

APLICACION EN PATOLOGIA VETERINARIA DE LAS TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS II PARTE. TECNICAS INMUNOENZIMATICAS

Dr. M. Quezada O., M.V. Depto. Med. Veterinaria
Facultad de Ciencias Agronómicas, Veterinarias y Forestales
Universidad de Concepción, Casilla 537 - Chillán, Chile

Dr. A. Fernández R., M.V.

Dra. J. Martín de las Mulas, Méd.

Depto. Anat. y Anat. Patológica Comp. Facultad de Veterinaria
Universidad de Córdoba, España

En la década de los años sesenta, se introdujeron por primera vez enzimas como marcadores para identificar las uniones antígeno-anticuerpo, las que al actuar sobre un sustrato definido forman un precipitado coloreado visible al microscopio óptico (Palacin, 1984; Fenner y col., 1987). El uso de enzimas como "colorante", como pueden ser la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la glucosa oxidasa o beta galactosidasa (Nakane y Pierce, 1966), han dado el nombre genérico a estas técnicas de **inmunoenzimáticas**.

Las técnicas inmunoenzimáticas más utilizadas en la actualidad son las de **inmuno**peroxidasa, vale decir, aquellas en que la enzima utilizada como marcador es la peroxidasa de rábano picante (PR). Además se pueden realizar otras técnicas como la **inmuno**peroxidasa **directa** (Word y Kaeberle, 1984), en la que el anticuerpo primario está conjugado con la enzima, o la **inmuno**peroxidasa **indirecta** (Doster y col., 1988), en que el segundo anticuerpo está conjugado con la enzima. Sin embargo, últimamente se han venido utilizando métodos altamente sensibles como lo son el **Complejo Peroxidasa Anti-Peroxidasa (PAP)** de Sternberger (1970) y el **Complejo Avidina-Biotina Peroxidasa (ABC)** de Heggeness (1977) (Palacin, 1984; Meador y col., 1986, 1989a, 1989b; Meador y Doyoe, 1989; Moore y col., 1989; Scanziani y col., 1989).

Los marcadores o colorantes enzimáticos, no son visibles directamente al microscopio óptico sino, que requieren ser revelados mediante una serie de reacciones histoquímicas en las que un cromógeno adquiere un determinado color, gracias a la acción del marcador enzimático. Los cromógenos más utilizados en inmuno histoquímica son: la diaminobenzidina de color marrón, el aminoetilcarbazol de color rojo y el cloronaftol de color negro (Palacin, 1984; Meador y col., 1989a).

TECNICA DE LA PEROXIDASA ANTIPEROXIDASA (PAP)

El complejo PAP, está constituido por dos moléculas de inmunoglobulinas y tres de peroxidasa (Figura 1), debiendo desarrollarse el complejo peroxidasa antiperoxidasa por inmunización de animales de la misma especie que los utilizados para obtener el primer anticuerpo (Palacin, 1984).

La aplicación de estas técnicas en los cortes histológicos supone una serie de tratamientos complementarios tendientes a resaltar la reacción inmunológica específica:

1. Bloqueo de la actividad peroxidásica endógena

Algunas estructuras tisulares como los eritrocitos, granulocitos, macrófagos, etc., muestran actividad peroxidásica (Fenner y

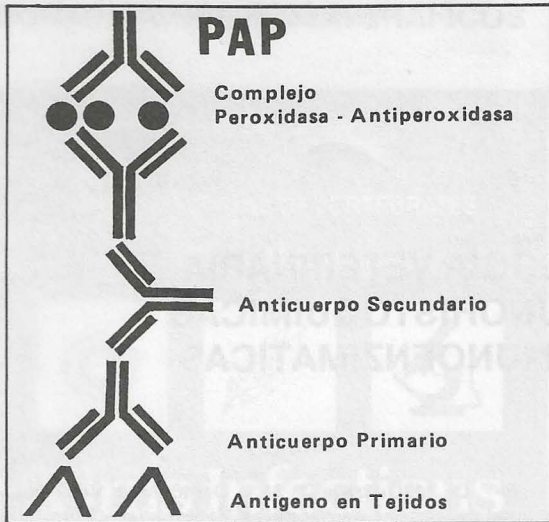


Figura 1. Técnica de la Peroxidasa - Antiperoxidasa.

col., 1987), la que puede ser bloqueada con soluciones en base a metanol y peróxido de hidrógeno al 0,3% (Moore y col., 1989), o mediante tratamientos con ácido clorhídrico y ácido peryódico (Meador y col., 1986).

2. Desenmascaramiento de grupos antigénicos

Durante la fijación de las muestras tisulares con fijadores aldehídos como el formol, se producen puentes de unión de tipo cruzados entre los componentes proteicos. Producto de estas reacciones algunos antígenos pueden quedar ocultos e inaccesibles al primer anticuerpo, lo que hace necesario devolver su actividad antigénica eclipsada, mediante tratamiento enzimático (Palacin, 1984). Kobisch y col. (1985), han utilizado el complejo PAP en cortes de congelación, sin necesidad de efectuar tratamiento enzimático.

3. Supresión de la tinción inespecífica de fondo

Cuando hay una tinción de fondo manifiesta (background), se puede deber entre otras causas a: difusión extracelular de antígenos, persistencia del medio de inclusión (mal desparafinado), uso de anticuerpos mal purificados o unión de los anticuerpos mediante el complemento o la región Fc. La tinción inespecífica de fondo dificulta una correcta delimitación de las áreas realmente positivas. Una dilución óptima de los anticuerpos primarios da un mayor contraste a la tinción (Palacin, 1984).

4. Revelado de la peroxidasa

El revelado de la peroxidasa se lleva a cabo mediante la producción de un precipitado insoluble local (Fenner y col., 1987), que se forma cuando reacciona la peroxidasa con el peróxido de hidrógeno, constituyendo un complejo que reacciona posteriormente sobre un cromógeno como la diaminobenzidina (DAB) o el 3-amino-9 etilcarbazol (Palacin, 1984; Meador y col., 1989a).

TECNICA DEL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASA (ABC)

Esta técnica se basa en aprovechar la extraordinaria afinidad que tiene la Biotina (vitamina del complejo B de bajo peso molecular) por la Avidina (glicoproteína contenida en la clara de huevo) (Hsu y col., 1981).

La unión no inmunológica entre la biotina y avidina es rápida y prácticamente irreversible, más de 10^6 veces mayor que la mostrada por el anticuerpo frente al antígeno (Palacin, 1984). El complejo ABC se hallaría formado por una red tridimensional de múltiples moléculas de PR biotinadas entrelazadas con la avidina (Figura 2). Debido al proceso de amplificación que se produce, al corresponder a un lugar de unión antigénica múltiples moléculas de peroxidasa activas, la técnica del Complejo ABC tiene una elevada sensibilidad (Palacin, 1984), una mínima tinción de fondo y ahorro de reactivos (Fernández y col., 1988).

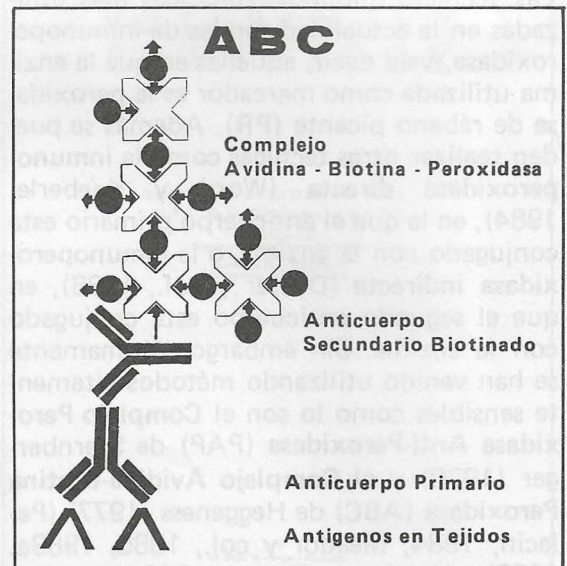


Figura 2. Técnica de la Avidina - Biotina - Peroxidasa.

En la realización de la técnica es necesario tener presente que algunos tejidos tales como el hígado, bazo, riñón y sistema nervioso, contienen biotina o sustancias parecidas, las cuales pueden fijar el complejo ABC, conduciendo a resultados erróneos, siendo absolutamente necesario bloquear dichas sustancias (Palacin, 1984).

El procedimiento general para las técnicas PAP y ABC se comparan en el Cuadro 1.

Las técnicas inmunoenzimáticas ofrecen grandes ventajas sobre las técnicas de inmunofluorescencia (revisada en la primera parte de este artículo), debido a:

1. No se necesitan microscopios especiales.

2. Las preparaciones son permanentes: la reacción inmunoenzimática no desaparece con el tiempo, por lo cual no requiere de la utilización de material fotográfico en forma instantánea.

3. El detalle morfológico es completo, ya que a la preservación de la arquitectura tisular que proporciona el uso de material fijado se une la posibilidad de contraindicación sistemática, lo que permite una observación histológica detallada.

4. Tienen mayor sensibilidad, sobre todo las técnicas del complejo PAP y ABC, en las que la señal óptica se amplifica enormemente (varias moléculas de marcador para una de antígeno).

Cuadro 1.

Técnica de la Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP)	Técnica de la Avidina-Biotina, utilizando complejo ABC
1. Desparafinar, hasta alcohol absoluto	1. Idem
2. Bloqueo de la peroxidasa endógena	2. Idem
3. Hidratación progresiva	3. Idem
4. Tratamiento enzimático	4. Idem
5. Supresión de la tinción de fondo	5. Bloqueo de la Biotina tisular
6. Anticuerpo primario específico	6. Anticuerpo primario específico
7. Lavado (PBS pH 7,2)	7. Lavado PBS (pH 7,2 - 7,6)
8. Anticuerpo puente	8. Anticuerpo segundo - BIO
9. Lavado PBS	9. Lavado PBS
10. Incubación en PAP	10. Incubación complejo ABC
11. Lavado TRIS	11. Lavado PBS
12. Revelado de la peroxidasa	12. Idem
13. Lavado H ₂ O destilada	13. Idem
14. Tinción de contraste	14. Idem
15. Montaje de la preparación	15. Idem

BIBLIOGRAFIA

1. DOSTER, R.A. and CHANG LIN, B. "Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method" *Am. J. Vet. Res.* **49**: 1719;1721, 1988.

2. FENNER, F.; BACHMANN, P.; GIBBS, E.; MURPHY, F.; STUDDERT, M. and WHITE, D. "Veterinary virology". Academic Press, Inc. Ltd. USA, 1987.

3. FERNANDEZ, A.; MARTIN DE LAS MULLAS, J.; POVEDA, J.; TOLEDO, V. y MENDEZ, A. "Aplicación de técnicas inmunocitoquímicas al diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky en material fijado". *Anaporc* **76**: 26-27, 1988.

4. HSU, SM.; RAINE, L. and FANGER, H. "Use of Avidin-Biotin Peroxidasa Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures". *J. Histochem Cytochem* **29**: 577;580, 1981.

5. KOBISCH, M.; LABBE, A. and MORVAN, P. "Diagnostic de l'infection a **Mycoplasma hyopneumoniae**: comparaison de la reaction d'immunofluorescence et d'une technique immunohistochimique". **Bull. Lab. Vet.** **17**: 75-77, 1985.
6. MEADOR, PV. and DEYOE, LB. "Intracellular localization of **Brucella abortus** in bovine placenta". **Vet. Pathology** **26**: 513-515, 1989.
7. MEADOR, PV.; DEYOE, LB. and CHEVILLE, FN. "Pathogenesis of **Brucella abortus** infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat". **Vet. Pathology** **26**: 357-368, 1989a.
8. MEADOR, PV.; DEYOE, LB. and CHEVILLE, FN. "Effect of nursing on **Brucella abortus** infection of mammary glands of goats". **Vet. Pathology** **26**: 369-375, 1989b.
9. MEADOR, PV.; TABATABAI, LB.; HAGEMOSER, WA. and DEYOE, BL. "Identification of **Brucella abortus** in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats and mice with an avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique". **Am. J. Vet. Res.** **47**: 2147-2150, 1986.
10. MOORE, AS.; MADEWELL, BR. and LUND, JK. "Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms". **Am. J. Vet. Res.** **50**: 88-92, 1989.
11. NAKANE, PK. and PIERCE, GB. "Enzyme-labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigen". **J. Histochem Cytochem** **14**: 929-931, 1966.
12. PALACIN, FA. "Técnicas inmunohistoquímicas". Editorial Atom S.A., Barcelona (España), 1984.
13. SCANZIANI, E.; SIRONI, G. and MANDELLI, G. "Inmunoperoxidase studies of leptospirae nephritis of swine". **Vet. Pathology** **26**: 442-444, 1989.
14. WARD, ACS. and KAEBERLE, ML. "Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopies". **Am. J. Vet. Res.** **45**: 165-170, 1984.