presión y minimizar la evaporación.
- III. Microondear a potencia máxima durante el tiempo que corresponda. ej: 10'+5'+5'. (si se evapora agregar agua destilada). Otra opción es realizar los 20 minutos en un solo tiempo.
- IV. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- V. Lavar y colocar durante 3 a 5 minutos en buffer.

C. Bloqueo de la peroxidasa endógena

Incubar los cortes en H₂O₂ 3% (3ml H₂O₂ en 100ml de agua destilada) durante 5-10 minutos. Otra opción es el tratamiento metanólico con H₂O₂ 3% (3 ml de H₂O₂ en 100 ml de metanol) durante

20 minutos, pero no es recomendado para muestras donde los anticuerpos a evaluar son de membrana.

El bloqueo puede realizarse antes o después de la incubación con el anticuerpo primario. Debe tenerse en consideración que algunos anticuerpos pueden verse perjudicados si el bloqueo de la peroxidasa endógena se realiza antes de la incubación con el anticuerpo primario. Leer las especificaciones del fabricante del anticuerpo primario.

- D. Lavar y colocar durante 3 a 5 minutos en buffer.
- E. Sacar del buffer y secar con papel de manera cuidadosa alrededor del corte.
- F. Incubar el tejido durante 30 minutos con suero normal.
- G. Escurra el suero y seque el exceso. No enjuague.
- H. Incubar con el anticuerpo primario a 37°C durante el tiempo requerido por cada anticuerpo o toda la noche en la heladera.
- I. Desechar el anticuerpo primario. Lavar y colocar durante 3 a 5 minutos en buffer.
- J. Incubar con el sistema de detección.
- K. Lavar y colocar durante 3 a 5 minutos en buffer.
- L. Sumergir los cortes en solución de sustrato dab durante 5 minutos. Usar dab líquida según especificaciones del fabricante. No se recomienda el uso de dab en polvo
- J. Lavar con agua corriente y luego agua destilada.
- K. Contracolorar. Deshidratar. Aclarar y montar.

6. Recomendaciones para una técnica exitosa

- Adecuada fijación y procesamiento del tejido.
- En caso de enviar cortes a otro laboratorio para la realización de técnicas de inmunohistoquímica enviar sin realizar el secado en estufa (informar al laboratorio que recepcionara la muestra que se envían sin estufa).
- Apropiada y eficiente recuperación antigénica.
- Adecuada elección del anticuerpo primario (clon y dilución): si es posible comparar diferentes clones. Calibrar cuidadosamente la concentración del anticuerpo en relación a los indicadores críticos de coloración de calidad.
- Utilizar para la puesta a punto materiales de control adecuados (bajo, alto y no expresadores).
- Utilizar sistema de detección robusto, sensible y específico.

DIRECCIONES DE INTERÉS

- www.cap.org
- www.nordiqc.org
- www.ukneqas.org.uk
- www.biocompare.com
- www.antibodypedia.com
- www.antibodies-online.com
- www.ihcworld.com
- www.ciqc.ca
- brd.nci.nih.gov/brd/pre-analytical-factor-browse/immunohistochemistry

Bibliografía

- 1) Veronique M Neumeister, Fabio Parisi , Allison M England , Summar Siddiqui, et al. A tissue quality index: an intrinsic control for measurement of effects of preanalytical variables on FFPE tissue. *Laboratory Investigation* (2014) 94, 467–474.
- 2) Shi SR, Liu C, Taylor CR. Standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen-retrieval technique: From experiments to hypothesis. *J Histochem Cytochem* 2007; 55:105-9.
- 3) Ran Xie, Joon-Yong Chung, Kris Ylaya, Reginald L. Williams, Natalie Guerrero, Nathan Nakatsuka, Cortesia Badie, and Stephen M. Hewitt. Factors Influencing the Degradation of Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59(4) 356–365
- 4) Isil Z Yildiz-Aktas, David J Dabbs and Rohit Bhargava. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Modern Pathology* (2012) 25, 1098–1105.
- 5) Boenisch, Thomas M.S. Diluent Buffer Ions and pH: Their Influence on the Performance of Monoclonal Antibodies in Immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 1999; 7(4): 300.
- 6) Martina Mirlacher, Marlis Kasper, Martina Storz, Yvonne Knecht, Ursula Du`rnu` ller, Ronald Simon, Michael J Mihatsch and Guido Sauter. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Modern Pathology* 2004; 17: 1414–1420.
- 7) Kelly B. Engel; Helen M. Moore. Effects of Preanalytical Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. (*Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135:537–543.
- 8) Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135:537-43.
- 9) Yalai Bai, Juliana Tolles, Huan Cheng, Summar Siddiqui, Arun Gopinath, Eirini Pectasides, Robert L Camp, David L Rimm and Annette M Molinaro. Quantitative assessment shows loss of antigenic epitopes as a function of pre-analytic variables. *Laboratory Investigation* 2011; 91: 1253–1261
- 10) Leung Chu Tong, Nahid Nelson, Jim Tsourigiannis and Anna Marie Mulligan. The Effect of Prolonged Fixation on the Immunohistochemical Evaluation of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Expression in Invasive Breast Cancer: A Prospective Study. *Am J Surg Pathol* Volume 35, Number 4, April 2011
- 11) Goldstein NS, Hewitt SM, Taylor CR, Yaziji H, Hicks DG. Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15:124-33.
- 12) Taylor CR. Quantifiable internal reference standards for immunohistochemistry: The measurement of quantity by weight. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14:253-9.
- 13) Thomas Boenisch. Formalin-Fixed and Heat-Retrieved Tissue Antigens: A Comparison of Their Immunoreactivity in Experimental Antibody Diluents. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2001; 9(2): 176–179.
- 14) Skaland, Ivar MS; Nordhus, Marit BSc; Gudlaugsson, Einar MD; Klos, Jan MD; Kjellevoid, Kjell H. MD; Janssen, Emiel A. M. PhD; Baak, Jan P. A. MD, PhD, FRCPath, FIAC(hon). Evaluation of 5 Different Labeled Polymer Immunohistochemical Detection Systems. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 18(1):90-6, January 2010
- 15) Mogens Vyberg, Søren Nielsen. Proficiency testing in immunohistochemistry—experiences from Nordic Immunohistochemical Quality Control (NordiQC). *Virchows Arch* (2016) 468:19–29
- 16) Kim SH. Evaluation of antigen retrieval buffer systems. *J. Mol. Histol.* 2004; 35:409.

- 17) Dorthe A. Grabau; Ole Nielsen; Steinbjørn Hansen; Mette M. Nielsen; Anne-Vibeke Lænkholm; Ann Knoop; Per Pfeiffer. Influence of Storage Temperature and High-Temperature Antigen Retrieval Buffers on Results of Immunohistochemical Staining in Sections Stored for Long Periods. *Applied Immunohistochemistry*. 1998; 6(4):209-213
- 18) Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 1995; 43(2):193-201.
- 19) Clive R. Taylor, Lars Rudbeck. *Handbook of immunochemical staining methods*. 2013; sixth ed. Dako Cytomation Corp., Carpinteria, CA, USA.
- 20) Emina E. Torlakovic, Glenn Francis, John Garratt, Blake Gilks, et al. Standardization of Negative Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations from the International Ad Hoc Expert Panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 April; 22(4): 241–252.
- 21) Emina E. Torlakovic, Søren Nielsen, Glenn Francis, John Garratt, et al. Standardization of Positive Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015; 23: 1–18.
- 22) Emina Emilia Torlakovic, Søren Nielsen, Mogens Vyberg, Clive R Taylor. Getting controls under control: the time is now for immunohistochemistry. *Clin Pathol* 2015; 68:879–882.
- 23) Emina E. Torlakovic; Carol C. Cheung; Corrado D'Arrigo; Manfred Dietel, et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine Part 2: Immunohistochemistry Test Performance Characteristics. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2017; 25(2):79–85.
- 24) Emina E. Torlakovic; Carol C. Cheung; Corrado D'Arrigo; Manfred Dietel, et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine. Part 3: Technical Validation of Immunohistochemistry (IHC) Assays in Clinical IHC Laboratories. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2017; 25(3):151–159.
- 25) Carol C. Cheung; Corrado D'Arrigo; Manfred Dietel; Glenn D. Francis; et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine: Part 4 Tissue Tools for Quality Assurance in Immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2017; 25(4):227–230.
- 26) Carol C. Cheung; Corrado D'Arrigo; Manfred Dietel; Glenn D. Francis, et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine: Part 1. Fit-for-Purpose Approach to Classification of Clinical Immunohistochemistry Biomarkers. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2017; 25(1):4–11.
- 27) Carol C. Cheung; Clive R. Taylor; Emina E. Torlakovic. An Audit of Failed Immunohistochemical Slides in a Clinical Laboratory: The Role of On-Slide Controls. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2017; 25(5):308–312



Instituto Nacional del Cáncer

Av. Julio A. Roca 781 10º piso
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
www.salud.gob.ar/inc

INC responde:
0800 333 3586

