

## CAPITOLUL XV

### TEHNICI DE IMUNOHISTOCHEMIE

#### I. INTRODUCERE

Imunohistochimia reprezintă o tehnică, relativ nouă, de identificare a antigenelor celulare și tisulare, în urma unei interacțiuni antigen-anticorp. Imunocolorarea se bazează pe afinitatea dintre antigen și anticorp, situsul de legare al anticorpului fiind identificat fie prin metode directe de colorare a anticorpului, fie utilizând o metodă indirectă de colorare în care marcarea este adusă de anticorpi numiți secundari sau chiar terțiari.

#### II. ANTICORPI ȘI ANTIGENE

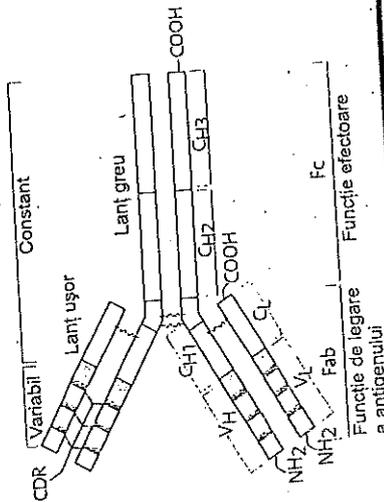
*Antigenele* sunt reprezentate de orice substanță exogenă sau endogenă capabilă să declanșeze un răspuns imun și să reacționeze specific cu anticorpii sau receptori pentru antigen de pe suprafața limfocitelor. Când un antigen a pătruns în fluidele extracelulare, el va fi transportat pe calea vaselor sanguine ori limfice până la nivelul ganglionilor limfatici. La acest nivel, molecula de antigen va veni în contact cu limfocitele B care se transformă în plasmocite, acestea sintetizând și secretând anticorpii. În afară de antigenele artificiale, o varietate de substanțe întălnite în natură au proprietăți antigenice (proteine, polizaharide, lipide, acizi nucleici, lipopolizaharide sau lectine). O moleculă antigenică prezintă unul sau mai multe situsuri de legare a anticorpilor. Aceste situsuri sunt regiuni cu o înaltă specificitate topografică, alcătuite dintr-un număr mic de unități de aminoacizi sau monozaharide, ce poartă numele de determinanți antigenici sau epitopi. Termenul de *epitop* definește o unitate funcțională a unei proteine și nu un element structural fix, el neputând fi recunoscut independent de către anticorp. Structural, epitopii se pot clasifica în epitopi continui și epitopi discontinui. Cei din urmă sunt alcătuiți dintr-un reziduu continuu al unui lanț polipeptidic, în timp ce al doilea tip reprezintă un reziduu din părți diferite ale unui lanț polipeptidic. Acest aspect reflectă influența variabilă a fixării inițiale a țesuturilor asupra antigenicității.

Antigenele sunt de două tipuri:

##### I. Antigene complete

- au o componentă haptentă (recunoscută de receptorii celulelor B) și o componentă carier (recunoscută de receptorii celulelor T);
- sunt imunogene (declanșează un răspuns imun);
- reacționează cu anticorpii indus (produsul răspunsului imun).

60% din populația umană predomină tipul L<sub>oc</sub> în timp ce de exemplu la șoareci ele reprezintă numai 5% din populația de anticorpi. Lanțurile H se deosebesc din punct de vedere antigenic, fiind descrise cinci tipuri (γ, α, δ, ε și μ) ce dau caracterul de clasă al imunoglobulinelor (IgG, IgM, IgD, IgE și IgA). Solidarizarea catenelor se realizează prin punți disulfidice care le conferă stabilitate. Mai mult, în cadrul claselor de anticorpi s-au descris și subclase pe baza numărului de legături disulfidice dintre lanțurile H. Datorită predominanței lor în răspunsurile imune imediate și tardive, anticorpii utilizați cel mai frecvent în reacțiile imunohistochimice sunt cei din clasele IgG și IgM:



CH = domeniu constant al lanțului greu  
 VH = domeniu variabil al lanțului greu  
 CL = domeniu constant al lanțului ușor  
 VL = domeniu variabil al lanțului ușor  
 CDR = regiune de determinare a complementantității  
 Fab = fragment de legare a antigenului  
 Fc = fragment cristalizabil  
 - s-s - = punte disulfidică

### Structura schematică a unei molecule de imunoglobulină (IgG)

Clasele de imunoglobuline și tipurile de lanțuri specifice sunt reprezentate în tabelul de mai jos pentru specia umană.

Clasa de Ig	Tip de lanț L	Tip de lanț H	Tip de moleculă
Ig G (1,2,3,4)	κ, λ	γ, γ	Monomer
Ig A (1,2)	κ, λ	α, α	Dimer
Ig D	κ, λ	δ, δ	Monomer
Ig E	κ, λ	ε, ε	Monomer
Ig M	κ, λ	μ, μ	Pentamer

Clasele de imunoglobuline și tipurile de lanțuri

### 2. Antigene incomplete

- sunt doar hapten;
  - nu sunt imunogene;
  - reacționează cu anticorpi gata formați.
- Antigenele uzuale în imunohistochimic sunt reprezentate de:
1. Antigene mezenchimale (vimentina);
  2. Antigene epiteliale (citokeratinele, antigenul de membrană epitelial-EMA, desmoplazina);
  3. Antigene musculare (desmina, mioglobina, actina);
  4. Antigene vasculare (antigenul asociat factorului VIII, CD<sub>34</sub>, CD<sub>31</sub>-PECAM);
  5. Antigene neurale și markeri neuroendocrini (proteina S<sub>100</sub>, enolaza neuron specifică - NSE, neurofilamentele-NF, proteina gială fibrilă acidă - GFAP, proteina bazică a mielinei - PMB, TB-01, cromogranina și sinaptofizina);
  6. Antigene leucocitare (antigenul leucocitar comun - CLA, CD<sub>45</sub>, RO-limfocite T cu memorie, CD<sub>4</sub> - limfocite T helper, CD<sub>8</sub> - limfocite T citotoxice, CD<sub>20</sub> - limfocite B, CD<sub>68</sub> - macrofage, CD<sub>15</sub> și CD<sub>45</sub> - celulele Reed-Sternberg etc);
  7. Tipuri speciale de antigene (antigene tumorale histotipice, factori de proliferare, antigene de membrană bazală, receptori hormonal, etc).

Anticorpii sunt proteine, din clasa gama globulinelor, care se pot combina specific cu antigenele ce au determinat producerea lor. Realizarea complexului antigen-anticorp este posibilă, având în vedere că o parte a moleculei de anticorp (*paratopul* - regiune determinată a complementantității) este astfel configurată încât se fixează exact pe o zonă a moleculei de antigen (epitop). Această reacție are loc în moduri în care o enzimă se combină cu substratul său. Cele două componente ale complexului interacționează prin intermediul celor trei forțe non-covalente, și anume de tip atracție ionică, legături de hidrogen sau interacțiune hidrofobă.

Prezența mai multor epitopi pe aceeași moleculă de antigen va determina sinteza mai multor anticorpi capabili de a se combina cu antigenul respectiv.

Specificitatea este proprietatea unui anticorp de a se cupla specific doar cu antigenul care a indus formarea sa, ea fiind o proprietate fundamentală, exploatată în imunohistochimie. În același timp, două molecule proteice similare pot reacționa cu un anticorp produs de una dintre ele. Aceasta este o reacție încrucișată ce apare atunci când epitopul este reprezentat de o secvență scurtă de aminoacizi, comună ambelor proteine. Reacția încrucișată poate fi o sursă de confuzii în interpretarea preparatelor colorate imunohistochimic pentru că ea nu poate fi detectată prin controalele uzuale ale specificității.

Anticorpii sunt formați din două catene grele (H) identice și două catene ușoare (L) identice. Lanțurile L sunt comune pentru toate clasele de imunoglobuline, și din punct de vedere antigenic pot face parte din două tipuri diferite, κ și λ. În cadrul unei molecule de imunoglobulină ambele lanțuri aparțin obligatoriu aceluiași tip, ori κ, ori λ, ele fiind specifice speciei. La aproximativ

servi ca anticorp legându-se specific de antigenele tisulare, cât și faptul că ele pot servi ca antigene ce posedă determinanți antigenici pentru anticorpi secundari.

Evaluarea unui anticorp în vederea utilizării lui în imunohistochimie se bazează pe două elemente: sensibilitatea și specificitatea reacției antigen-anticorp.

Anticorpii policlonali sunt produși de celule diferite, ca urmare ei vor reacționa cu epitopi diferiți ai aceluiși antigen. Cel mai frecvent folosit animal pentru producerea anticorpilor policlonali este iepurele, fiind urmat de capră, porc, oaie, cal, hamster și altele. Popularitatea folosirii iepurilor în producția de anticorpi policlonali este datorată în primul rând ușurii cu care se creșcă. Un alt avantaj este faptul că anticorpii dezvoltăți de om împotriva proteinelor de iepure apar mai rar decât în cazul proteinelor de la diferite specii de rumegătoare, ca de exemplu capra. În plus, anticorpii de iepure precipită proteinele umane într-un interval larg de variație a concentrației anticorpului sau antigenului, ceea ce face ca anticorpii colectați de la mai multe animale să aibă o mică probabilitate de variație în timp comparativ cu anticorpii colectați de la un număr mai mic de animale de talie mai mare. Impercheurile selective pentru un răspuns imun cât mai amplu au făcut ca iepurele alb de Noua Zeelandă să fie cel mai răspândit animal pentru producerea de anticorpi policlonal. Generarea răspunsului imun la aceste animale se obține prin injectarea de antigen (doze cuprinse între 10-200  $\mu\text{g}$ ) la nivel intradermic sau subcutanat. La iepure se realizează injectarea a 0,1-0,5 ml de antigen suspendat în adjuvant Freund, după care sângele este prelevat din ureche, iar Ig sunt precipitate cu săruri și apoi purificate cromatografic. În concluzie, anticorpol policlonal este de fapt un antiser ce conține câteva specii diferite de anticorp cu afinități diferite, fiecare având specificități variate împotriva diferiților antigeni sau determinanți antigenici utilizați în imunizarea animalului. Este important să știm că acești anticorpi policlonali pot conține cantități variate de anticorpi pentru întreg spectrul de antigene (inclusiv bacterii și virusuri) întâlnite la animalul imunizat, înainte ca ei să fie utilizat ca sursă de anticorpi. Ca urmare a acestui fapt, anticorpii policlonali pot da o colorație de fond mai mare decât anticorpii monoclonali, în cazul utilizării lor în cadrul unei reacții imunohistochimice.

Anticorpii monoclonali sunt produsul de secreție al unor clone individuale de plasmocite, anticorpii produși de o anumită clonă fiind identici și reacționând cu un epitop specific al antigenului.

Dezvoltarea tehnicii hibridomului a furnizat pentru prima dată o sursă nelimitată pentru anticorpi cu înaltă specificitate. Această metodă, pusă la punct de Kohler și Milstein în 1975, a crescut numărul, cantitatea și calitatea antiserurilor specifice. Probabil datorită motivelor economice, șoarecii sunt folosiți aproape exclusiv pentru producerea anticorpilor monoclonali. După ce apare răspunsul imun, limfocitele B din splină sau ganglionii limfatici sunt izolate și fuzionate în condiții speciale cu celule de șoarece de origine mielomatoasă. Celulele hibride astfel obținute prezintă capacitatea de a sintetiza un anumit anticorp de la plasmocite și longevitatea celulelor mielomatoase. Din cultură sunt îndepărtate limfocitele B non-reactive și celulele mielomatoase non-fuzionate, celulele hibride producătoare de anticorp fiind cultivate mai departe și testate pentru reactivitatea dorită. Propagarea hibridomelor se poate realiza în medii de cultură sau prin

Imunoglobulinele G (IgG) constau din două subunități legate prin punți disulfidice, fiecare subunitate având două catene grele (lanțuri lungi)  $\gamma$  și două catene ușoare (lanțuri scurte)  $\kappa$  sau  $\lambda$ , legate de asemenea prin punți disulfidice. Aspectul geometric este cel al literei Y în care baza și partea proximală a brațelor au aceeași compoziție în aminoacizi în toate moleculele de IgG ale aceleiași specii animale și realizează domeniul constant  $F_c$  al Ig. Specificitatea pentru antigen rezidă din structura porțiunilor distale (variabile) ale brațelor, numite fragmente  $F_{ab}$  capabile de a se combina fiecare cu un epitop. Astfel se poate remarca faptul că aceste imunoglobuline au un domeniu variabil și unul constant. Lanțurile de aminoacizi ale domeniului variabil al anticorpului formează o cavitare care din punct de vedere chimic și geometric este complementară cu un singur tip de epitop, acest lucru explicând gradul înalt al specificității anticorpilor. Digestia cu papaină determină clivarea N-terminală a legăturilor disulfidice dintre catenele grele, formându-se fragmentele de legare a antigenului ( $F_{ab}$ ) și fragmentul cristalizabil ( $F_c$ ). Pepsina clivează catenele  $\gamma$  în domeniul constant terminal, rezultând un fragment bivalent de legare a antigenului  $F_{(ab)2}$ , fragmentul  $F_c$  fiind distrus. În timpul reacției antigen-anticorp regiunile hiperactive ale Ig ajung în vecinătatea epitopului, distanța dintre epitop și regiunea hiperactivă a anticorpului fiind de 0,2-0,3 nm. La acest nivel se găsesc localizați determinanții idiotipici, fiecare clonă de anticorp exprimând propriul *idiotip*. Idiotypul este imunoglobulina ale cărei caracteristici specifice au fost modificate în contact cu antigenul, ea funcționând ca antigen.

În vreme ce subclasele IgG pentru specia umană sunt IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4, echivalenții murini sunt IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c și IgG3. Cunoașterea lor este importantă în practică în cazul în care pentru un anumit anticorp monoclonal (de exemplu șoarece IgG2a), ideal trebuie utilizat un anticorp secundar specific speciei dar și subtipului (de exemplu capră anti-șoarece specific IgG2a). În sânge durată de viață a imunoglobulinelor din această clasă este de aproximativ 21 de zile.

În concluzie, din punctul de vedere al imunohistochimistului, sunt importante trei caracteristici ale moleculei de IgG:

1. Molecula anticorpului este bivalentă, ea prezentând două situsuri capabile de a se lega cu determinanții antigenici;
2. Fragmentul  $F_c$  al moleculei de IgG este comun tuturor anticorpilor speciei interesate și nu este implicat în combinarea cu antigenul;
3. IgG sunt macromolecule și pot deveni antigene la injectarea în diverse specii animale.

Imunoglobulinele M (IgM) reprezintă un pentamer ale cărei subunități sunt legate printr-o proteină bogată în sulfhidril-catena J, ce contribuie la stabilizarea și integritatea moleculei. IgM este primul anticorp detectabil în cadrul răspunsului imun, dar spre deosebire de IgG, care au o durată de înjumătățire de trei săptămâni, IgM au o durată scurtă de viață (4-6 zile).

Fiecare parte rigidă a unei molecule de anticorp poate servi ca determinant antigenic și deci poate induce formarea unui anticorp. În tehnicile imunohistochimice este exploatat atât faptul că moleculele de imunoglobuline pot

transplantarea celulelor fuzionate în cavitatea peritoneală a unor animale singene cu cele de la care a fost izolată inițial populația de limfocite B. De aici se recoltează lichidul de ascită conținând anticorpii monoclonali dorți.

O tehnică nouă de sinteză a anticorpilor monoclonali, cu mai mare specificitate și care nu mai necesită întreținerea animalelor de laborator este clonarea într-un vector de prezentare a fagului (phage display). În prima etapă, secvențele de ADN sunt izolate din limfocitele B și clonate în bacterii precum E. Coli. Apoi, virusii cu tropism bacterian infectează culturile, cu bacterii și încorporează fragmente din genomul bacterian, și implicit secvențele de ADN de origine limfocitară ce codifică variații anticorpi. Pe măsură ce fagi se replică ei exprimă și proteinele codificate de ADN-ul limfocitar, expunând pe suprafața lor acești anticorpi. Printr-un proces de selecție pozitivă a bibliotecii de fagi, se vor selecta numai aceia care produc anticorpi pentru un anumit antigen. Odată fagi selectați, cu ei se infectează culturi de bacterii realizându-se astfel transferul fragmentelor de ADN în celule prokariote care îl vor produce în cantități însemnate.

Pentru imunohistochimie, anticorpii monoclonali au o serie de avantaje importante față de anticorpii policlonali:

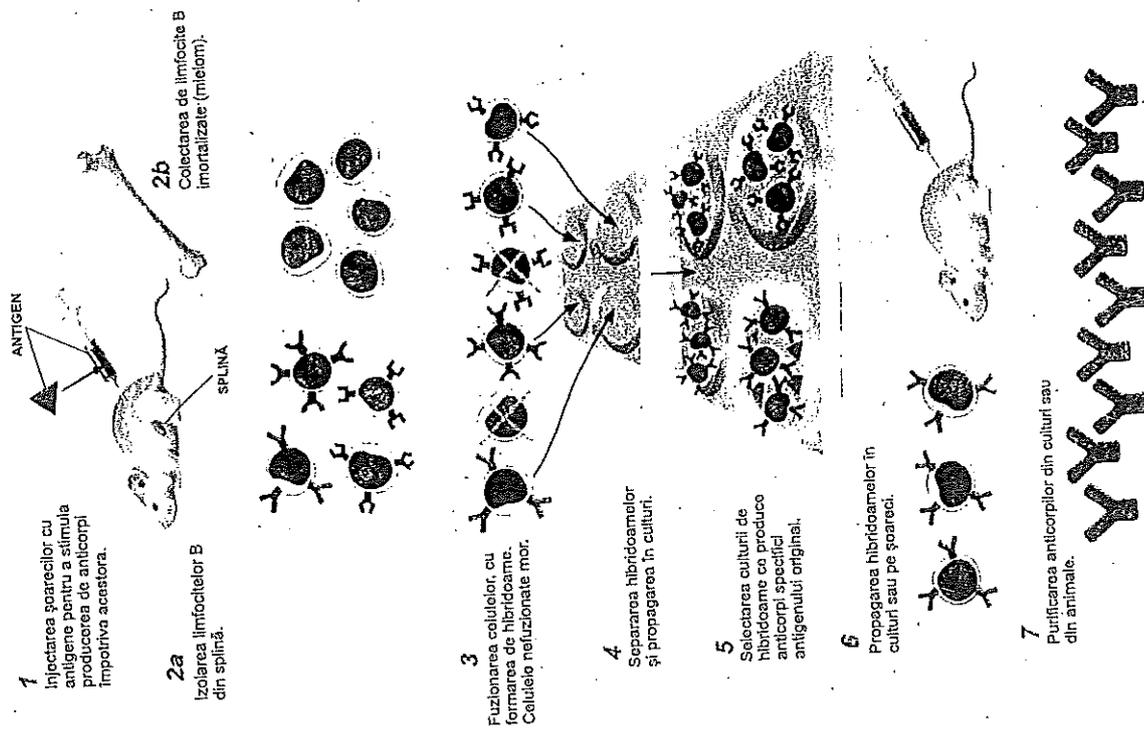
- înalta omogenitate,
- absența fracțiilor de imunoglobuline nespecifice,
- ușurința de caracterizare antigenică
- lipsa variabilității între diferite loturi de producție.

Specificitatea anticorpilor monoclonali merge până într-atât încât pot recunoaște nu numai o secvență precisă dar și anumite modificări conformaționale ale unui epitop. Astfel anticorpii precisiș dar și anumite modificări conformaționale ale unui epitop. Astfel anticorpii monoclonali ALZ50 recunoaște specific o anumită secvență de aminoacizi a proteinei asociate microtubulilor, tau, dar și o modificare conformațională caracteristică a acestei proteine pentru patologia de tip Alzheimer.

Totuși un anticorp policlonal poate fi mai sensibil dar mai puțin specific față de cel monoclonal. Cauza este aceea că anticorpii policlonali (de fapt un amestec de anticorpi) poate recunoaște mai mulți epitopi diferiți situați pe același antigen, în timp ce anticorpii monoclonali recunoaște doar un singur tip de epitop. Astăzi, tehnicile sofisticate de amplificare a reacțiilor imunohistochimice, cuplate cu utilizarea tehnicilor de demascare a antigenelor au redus importanța practică a acestei diferențe.

Cu toate acestea, anticorpii monoclonali prezintă unele avantaje față de cei policlonali: au omogenitate, neconținând anticorpi nespecifici și nu prezintă variabilitate între loturi diferite. Totuși, un aspect deosebit de util pentru a alege corect clona de lucru, este reprezentat de testarea anticorpilor monoclonali, în primul rând pe secțiuni la gheață, deoarece nu toți epitopii specifici se păstrează după fixarea cu formalină.

Important, epitopul țintă al unui anticorp trebuie să fie unic. Înalta specificitate a unui anticorp monoclonal este pierdută dacă anticorpii sunt direcționați împotriva unui epitop comun mai multor antigene. În vreme ce reactivitatea încrucișată a unui anticorp policlonal poate fi eliminată prin procedee de adsorbție, cea dată de un anticorp monoclonal nu poate fi îndepărtată.



Producerea anticorpilor monoclonali cu ajutorul hibridomelor

Nu în ultimul rând, trebuie să se țină cont de faptul că anticorpii monoclonali depind mai mult de pH-ul și concentrația în săruri a mediului de lucru comparativ cu anticorpii policlonali.

Termenul de **reactivitate încrucișată** se referă la reacția care poate să apară între un anticorp și doi sau mai mulți antigeni sau invers (un antigen și mai mulți anticorpi). Termenul definește de asemenea modificările induse accidental la nivelul epitopilor în urma procesului de demascare a antigenului, determinând pierderea specificității unui anticorp monoclonal pentru antigenul specific. Atunci când se descriu celele sau componente tisulare marcate de același anticorp, nu este indicată folosirea termenului de "reactivate încrucișată".

Gamma anticorpilor comercializați este astăzi deosebit de largă, dar trebuie avut în vedere faptul că stabilitatea acestor anticorpi este influențată de o serie de factori ca urmare:

- anticorpii policlonali sunt mai puțin stabili decât cei monoclonali;
- anticorpii monoclonali sunt influențați de modalitatea de purificare și stocare (cei mai sensibili sunt anticorpii de tip IgM și IgG2b);
- anticorpii prediluși au o durată de viață mai scurtă decât cei concentrați;
- temperatura crescută de stocare accelerează degradarea anticorpilor.

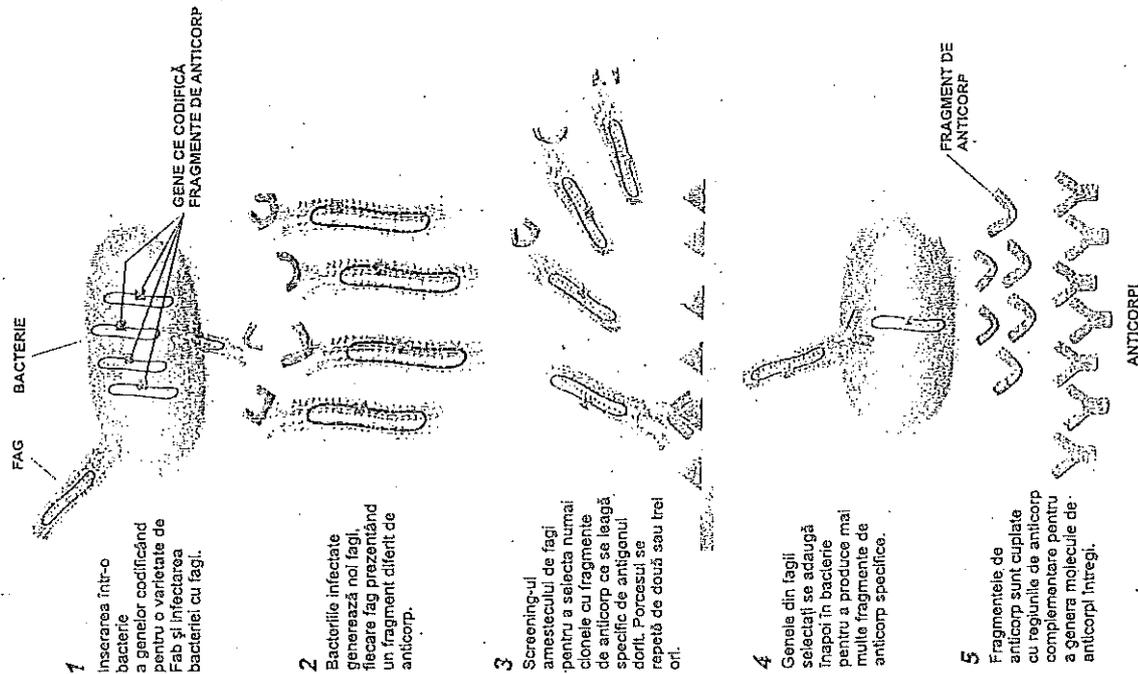
Pentru a evita compromiterea reacțiilor imunohistochimice, este bine ca fiecare laborator să respecte câteva **reguli de utilizare a soluțiilor**:

- anticorpii prediluși se vor stoca la temperaturi de 2-8°C și nu la congelator, deoarece înghețarea lor duce la pierderea activității;
- soluțiile de concentrate proteice se vor păstra la -20°C, prevenindu-se ciclurile de înghețare/dezghetare repetată;
- înainte de utilizare, soluțiile proteice se vor dezgheta, fără a depăși 25°C (aceasta fiind temperatura de lucru din laborator);
- se vor respecta cu strictețe datele menționate de producător pentru fiecare din produsele utilizate.

În cazul în care specificitatea antiserurilor pentru o anumită specie este critică, sunt necesare procedee speciale de purificare. Aceste metode sunt așadar utile atunci când este vorba de antiseruri (anticorpi policlonali) și mai puțin atunci când avem de a face cu anticorpi monoclonali.

Ca și aplicație imediată, aceste procedee sunt necesare pentru purificarea anticorpilor secundari care se doresc a reacționa numai cu o anumită specie de anticorpi primari, știind fiind faptul că alegerea unor anticorpi secundari monoclonali ar fi mai costisitoare.

Se descriu două metode larg utilizate de purificare ale anticorpilor: **adsorbția în fază solidă și izolarea prin afinitate.**



1 Inserarea într-o bacterie a genelor codificând pentru o varietate de Fab și infectarea bacteriei cu fagi.

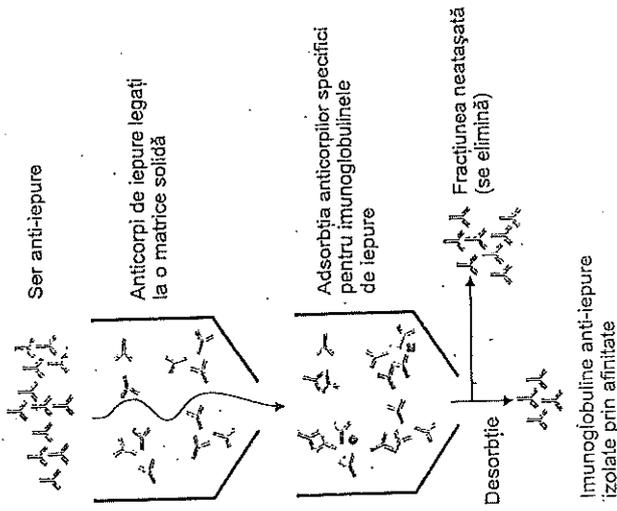
2 Bacteriile infectate generează noi fagi, fiecare fag prezentând un fragment diferit de anticorp.

3 Screening-ul amestecului de fagi pentru a selecta numai clonele cu fragmente de anticorp ce se leagă specific de antigenul dorit. Procesul se repetă de două sau trei ori.

4 Genele din fagi selecționați se adaugă înapoi în bacterie pentru a produce mai multe fragmente de anticorp specifice.

5 Fragmentele de anticorp sunt cuplate cu regiunile de anticorp complementare pentru a genera molecule de anticorpi întregi.

*Producerea anticorpilor monoclonali prin tehnica de clonare într-un vector de prezentare a fagului*

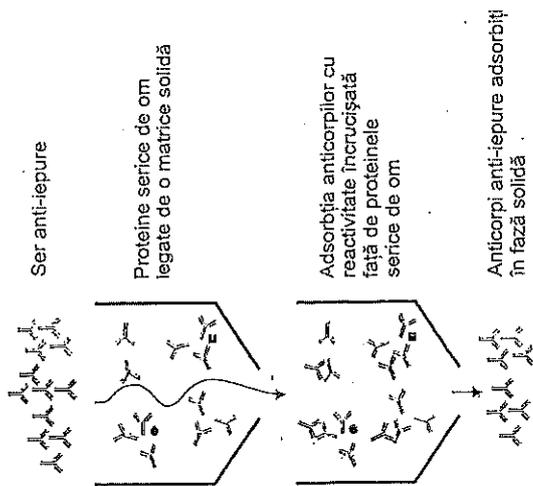


#### Purificarea anticorpilor prin izolare pe baza afinității față de o antimită imunoglobulină

Anticorpii provenind de la animale hiperimunizate nu diferă numai în ceea ce privește epitopii recunoscuți pe antigenele multivalente, dar și în ceea ce privește afinitatea lor pentru acești epitopi. Afinitatea unui anticorp pentru determinantul său antigenic se prezintă sub două aspecte, afinitate "intrinsecă" și afinitate totală, "funcțională".

Afinitatea intrinsecă a unui anticorp față de un antigen se bazează pe regiunile hipervariabile ale porțiunii Fab, și anume pe aceleași secvențe care îi asigură specificitatea față de acel antigen. Așadar cele patru tipuri de legături non-covalente (interacțiunile ionice, punțile de hidrogen, forțele van der Waals, și respingerea hidrofobă) sunt principalii factori ce determină afinitatea intrinsecă a paratopului de pe molecula de anticorp față de epitopul antigenului.

Constanța de echilibru (Ka) a reacției de legare a unui singur paratop (sau a unui anticorp monovalent) la un antigen, este un indicator al afinității sale. Se măsoară în litri/mol (l/m) și este inversul concentrației exprimate în mol/litru.



#### Purificarea anticorpilor prin adsorbție în fază solidă

Fracțiunile de anticorpi cu reactivitate încrucișată față de diferite specii sunt eliminate prin adsorbția în fază solidă. Procedul se bazează pe existența unei coloane de filtrare umplută cu o matrice în care sunt prinse proteine serice omoloage cu specia față de care se dorește eliminarea reacției încrucișate. Anticorpii din serul policlonal sunt trecuți prin această coloană, iar numai fracțiunea care nu prezintă reactivitate față de antigenele din matrice poate trece în fluidul de eluție. Pentru creșterea eficienței procedul se poate aplica succesiv, de mai multe ori. În culturile de celule, serul de vițel este un mediu nutritiv frecvent utilizat, iar procedeele imunocitochimice necesită în mod esențial anticorpi care au fost selectați prin adsorbție față de serul de vitel.

Izolarea prin afinitate este un alt procedeu de selecție care se bazează pe reținerea într-o matrice solidă numai a fracțiunii de anticorpi specifici pentru un antigen inclus în matrice (Figura XV.5). În prima fază, toate celelalte componente ale antiserului, inclusiv alți anticorpi fără specificitate pentru acest antigen, trec prin filtru fără a fi reținuți. În a doua fază a procesului, printr-o spălare cu o soluție care desface legătura antigen-anticorp, anticorpii reținuți în matrice sunt eliberați și prelăuați separat.

Este important de reținut că izolarea prin afinitate nu elimină reactivitatea încrucișată între specii. Aceste interacțiuni sunt eliminate printr-o etapă de adsorbție efectuată înainte de izolarea prin afinitate.



$$K_a = \frac{[\text{Atc} - \text{Atg}]}{[\text{Atc}] \times [\text{Atg}]}$$

Acastă constantă  $K_a$  ia în general valori cuprinse între 103 și 1010 l/m. Cu cât afinitatea unui anticorp pentru un antigen este mai mare, cu atât cantitatea de antigen necesară pentru a satura sinusurile Fab ale anticorpului este mai mică (se ajunge la un echilibru al reacției). Simplificat, afinitatea este un indice al forței de legătură dintre un anticorp monovalent și un epitop.

În imunohistochimie, afinitatea funcțională a unui anticorp sau a unui antiser se definește ca timpul necesar pentru a se ajunge la un echilibru al reacției de de asociere - disociere cu antigenul tisular. Dacă se compară în timp cantități egale din doi anticorpi considerați în diluții egale, anticorpul ce atinge un platou de intensitate maximă a marării are o afinitate funcțională mai mare.

**Aviditatea** este cea care descrie afinitatea funcțională, și este de fapt o măsură a afinității totale de legare dintre un anticorp și un antigen. Aceasta deoarece în majoritatea cazurilor (ca excepții fiind fragmentele Fab obținute prin digestia enzimatică a imunoglobulinelor și nano-anticorpii produși de diferite specii de cămile, anticorpii sunt polivalenți, conțin mai mulți determinanți antigenici. Termenul de aviditate se poate deci utiliza pentru sumarea afinităților intrinseci ale unei populații de anticorpi policlonali.

La anticorpii policlonali afinitatea este în general de ordinul  $10^4$  l/m, aviditatea de ordinul  $10^7$  l/m, ar în cazul unui anticorp monoclonal, aviditatea poate ajunge la  $10^{10}$  l/m. O altă trăsătură a anticorpilor policlonali este că ei conțin clone multiple cu afinități variate pentru diferiți determinanți antigenici ai unui epitop. Deoarece reacțiile antigen-anticorp sunt reversibile, complexe imune formate pe țesut pot disocia în cursul proceselor de spălare. Concentrații crescute de săruri și temperaturi de lucru joase pot reduce probabilitatea de a obține o marcare slabă. Așadar riscul disociației este minim în cazul anticorpilor cu aviditate mare. Piaja variată de afinități a clonelor unui anticorp policlonal va asigura la rândul său o probabilitate scăzută de disociere în cazul spălărilor excesive. Anticorpii monoclonali au o afinitate uniformă, și dacă aceasta este mică, atunci există un risc crescut de disociație a complexelor antigen-anticorp. Așadar o afinitate mare este o cerință de selecție mai ales pentru anticorpii monoclonali comparativ cu cei policlonali.

**Anticorpii secundari în imunohistochimie** reprezintă un element cheie în obținerea unor performanțe maxime, și alegerea lor corespunzătoare este deci o etapă de maximă importanță în pregătirea reacțiilor de imunodetecție. Selecția celui mai bun anticorp secundar poate îmbunătăți imunomarcarea și duce la reducerea șanselor de apariție a semnalelor fals pozitive sau fals negative.

Sintetizăm mai jos câteva informații care ajută la alegerea celui mai bun anticorp secundar pentru o anumită imunomarcare:

1. **Specia anticorpului primar folosit.** Este cel mai important fapt de care trebuie să se țină seama, anticorpul secundar trebuind să fie anti-specia primarului, de exemplu dacă primarul este un anticorp provenind de la iepure, secundarul trebuie să fie specific anti-iepure.

2. **Clasa și subclasa anticorpului primar.** Dacă se folosește ca primar un anticorp monoclonal subclasa IgG2a (șoarece), este recomandat un secundar specific anti-șoarece și anti IgG2a. Dacă nu se cunoaște subclasa primarului se poate folosi și un anticorp anti-șoarece complet însă riscul apariției semnalului fals-positiv este mai mare. În cazul anticorpilor primari policlonali, aceștia sunt de obicei constituți din clasa IgG, deci un secundar anti-specie și anti-IgG este alegerea ideală. Această metodă de folosire a complexelor anticorpi primari-anticorpi secundari subclasă specifici este de asemenea folosită când se dorește proiectarea unui imunomarcaj multiplu cu mai mult de două imunodetecții.

3. **Specia în care este dezvoltat anticorpul secundar** se pare că nu influențează prea mult reactivitatea cu excepția unor cazuri izolate. Așadar selecția speciei secundarului se poate face pe alte criterii (cost, disponibilitate, etc.)

4. **Forma anticorpului secundar.** Anticorpii purificați prin afinitate sunt cei mai frecvent folosiți și dau cel mai puțin marcaj nespecific. Cu toate acestea fracțiunile de IgG pot conține în amestec și anticorpi cu o foarte mare afinitate, aceste seruri fiind indicate în situațiile când antigenul este în cantitate foarte mică.

5. **Anticorpii secundari conjugați sau etichetați.** Anticorpii secundari pot fi etichetați cu molecule de detecție (fluorofori, enzime) sau conjugați cu biotină. Peroxidaza este mai ieftină, mai stabilă în vreme ce fosfataza alcalină este mai sensibilă produșii săi de dezvoltare precipitând mai intens. Marcarea fluorescentă a secundarilor se folosește de obicei în scopul detecției multiple și mai puțin pentru detecția simplă. Conjugarea cu biotină oferă un grad mai mare de amplificarea a reacției (tehnicile ABC și Amplificare Catalizată a Semnalului).

6. **Anticorpii secundari adsorbiți.** Unii anticorpi secundari sunt adsorbiți cu imunoglobuline umane sau animale. Acest tip de anticorpi sunt necesari pentru reducerea marcării nespecifice. De exemplu, pentru a lucra pe țesut de șobolan este recomandat un anticorp adsorbit pentru IgG de șobolan și care astfel nu se va putea lega din greșală direct pe țesutul de șobolan. Există aici o excepție, și anume când specia anticorpului primar este înrudită cu cea pentru care se face adsorbția. În exemplul de mai sus, dacă anticorpul primar este tip iepure și secundarul este capră anti-iepure adsorbit pentru IgG de șobolan, totul este perfect, dacă însă primarul este de tip șoarece, atunci adsorbția secundarului pentru imunoglobulinele de șobolan poate scădea capacitatea de legare și față de primarul de șoarece. În acest caz, nu sunt recomandați anticorpi adsorbiți.

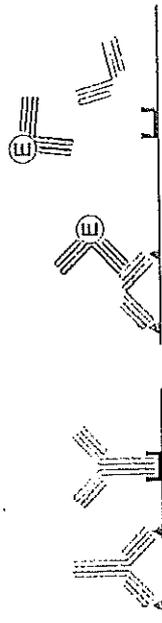
## Mini imuno-dicționar

7. Anticorp secundar sub forma serului complet IgG sau numai fragmente F(ab)<sub>2</sub>. Atunci când se lucrează cu țesuturi cunoscute pentru prezența receptorilor Fc (timus, splină, sânge, celule hematopoietice, leucocite, limfocite B) este indicată alegerea unui anticorp secundar de tipul F(ab)<sub>2</sub> pentru a elimina legarea non-specifică.

8. Anticorpi secundari sub forma anti-IgG(H+L). Acest tip de anticorp reacționează atât cu lanțul ușor cât și cu lanțul greu al moleculei de imunoglobulină și deci cu toate clasele de anticorpi primari. Așadar este cel mai folosit tip de anticorp secundar.

9. Anticorpi secundari anti-IgG, specifice pentru fragmentul Fc. Acest tip de anticorpi reacționează numai cu porțiunea Fc a lanțului greu, fiind adsorbiți pentru porțiunea F(ab)<sub>2</sub>. Pot fi adsorbiți în plus pentru a asigura reactivitatea față de un singur izotop. Sunt folosiți pentru creșterea specificității față de un anticorp monoclonal.

10. Anticorpi secundari anti-IgG, specifice pentru fragmentul F(ab)<sub>2</sub>. Aceste imunoglobuline au fost adsorbite pentru fragmentele Fc și reacționează deci numai cu porțiunea Fab a anticorpilor primari. Acești anticorpi sunt utili pentru imunomarcările duble sau pe țesuturile bogate în receptori Fc (timus splină).



Imunoglobulina completă Anticorpul primar F(ab)<sub>2</sub> se leagă specific. Se poate lega nespecific secundar specific pentru fragmentul F(ab)<sub>2</sub>, care ideal este și el F(ab)<sub>2</sub>.

*Avantajele anticorpilor primară și secundari sub forma F(ab)<sub>2</sub>*

**Afinitate** = Indice al forței de legătură dintre un anticorp monovalent și un epitop.

**Amplificare** = capacitatea mai multor molecule de a produce o substanță vizibilă la locul de detecție al frecării molecule cercetate dintr-un specimen studiat (de exemplu, două molecule de anticorpi se leagă strâns la un situs antigenic și fiecare moleculă de anticorp transportă câteva molecule de marcator fluorescent, utilizarea marcatorelor enzimatici generând un produs final insolubil, chiar la cantități minime de substrat).

**Anticorp primar** = anticorp sau antiser care se combină direct cu antigenul studiat. Cu excepția tehnicilor de imunofluorescență directă, anticorpul primar este nemarcat.

**Anticorp secundar** = este un antiser care se combină cu fragmentele Fc ale anticorpului primar ale cărui fragmente Fab sunt legate la situsurile antigenice tisulare studiate.

**Antigenicitate = imunoreactivitate** = termen utilizat pentru a descrie gradul de reactivitate al unui antigen tisular, cel mai adesea fiind corelată cu intensitatea imunocolorației.

**Antiser** = ser policlonal.

**Aviditate** = Indice al forței de legătură dintre un anticorp polivalent și epitopii săi.

**Biotinuire** = conjugarea proteinelor sau a altor molecule mari cu biotina.

**Demascare** = procesul prin care situsurile antigenice sunt evidențiate, dar care uneori poate cauza deteriorarea antigenului.

**Haptenă** = mic antigen care nu are antigenicitate suficientă pentru a determina un răspuns imun puternic.

**Imunizare** = administrarea de antigen unui animal pentru a evoca producția de anticorpi (termen aplicat inițial pentru a defini inducerea imunității în bolile infecțioase), actul injectării materialului antigenic purtând numele de inoculare.

**Intensitate** = evaluare cantitativă sau calitativă a colorării.

**Marcator** = moleculă atașată artificial la o proteină prin legături covalente. Tipul de marcator folosit în IHC este corelat cu gradul amplificării și cu sensibilitatea tehnicii (substanțe fluorescente, enzime, biotina, aurul coloidal).

**Sensibilitate** = cantitatea minimă de antigen detectată printr-o imunocolorație. Este dependentă de imunoreactivitate, de tipul de colorație și de afinitatea anticorpului primar.

**Specificitate** = capacitatea (gradul) anticorpului de a reacționa numai cu antigenul în cauză și nu cu alt antigen, dependentă de puritatea antigenului utilizat pentru producerea anticorpului.

**Substrat** = reactiv specific pentru enzime în colorațiile imunoenzimatică care permite detecția spectrală a antigenului de cercetat.

**Tehnică directă** = tip de colorare care utilizează un anticorp primar marcat. Procedura se desfășoară într-un singur timp.

**Tehnică indirectă** = tip de colorare care utilizează un anticorp primar și un anticorp marcat de rang secund sau mai mare.

### III. PRELUCRAREA TESUTURILOR PENTRU IMUNOHISTOCHEMIE

#### III.1. Specimene utilizate în imunohistochimie

În prezent, în experimentele de imunohistochimie se folosesc patru tipuri de bază de specimene tisulare:

- Secțiuni din țesuturi incluse la parafină.
- Secțiuni din țesut înghețat.
- Secțiuni în sistem neatașat de o lamă (free-floating).
- Specimene citologice sau frotiuri.

Secțiunile efectuate din preparatele fixate și incluse în blocuri de parafină constituie probabil cel mai frecvent tip de preparare a speciemenelor pentru imunohistochimie. Țesuturile fixate, cel mai frecvent în formalină 10% (concentrație reală de 4%) sau paraformaldehidă 4%, sunt incluse în blocuri de parafină și secționate cu ajutorul microtomului. Dacă în majoritatea tehnicilor histologice se preferă secțiuni cu grosimea de 4 μm, pentru o observare de bună calitate a rezultatelor chiar și cu un obiectiv cu grosimet mare, în imunohistochimie clasică se preferă secțiuni cât mai subțiri. Dacă microtomul este echipat cu o unitate de răcire a blocului de parafină, se pot tăia secțiuni de bună calitate de până la 1 μm. Microtomul rotativ este adecvat blocurilor mici în vreme ce un microtom cu mâner, cu o cursă lungă a cuțitului, se poate folosi de exemplu pentru secționarea unei întregi emisfere cerebrale. După tăiere, secțiunile se uniformizează într-o baie de apă caldă, sau și mai eficient într-o baie de alcool 60% și apoi în baia de apă caldă. O a doua deosebire între prelucrarea pentru histologie și cea pentru imunohistochimie este faptul că aici se folosesc lame acoperite cu adeziv special pentru a împiedica desprinderea țesutului în cursul procesării (tehnologiile Super Frost și Poly-L-lysine). Adeziunea țesutului pe lamă este completă după o uscare de o noapte într-un incubator la 45°C.

Secționarea țesutului înghețat este folosită când sunt necesare atunci când se urmărește un diagnostic rapid sau când antigenele analizate sunt susceptibile de a fi blocate ireversibil de un agent fixativ. Anticorpii pentru receptori de estrogen puteau fi utilizați numai pe țesut înghețat până la apariția anticorpilor dezvoltat specific pentru epitopii modificați conformațional de formalină. Cu o preparare corespunzătoare a țesutului înghețat se obține o conservare desul de bună a morfologiei țesutului, însă se pare inferioară fixării în formalină. În general există două concepte în ceea ce privește prepararea țesuturilor prin această metodă: imersia rapidă în azot lichid și crioprotecția într-un mediu de sucroză cu imersia ulterioară în azot lichid. În afară de disponibilitatea mai mare a epitopilor un alt avantaj al țesutului înghețat este lipsa contracției (datorate în tehnica fixării în formalină alcoolilor și solventilor) în masa țesutului, esențială în cursul unor investigații stereologice și de numărătoare celulare.

Procedul de secționare poate fi descris după cum urmează:

1. Învălirea fragmentului în mediu de crioprotecție (Tissue-Tek, Sakura de exemplu), și apoi imersie în azot lichid sau izopentan. În acest stadiu blocurile pot fi depozitate la -80°C.
2. Secționare la criotom (grosimile pot varia de la 4 μm pentru imunohistochimie clasică la mai mult de 50 μm pentru microscopia confocală). Secțiunile se lipesc pe lame tratate SuperFrost și pot fi depozitate la -80°C pe termen lung sau la -20°C pentru câteva săptămâni.
3. Înainte de începerea experimentului, lamele se aduc la temperatura camerei timp de 30 de minute și se fixează în acetonă rece pentru 5 minute. Se usucă apoi timp de 30 de minute.
4. Spălare în apă distilată și începerea protocolului de imunohistochimie (demascarea antigenică nu mai este necesară).

Secțiunile în sistem neatașat de lamă sunt folosite în special în neurobiologie, pentru buna conservare a antigenelor (fără fixare sau cu o fixare minimă) și datorită vitezei cu care pot fi prelucrate (nu mai este necesară aderența de o lamă). Pentru a putea fi prelucrate astfel, secțiunile trebuie să aibă cel puțin 50 μm. Ele pot fi obținute din material înghețat (cu ajutorul criotomului, așa cum s-a descris mai sus), sau din țesut fixat dar neinclus în parafină (cu ajutorul unui vibrator). Fiecare secțiune este apoi prelucrată pe parcursul experimentului într-un vas special de dimensiuni adecvate, soluțiile fiind adăugate și spălate cu ajutorul unor pipete.

Specimenele citologice sub forma unui frotiu convențional sau frotiu în monostrat se obțin fie prin tehnica manuală clasică a frotiului fie în mod semiautomat cu ajutorul unor dispozitive și centrifugi speciale pentru lame (de ex. centrifuga Shandon Cytospin). Blocurile celulare prezintă avantajul aplicării aceluiași protocol de lucru ca în cazul secțiunilor tisulare incluse la parafină și oferă posibilitatea efectuării de secțiuni multiple pe care se pot lucra markeri diferiți. De asemenea, aceste preparate oferă posibilitatea comparării rezultatelor obținute cu cele publicate în literatură de specialitate, ca urmare acest material este cel preferat pentru studiul IHC. Dezavantajul acestor preparate este acela că uneori materialul celular nu este suficient pentru o evaluare morfologică.

Materialele centrifugate preparate cu atenție păstrează intactă morfologia celulară, numărul de celule oferite pentru studiu putând fi controlat. Pentru ca preparatele obținute să fie optime pentru imunocolorare și interpretare este necesar ca:

- în cazul în care proba conține numeroase eritrocite acestea să fie lizate cu clorură de amoniu sau acid acetic;
- pentru a evita distrugerea celulelor centrifugarea să se facă la viteză mică o perioadă de timp scurtă (5 minute, la 650 rotații/minut), adăugarea de albumină serică bovină în suspensie realizând stabilizarea celulară;
- celularitatea să fie controlată, ajustând concentrația la valorile standard concordante cu realizarea unui monostrat;

Cea mai importantă cale, pentru a evita erorile, este ca întotdeauna frotiurile să fie colorate cu un panel de anticorpi și niciodată să nu se utilizeze un singur anticorp pentru confirmarea unui diagnostic. Absența reactivității cu alți markeri dintr-un panel de anticorpi este o informație foarte importantă, care poate evita interpretările fals pozitive cronate.

### III.2. Fixarea țesuturilor și frotiurilor

Pentru a putea fi prelucrate prin secționare, țesuturile trebuie pregătite anterior prin fixare, deshidratare și includere la parafină. Procesul de fixare inadecvat poate duce la alterarea rezultatelor obținute ulterior, atât prin metodele histochimice, cât și prin cele imunohistochimice, dar în același timp fixarea este absolut necesară, prin ea încercându-se o prezerare a țesuturilor cât mai apropiată de aspectele intravitale, totodată ea prevenind autoliza și contaminarea acestora.

Pentru realizarea în condiții optime a unei imunocolorări, este necesar ca fixatorul să păstreze integritatea antigenelor și să limiteze difuziunea, extracția sau deplasarea acestora în cursul proceselor subsecvente.

Pentru fixarea țesuturilor, în histopatologie, se utilizează două tipuri de fixatori (clasificați după Baker, 1960):

1. fixatori coagulanți (etanolul, formolul, fixator formol mercuric B<sub>3</sub>, etc);
  2. fixatori non-coagulanți sau cross-linking (formaldehidă).
- Această clasificare are în vedere mecanismul prin care acționează acești fixatori asupra țesuturilor; existând și fixatori care prezintă mecanism de acțiune combinat (ca de exemplu fixatorii pe bază de săruri de mercur).

Toate tipurile de fixatori pot modifica configurația sterică a proteinelor. ducând la mascarea epitopilor și, în consecință, la alterarea rezultatelor reacțiilor imunohistochimice.

Se pare însă că fixatorii de tip coagulant determină modificări mai puțin importante decât fixatorii non-coagulanți. De asemenea fixatorii de tip coagulant sunt foarte buni pentru păstrarea imnoreactivității imunoglobulinelor și a filamentelor intermediare. Cu toate acestea, cele mai multe laboratoare folosesc pentru fixare *formalina neutră*. Deoarece tehnicile de prelucrare a țesuturilor fixate în formalină prevăd și o etapă de tratare a țesuturilor în etanol absolut, înseamnă că, de fapt, se realizează astfel o dublă fixare: în formalină și apoi în etanol.

S-a observat că asocierea formaldehidei cu alcoolul etilic ca fixatori în laboratoarele care realizează procesarea automată a materialului nu a dat rezultate mai bune, deoarece apare așa-numitul efect "periferic" (reacție pozitivă doar la periferia secțiunii), datorită fixării de tip metilenic a formolului la marginea secțiunii și a fixării coagulative a alcoolului în zona centrală a secțiunii.

Pentru realizarea unei bune fixări a țesuturilor, pe lângă tipul de fixator utilizat, sunt foarte importante: concentrația fixatorului, pH-ul acestuia, durata fixării și temperatura la care se realizează fixarea.

Cel mai răspândit fixator utilizat azi în cele mai multe laboratoare este *formaldehida 4%*, tamponată pentru a ajunge la pH 7. Tamponarea acesteia se realizează cu clorură de sodiu, acetat de sodiu, fosfat monosodic sau disodic. Unele laboratoare realizează o postfixare în fenol-formalină, timp de aproximativ 6

protocoul de fixare să fie optim pentru laboratorul respectiv (Suthipintawong și col. în 1996 au stabilit că cea mai bună combinație pentru păstrarea morfologiei, imnoreactivității și reducerea colorației nespecifice este realizată prin fixarea în formol salin 0,1%, la 27°C, peste noapte, urmată de postfixare în etanol 100%, timp de 10 minute).

Frotiurile colorate se pot utiliza în scopul imunocolorării, cu sau fără decolorare prealabilă în alcool, atunci când nu avem o altă posibilitate. În acest caz, apar însă o serie de probleme tehnice cum ar fi:

- desprinderea celulelor, în cazul în care frotiul nu a fost realizat pe lame cu adeziv adecvat;
- întinderea frotiurilor poate deteriora celulele, făcând uneori imposibilă evaluarea adecvată a markerilor citoplasmatici și membranari;
- numărul frotiurilor de bună calitate este limitat (aspiratele decolorate fiind cel mai dificil de prelucrat și interpretat).

Cele mai multe laboratoare utilizează pentru imunocolorare tehnica complexului avidină-biotină, descrisă anterior.

În interpretarea preparatelor obținute din revărsate și aspirate apar o serie de dificultăți datorită prezenței unui număr crescut de eritrocite, granulocite sau macrofage cu un conținut mare de peroxidază endogenă, colorația nespecifică făcând uneori preparatele imposibil de interpretat. Acest lucru poate fi evitat prin utilizarea fosfatazei alcaline ca marker enzimatic sau prin inhibarea activității peroxidazei endogene (ex. soluție azidă de sodiu 0,1% în peroxid de hidrogen 0,3%). Aceleași probleme le poate crea biotina endogenă (din celulele din ficat, rinichi, creier), dar aceasta poate fi inhibată cu kit-uri ce conțin avidină sau biotină. De asemenea, în special pe frotiurile obținute din aspirate, prezența detritusurilor necrotice și a fibrei determină colorație nespecifică de fond (blocarea acesteia putându-se realiza cu ser non-immun de capră sau cal). O problemă tipică pentru frotiurile realizate din aspirate este „depunerea” anticorpului primar în interstițiul placardelor celulare tridimensionale, în cazul frotiurilor prost întinse, dând o falsă colorație pozitivă la periferia placardelor.

O altă problemă a preparatelor citologice este aceea că există riscul supracolorării, deoarece celulele izolate sunt mai ușor accesibile anticorpului, iar antigenele sunt mai bine prezervate, ca urmare utilizarea controalelor pozitive și negative este absolut necesară. Controlul ideal este cel realizat pe un material citologic; este însă mai practică folosirea controlului pozitiv sau negativ intern de pe același frotiul.

Pentru a evita eventualele greșeli, interpretarea imunocolorării preparatelor citologice, trebuie restricționată la celule individuale intacte și la placardele celulare mici din afara zonelor de necroză și hemoragie.

Deoarece imunopozitivitatea specifică prezintă heterogenitate tipică de la o celulă la alta, va trebui să privim cu suspiciune un preparat în care toate celulele se colorează intens și uniform. De cele mai multe ori, acest tip de colorare indică o reacție fals pozitivă. De asemenea, ținând cont de sensibilitatea ridicată a imunocolorării, imunopozitivarea celulelor tumorale izolate nu trebuie considerată ca un rezultat pozitiv, iar ca regulă pentru imunocitodiagnostic pozitiv, trebuie ca minim 10% din celule să fie colorate.

ore, stopându-se astfel formarea "pigmentului" de formalină care apare în soluția de formaldehidă acidă.

Pentru fixarea standard, se recomandă soluția de formaldehidă neutră tamponată, cu următoarea compoziție:

- 100ml formaldehidă 40%;
- 900 ml apă distilată;
- 4 g fosfat monosodic;
- 6,5 g fosfat disodic.

O altă formulă mai ușor de realizat care este aplicată cu succes în multe laboratoare este cea de formol salin:

- 100 ml formaldehidă 40%;
- 90 ml apă distilată sau de robinet;
- 9 g clorură de sodiu.

Formaldehidă este un gaz fără culoare, solubil în apă. Preparatele apoase comerciale de formaldehidă, numite și formalină, conțin 37-40% gaz solubilizat. Ele conțin, de asemenea, acid formic (sub 0,05%) și 10% metanol, care este adăgat pentru a preveni polimerizarea formaldehidei în paraformaldehidă. Metanolul și acidul formic fac ca aceste soluții să fie un fixator inadecvat pentru structurile fine. Paraformaldehidă este o formă polimerizată de formaldehidă care disociază la 60°C și pH neutru. Soluțiile proaspăt preparate de paraformaldehidă sunt preferate pentru multe proceduri imunohistochimice, deoarece ele reprezintă un fixator fără aditivi externi și acești fixatori sunt de obicei preferați la începutul unui protocol de fixare.

Deși este cea mai simplă aldehidă, reacțiile formaldehidei cu proteinele sunt complexe. Formaldehida leagă încrușcat proteinele prin legarea de grupările amino, amido, guanidino, tiol, fenol, imidazol și indol și formează derivați hemiacetali. Dacă produșii hemiacetali adionați sunt în vecinătatea altor proteine, ei reacționează prin condensare și formează punți metilen stabile chimic, care leagă încrușcat proteinele. Reacțiile de adiție ale formaldehidei sunt ușor reversibile prin spălarea cu apă sau alcool. Spălarea prelungită a țesuturilor poate, în unele cazuri, să restabilească antigenicitatea proteinelor fixate. Nivelurile maxime de legare a proteinelor apar la un pH cuprins între 7,5-8. La un pH mai mic, grupările amino primare sunt areactive, ceea ce nu favorizează reacțiile de legare încrușcate. Adăgarea de bicarbonat în formaldehidă minimizează extracția proteinelor din țesuturi. Formaldehida împiedică extracția glicogenului, dar nu conservă polizaharidele solubile. Mucopolizaharidele acide nu sunt conservate decât dacă sunt legate de proteine. Formaldehida este un fixator bun pentru lipide, în special dacă în soluția de fixare se includ 1-2 mM  $Ca^{2+}$  sau  $Mg^{2+}$ . Fixarea membranelor este îmbunătățită prin reducerea extracției de lipide. Se crede de asemenea că fixarea cu formaldehidă scade solubilitatea fosfolipidelor membranare în apă.

Se știe că, în cazul țesuturilor fixate în formaldehidă, intensitatea reacției imunohistochimice depinde, pentru cei mai mulți antigeni, de durata fixării. Astfel, s-a observat că fragmentele tisulare mici (cu dimensiuni de 1/1/0,3 cm) se fixează optim într-un interval de timp de 6 până la maxim 24 de ore, păstrându-se morfologia țesuturilor și integritatea antigenului, iar pentru biopsiile cu dimensiuni mai mari nu trebuie depășită o perioadă maxim admisă de fixare de 48 de ore.

Fixarea în formalină a scos la iveală de-a lungul timpului o serie de avantaje cum ar fi:

1. realizează o bună penetrabilitate a țesuturilor fără a altera semnificativ proteinele citoplasmatiche;
2. oferă o bună conservare a morfologiei țesuturilor chiar după o fixare îndelungată;
3. determină o mai bună sterilizare decât fixatorii coagulanți în cazul particulelor virale;
4. realizează o mai bună conservare a antigenelor de tip carbohidrat;
5. păstrează mai bine antigenele de tip peptidic cu greutate moleculară mică, acestea fiind extrase de către fixatorii de tip non-coagulant.

Pe lângă formalină, se pot utiliza și alți fixatori fiecare cu mecanismul lor de acțiune, cu avantajele și dezavantajele pe care le prezintă.

*Acetona și alcoolul* sunt fixatori puternic coagulanți, care acționează prin substituirea apei (ducând la distrugerea multor organe celulare), prin distrugerea legăturilor de hidrogen, în acest fel distrugând structura terțiară a proteinelor. Acești reactivi determină precipitarea proteinelor solubile, dar carbohidrații și acizii nucleici nu sunt fixați și vor fi îndepărtați prin spălare. Lipidele, atât cele membranare cât și cele citoplasmatiche sunt solubilizate și extrase de către acești fixatori. S-a remarcat că la temperaturi scăzute (0 până la -20°C), etanolul precipită cu greutate moleculară mare, cum ar fi proteinele citoscheletului, în timp ce antigenele cu greutate moleculară mică (sub 100kDa) sunt în general extrase. Toate aceste aspecte fac ca acești fixatori să fie foarte folositori în microscopia optică.

*Acidul picric* (trinitrofenolul) realizează o fină conservare a structurilor celulare. El determină coagularea proteinelor, prin formarea de săruri cu grupările proteice încărcate pozitiv, precipitatele proteice formate păstrându-și antigenicitatea. Soluția de acid picric se folosește cel mai frecvent în amestec cu formalina, ca de exemplu sub formă de *fixator Bouin*. Fixatorul Bouin penetrează foarte bine țesuturile, durata fixării fiind astfel de maxim 12 ore (în funcție de dimensiunile fragmentului biptic). Înainte de băile apoase din cursul procesării țesutului, piesele trebuie spălate în etanol 70% pentru precipitarea picraților, iar culoarea galbenă poate fi îndepărtată prin tratarea secțiunilor cu tioculfat de sodiu 5%. Fixatorul Bouin are următoarea formulă:

- 75 ml soluție saturată apoasă de acid picric (1,2%);
- 25 ml formaldehidă 40%;
- 5 ml acid acetic glacial.

*Fixatorii pe bază de clorură de mercur* au fost introduși pentru a ameliora distorsiunile induse de fixatorii pe bază de formalină. Acești fixatori au însă penetrabilitate redusă în țesuturi, în consecință trebuie folosiți pe fragmente tisulare mici. Soluțiile pe bază de clorură de mercur au dublu mecanism de acțiune, determină îndurarea țesuturilor, dar au avantajul utilității demonstrării antigenelor cu localizare citoplasmatică. Detaliile celulare sunt foarte bune, facilitând imunolocalizarea produsului final de reacție.

În ultimul timp, s-a sugerat ca metoda de conservare a antigenității utilizarea, în vederea fixării, a tratamentului la *cuptorul cu microunde*.

colorației se poate realiza prin prelungirea timpului de incubare cu anticorpii și/sau cromogenul, ori prin aplicarea unei tehnici mai sensibile. Totuși, fixarea froiturilor prin uscare oferă avantajul aderenței semnificativ crescute a celulelor pe lamă în comparație cu cele fixate în mediu lichid (aspect important, deoarece celulele trebuie să reziste procedurii de colorare IHC).

După uscare, fixarea poate continua în mediu lichid: postfixare în metanol sau cu May-Grunwald (care acționează ca fixator și colorant). Totuși, metanolul nu este un fixator optim pentru toate metodele, în unele cazuri fiind necesară fixarea în acetonă anhidră timp de 1-3 minute (ex. pentru detectarea antigenilor leucocitari de suprafață). Fixatorii pe bază de formalină sunt utili pentru demonstrarea antigenilor citoplasmatici și a celor membranari, iar formol-acetona este utilă în cercetarea markerilor limfocitari.

### III.3. Demascarea antigenică

Fragmentele tisulare incluse în parafină suferă o serie de modificări ale imunoreactivității antigenelor, fie prin mascarea epitopilor ca urmare a legăturilor formate cu formalina, fie prin distrugerea lor în cazul unei fixări inadecvate. În cursul procesării fragmentelor tisulare, este posibilă legarea la epitopii antigenelor a unor proteine ce determină pierderea parțială sau totală a imunoreactivității antigenului. Unii epitopi sunt rezistenți la fixare, dar alții suferă modificări semnificative, ei fiind formalin-sensibili.

Azi se utilizează o serie de metode în vederea ameliorării imunoreactivității antigenelor din țesuturile ce au fost fixate în formalină. Aceste metode sunt reprezentate de:

- demascarea antigenului prin digestie enzimatică proteolitică;
- demascarea antigenului cu ajutorul căldurii (autoclav, oală sub presiune, cuptor cu microunde);
- demascarea antigenului prin utilizarea combinată a metodelor anterioare.

#### Demascarea antigenului prin digestie enzimatică

Prima enzimă utilizată pentru tratarea secțiunilor fixate în formol în vederea demascării antigenelor a fost tripsina, folosită inițial în cazul colorării imunofluorescente. Cu ajutorul ei în 1976, Huang a reușit expunerea unor determinanți antigenici mascați prin fixare.

Azi se folosesc o serie de alte enzime cum ar fi: pepsina, chemotripsina, pronaza, colagenaza etc.

Deși această metodă implică riscul degradării unor epitopi și tinde să fie înlocuită azi de demascarea prin căldură, totuși metoda rămâne deosebit de utilă pentru evidențierea imunoglobulinelor și a complementului pe biopsiile renale fixate în formol, precum și pentru evidențierea unor citokeratine în diverse țesuturi.

Este foarte important ca în cazul în care se utilizează această metodă să se realizeze o optimizare a timpului de acțiune al enzimei, pentru a preveni o serie de accidente.

Accidentele ce pot apare ca urmare a utilizării digestiei enzimatică ca pretratament sunt reprezentate de:

În anul 1994, Léong a demonstrat că utilizarea cuptorului cu microunde pentru fixarea țesuturilor are un dublu avantaj: pe de o parte înlătură efectele nedorite ale vaporilor de formaldehidă din încăperile laboratoarelor, iar pe de altă parte, ceea ce este foarte important, se realizează o importantă creștere a calității prezervării antigenelor tisulare. Pentru fixare, Léong a folosit doar cuptorul cu microunde, după care țesuturile au fost supuse procesării automate prin deshidratare, clarificare și includere la parafină. Cuptorul cu microunde fusese utilizat anterior pentru a facilita difuziunea fixatorilor chimici în țesuturi, dar folosirea în acest mod a formalinei duce la degajarea de vapori foarte greu de suportat de către cei care lucrează.

Încă din anul 1986, Kok și Boon, au propus înlocuirea formaldehidei cu fixatori de tip *Kryofix* (Merck) sau *Microfix* (Energy Beam Sciences) care se pot introduce la cuptorul cu microunde fără nici un pericol întrucât ei conțin alcool etilic și polietilenglicol, dar se pare că morfologia tisulară nu era păstrată într-o manieră corespunzătoare. Ultimul fixator ce se poate utiliza pentru fixarea la microunde este *Preserve* (Anatech Ltd.), pe bază de glixol, care nu se evaporă nici la temperaturi crescute și care realizează o preservare spectaculoasă a morfologiei tisulare, chiar după fixări de scurtă durată. Acest fixator păstrează foarte bine imunoreactivitatea tisulară.

Fixarea froiturilor citologice în vederea realizării imunocolorării acestora, este de preferat să se facă în mediu lichid, pentru a păstra structura cromatinei, element foarte util în evaluarea modificărilor nucleare. În acest scop se recomandă folosirea etanolului 95% sau a spray-urilor cu carbowax. Astfel vor fi prezervate majoritatea antigenelor (în special cele pentru diferențierea melanomului de un carcinom), deși apar probleme în demonstrarea prezenței markerilor limfocitelor B și T.

Deosebit de utilă pentru realizarea unei imunocitocolorări este metoda prin care froiturile uscate sunt tratate cu soluție 0,1% de formalină tamponată (pH=7,2-7,4), timp de 15 minute, urmată de postfixare în etanol absolut. În cazul în care froiturile conțin numeroase hematii, fixarea se va prelungi până la 24 de ore.

Pentru o creștere semnificativă a intensității produsului final de reacție, se recomandă fixarea froiturilor în soluție de tampon citrat la microunde timp de 10 minute la 95°C. De asemenea, pentru demonstrarea prezenței proteinei S100, a CD3 și a CD20, pe froituri, se recomandă fixarea acestora în acetonă anhidră.

Indiferent de tipul de fixare, se recomandă ca, de la același caz, să se utilizeze cel puțin două froituri, care vor fi colorate cu aceeași metodă, iar pentru scurtaarea timpului de reacție este bine să se realizeze demascarea antigenului cu ajutorul cuptorului cu microunde sau să se crească concentrația anticorului primar.

Pentru ca ulterior să se poată realiza o reacție imunohistochimică, trebuie ca froiturile sanguine să nu fie uscate mai mult de 1-2 ore, deoarece, după acest interval de timp, încep să apară modificări antigenice (s-a demonstrat că markerii de suprafață ai leucocitelor fac excepție de la această regulă, și păstrându-se, chiar dacă uscare la temperatura camerei este de aproximativ o săptămână). În general, froiturile fixate numai prin uscare se colorează slab cu metodele IHC, probabil datorită reducerii densității antigenice a celulelor uscate. Creșterea intensității

- colorabilitate tisulară slabă, datorită unei digestii enzimatiche insuficiente;
- alterări tisulare grave, cu pierderea structurilor citoplasmice, ca urmare a unei digestii enzimatiche prelungite;
- posibilitatea obținerii unor rezultate diferite la utilizarea unor loturi diferite de tripsină, chiar în cazul în care producătorul este același;
- alterarea specificității unor anticorpi primari cu obținerea unor rezultate eronate;
- imposibilitatea demascării unor antigene, în timp ce alte tipuri de antigene pot suferii alterări grave, ireversibile;
- lucrătorii laboratorului pot prezenta alergii la aceste enzime (tripsină).

Procedura de lucru cu tripsină recomandată este următoarea:

- Prepararea soluției de tripsină 0,1% în soluție 0,1% clorură de calciu în apă distilată, adusă la pH 7,8, utilizând NaOH 0,1 M;
- Încălzirea secțiunilor la 37°C, în apă distilată;
- Transferarea secțiunilor în soluția proaspăt preparată de tripsină;
- Transferarea secțiunilor în apă de robinet după expirarea timpului de digestie.

Folosirea proteazei se poate realiza după următoarea procedură de lucru:

- Prepararea soluției de protează 0,05 sau 0,1% în apă distilată adusă la pH 1,8, utilizând NaOH 0,1 M;
- Încălzirea secțiunilor la 37°C în apă distilată;
- Transferarea secțiunilor în soluția proaspăt preparată de protează;
- Transferarea secțiunilor în apă de robinet după expirarea timpului de digestie (care este mai scurt decât în cazul tripsinei, pronaza realizând o digestie mai rapidă).

Pentru unele antigene (de exemplu proteinele membranei bazale) este necesar un pretratament prin digestie enzimatică cu pepsină. Pentru aceasta se recomandă o soluție de pepsină 0,4% în HCl 0,01 M (pH 2) cu care se realizează o digestie timp de 15-120 minute la 37°C.

#### Demascarea antigenului prin căldură cu ajutorul microundelor

Metoda demascării antigenelor prin căldură a fost introdusă de *Shi și col.* încă din anul 1991, iar în 1997 *Morgan* a precizat rolul ionilor de calciu în demascarea antigenului.

Această metodă, relativ nouă și revoluționară, a permis evidențierea unor antigene presupuse distrușe prin tehnica de rutină a procesării tesuturilor. Pentru realizarea acestei metode, este necesară plasarea secțiunilor pe lamă cu ajutorul unor adevizi puternici (APES-aminopropilencetoxisilan sau Vectabond), pentru a evita desprinderea lor.

Condițiile în care se poate realiza pretratamentul la microunde pentru demascarea antigenelor au suscitat un real interes, fiind intens studiate și optimizate, dar mecanismul prin care acționează acest pretratament asupra antigenelor create cu formolul rămâne încă necunoscut. Aceste condiții reprezintă factorii importanți în demascarea antigenelor.

Cercetările efectuate de-a lungul timpului au relevat că:

- încălzirea secțiunilor la temperaturi crescute în apă distilată a determinat o semnificativă creștere a imunocolorării;
- rezultatele au fost corelate cu temperatura și durata pretratamentului;
- utilizarea diverselor tipuri de tamponare apoase nu a adus modificări semnificative decât dacă s-a modificat pH-ul acestor tamponare (ca urmare, constituenții chimici ai acestor tamponare nu par direct implicați în acest proces);
- tratarea secțiunilor cu tamponare în absența temperaturii crescute, chiar și timp îndelungat, nu a dus la rezultate satisfăcătoare.

În concluzie, cei mai importanți factori în demascarea antigenului la microunde sunt pH-ul soluțiilor utilizate, temperatura acestora și durata tratamentului și nu tipul de soluție.

La ora actuală, cele mai utilizate soluții pentru demascarea antigenului la microunde sunt tamponarele citrat (introdus de *Cattorelli* în 1993, pH 6) și EDTA (pH 8), ele luând locul soluțiilor cu săruri metalice utilizate inițial.

Prepararea soluției tampon citrat pH 6 pentru demascarea antigenului (*Bancroft*, 2002):

- Citrat de sodiu 29,4g;
- HCl 1M 29,4g;
- Apă distilată 10 l.

Ajustarea pH-ului la 6 cu HCl 1M.

Prepararea soluției stoc de tampon citrat (10x) pH 6 pentru demascarea antigenului:

- Acid citric monohidrat 21,014g;
  - Apă distilată 1000ml.
- Ajustarea pH-ului la 6 cu NaOH. Soluția se va dilua 1:10 (în momentul utilizării) în apă distilată.

Prepararea soluției tampon EDTA pH 8 pentru demascarea antigenelor nucleari:

- Acid etilendiaminetetraacetic 0,372g;
  - Apă distilată 1000ml.
- Ajustarea pH-ului la 8 cu NaOH și diluare 1:10 (în momentul utilizării) în apă distilată.

Protocolul de lucru pentru demascarea antigenului la microunde după *Shi (1991)* și *Jessup (1994)* este redat mai jos:

- Plasarea lamelor deparafinate într-un vas (Coplin sau Addis 9400) care conține soluția de demascare a antigenului (se recomandă ca, de fiecare dată, numărul lamelor să fie același, chiar dacă pentru aceasta este necesară introducerea unor lame fără secțiuni pe ele);
- Acoperirea vaselor cu capac și cu cling-film, pentru a evita evaporarea soluției de demascare;
- Plasarea vasului în mijlocul cuptorului cu microunde;
- Încălzirea secțiunilor la 750 W timp de 10-15 minute, acest timp fiind divizat în intervale de câte 5 sau 3 minute;
- După fiecare interval de timp se verifică nivelul soluției de demascare din vas și se completează pentru a evita uscarea secțiunilor tisulare;

1. Nu toate antigenele pot fi demascate prin pretratament la cald, unele fiind chiar distruse de acesta (ca de exemplu markerii neuroendocrini, așa cum arătau *Langlois și col.* în 1994);

2. Fierberea materialelor prost fixate duce la pierderea detaliilor nucleare;

3. Pentru a nu distruge antigenicitatea trebuie urmărit ca în timpul pretratământului și după acesta secțiunile să nu se usuce;

4. Există posibilitatea ca tesuturile fibroase și cele adipoase să se desprindă de pe lame. Acest inconvenient poate fi uneori remediabil prin creșterea timpului de uscare a adevizului pe lame, la o temperatură de 56°C sau prin scufundarea lamelor cu adeziv în formol salin 10%, timp de 1-2 minute și uscarea lor la aer înainte de întinderea secțiunilor. Această metodă crește adeziunea secțiunilor pe lame, probabil prin creșterea numărului de grupări aldihidice pe suprafața lamelor.

Demascarea combinată a antigenului cu ajutorul microundelor și a digestiei enzimatice

În 1994, *Sanzison și col.* au raportat că un pretratament la microunde în timp de 30 de secunde permite o mai bună identificare a lanțurilor ușoare în mielom comparativ cu utilizarea singulară a tripsinei. Ulterior, s-a demonstrat că metoda este de mare ajutor pentru identificarea lanțurilor ușoare în amiloidoza AL (pe biopsiile renale), în demonstrarea celulelor bazale în prostată (cu anticorpii monoclonali LP 34) și că ea duce la o creștere a calității reacției de identificare a citokeratinei 34 beta E12 (la care digestia enzimatică cu pronază urmată de demascarea la microunde în soluție EDTA pH 8 a permis o intensificare a produsului final de reacție).

Trebuie reținut că, în cazul utilizării metodelor combinate de demascare, trebuie reduși semnificativ timpurile de demascare și că se poate înlocui o enzimă cu o alta.

Protocolul de lucru pentru metoda combinată de demascare a antigenului poate fi următorul:

- Tratarea secțiunilor la microunde, după același protocol, prezentat anterior;
- Răcirea rapidă a secțiunilor aruncând tamponul cald;
- Spălare imediată în apă curentă;
- Plasarea secțiunilor în apă distilată preîncălzită, la 37°C;
- Tratarea secțiunilor cu soluția de tripsină la 37°C, timp de 20-30 secunde;
- Clătire în apă distilată.

Avantajele metodei combinate de demascare a antigenului

Metoda combinată de demascare a antigenului oferă două avantaje majore și anume:

1. Permite evidențierea cu mare ușurință a unor antigene;
2. Cu ajutorul ei se obține o creștere marcată a diluției anticorpului primar.

Răcirea secțiunilor timp de 15-20 minute la temperatura laboratorului;  
Clătirea secțiunilor în apă distilată;  
Clătirea secțiunilor în PBS.

Demascarea antigenului la oala sub presiune

În anul 1994, *Norton și col.* au arătat că înlocuirea cuptorului cu microunde cu oala sub presiune în tehnica de demascare a antigenului aduce o serie de avantaje. Deși metoda la microunde permite obținerea de rezultate reproducibile bune pentru foarte multe antigene, faptul că se pot procesa un număr limitat de lame o dată și că este necesară o atenție constantă crescută, pentru ca secțiunile să nu se usuce, face ca această metodă să dureze foarte mult timp. Folosirea unor containere de dimensiuni mai mari decât vasele Coplin utilizate de obicei, nu s-a dovedit mai avantajoasă.

În anul 1995, *Miller și col.* au comparat metoda la microunde cu cea la oala sub presiune pe secțiuni paralele, folosind anticorpi identici și au observat că, ocazional, timpul pretratământului la microunde deși era optimizat, nu reușea să pună în evidență antigenele de pe unele preparate. S-a considerat că acest lucru se datorează faptului că, la cuptorul cu microunde, se realizează, în timpul procesului, zone mai reci și zone mai fierbinți.

Metoda la oala sub presiune nu prezintă acest inconvenient și în plus necesită mai puțin timp. Și în cazul utilizării oalei sub presiune trebuie avută în vedere tratarea lamelor cu adezivi puternici înainte de întinderea secțiunilor.

Demascarea antigenului cu ajutorul autoclavului

Metoda demascării antigenului cu ajutorul autoclavului pare a fi mai puțin eficientă decât metodele la microunde sau la oala sub presiune (*Parsha și col.*, 1995). Această metodă are dezavantajul că necesită uneori un timp îndelungat pentru tratarea secțiunilor (peste 40 de minute), dar are avantajul de a fi mai puțin dăunătoare țesuturilor decât celelalte metode care folosesc căldura.

Avantajele pretratământului cu căldură

În condițiile în care pretratământul cu ajutorul căldurii este optimizat, el oferă o serie de avantaje dintre care cele mai importante sunt:

1. Recuperarea unor antigene considerate distruse ca urmare a fixării în formol și a includerii în parafină, chiar după o perioadă mare (de câteva săptămâni) de fixare în formol;
2. Posibilitatea creșterii diluției anticorpului primar, cu realizarea unei importante economii a acestuia;
3. Evidențierea lanțurilor grele ale imunoglobulinelor devine mult mai reproducibilă și mai sigură decât în cazul utilizării digestiei enzimatice.

Dezavantajele pretratământului cu căldură

Cu toate că metoda tratării termice a secțiunilor pentru realizarea demascării antigenului este considerată azi cea mai eficientă, ea are o serie de dezavantaje, dintre care unele pot fi evitate în anumite condiții. Enumerăm în continuare aceste dezavantaje și posibilitățile de evitare a lor:

### Dezavantajele metodei combinate de demascare a antigenului

Acestă metodă are, de asemenea, unele dezavantaje, care pot fi însă evitate, după ce se realizează o optimizare a timpilor de lucru.

1. Țesuturile pot fi distruse cu ușurință de o digestie enzimatică excesivă, ce urmează după un pretratament la microunde, dar alegerea unui timp optim pentru digestia enzimatică poate înălțura acest lucru;
2. Poate apare o distribuție alterată a imunocolorării pentru unele antigene.

### III.4. Soluții tampon și de diluție

#### Soluții tampon de spălare a secțiunilor

Aceste soluții sunt utilizate, pentru eliminarea excesului de reactivi sau complexe formate în urma fiecărei incubări. Cele mai folosite soluții tampon sunt soluția tampon Tris salin (Tris Buffered Saline; TBS) și soluția tampon fosfat salină (Phosphate Buffered Saline PBS).

Soluția de tampon TBS se folosește în imunohistochimie pentru reducerea mărcării nespecifice, datorită stabilității sale și proprietăților chimice. Tris în formă pură (hidroximetil aminometan) și sarea sa cristalină hidroclohidrică au capacități nule sau aproape nule de tamponare în soluții singulare. Amestecarea celor două componente produce însă o soluție tampon cu o capacitate de tamponare cuprinsă între valori ale pH-ului de 7,0 - 9,0. Valoarea pH-ului tuturor soluțiilor tampon variază în funcție de temperatură și concentrație. Pe măsură ce temperatura soluției scade, pH-ul crește cu o rată de aproximativ 0,03 unități /°C. Când sunt folosite metode foarte sensibile de detecție, o specificitate mai mare poate fi obținută prin creșterea concentrației sării și adăugării de detergent, minimalizând astfel potențialul unor legări nespecifice ale reactivilor. În practică, adăugarea de Tween 20 în concentrație fină de 20% poate fi folosită pentru a reduce legarea nespecifică a moleculelor de polimer în cazul amplificării mediate de polimer a semnalului.

Prezentăm mai jos substanțele necesare și modalitatea de preparare a soluției Tris stoc (10x) 0,5M cu pH 7,6:

- Tris hidroximetilaminometan bază 60,57g;
- Apă distilată 1000 ml;
- Azidă de sodiu (pentru conservare) concentrație finală 0,2%;
- HCl 1N (aproximativ 376ml) până se ajunge la pH de 7,6.

Se dizolvă toată cantitatea de Tris hidroximetilaminometan în 500 ml de apă distilată și se agită. Se aduce la pH cu HCl. Se adaugă restul de apă distilată și azida de sodiu.

Pentru folosire se diluează 1:10 cu apă distilată.

Soluția de tampon PBS este folosită chiar mai frecvent ca TBS (depinde de laborator), și este preferată în special pentru biopsiile de rinichi, piele sau conținând patogeni ca Aspergillus. PBS-reduce mai bine autofluorescența ca tamponul pe bază de Tris și este mai ieftin de preparat. Totuși poate produce o incidență crescută a mărcării nespecifice, poate erana anticorpilor primari și astfel.

reducere legarea specifică a epitopilor la anumiți anticorpi monoclonali (de exemplu CD30).

Rețeta soluției PBS pH 7,4 - 7,6:

- NaCl (0,12 M) 13,92 g;
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,01M) 3,12 g;
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,04M) 13,92 g;
- $\text{H}_2\text{O}$  distilată 2000 ml.

Dacă se utilizează substanțe anhidre se vor folosi următoarele cantități:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (anhidru 1,9mM) 0,23 g;
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (anhidru 8,1mM) 1,15 g;
- NaCl (154 mM) 9 g;
- $\text{H}_2\text{O}$  900 ml.

Se ajustează pH-ul la 7,4 cu NaOH 1M sau cu HCl 1M.

Se completează cu apă până la 1000 ml.

#### Sugestii pentru lucrul cu soluțiile tampon

- Soluțiile gata de lucru de TBS sunt stabile la 25°C pentru patru zile. Soluțiile stoc concentrate sunt stabile câteva săptămâni, în special dacă sunt păstrate la 2°C. Soluțiile tampon saline păstrate la temperaturi scăzute tind să formeze cristale datorită scăderii solubilității cu temperatura. Cristalele formate în soluțiile stoc se vor dizolva la încălzirea soluției la temperatura camerei.
- Nu amestecați tampon proaspăt preparat cu soluții vechi.
- Nu amestecați diferite tipuri de soluții tampon.
- Substanțele antimicrobiene precum cloramina din apa de chiuvetă pot anula proprietățile de tamponare ale soluțiilor tampon, în special TBS. Folosiți apă distilată, detoxizată sau de puritate industrială pentru prepararea soluțiilor tampon.

#### Soluții de blocare a legării nespecifice a anticorpilor

Deși afinitatea antigen-anticorp este foarte mare, este totuși posibil ca anticorpul primar să se lege nespecific și cu o afinitate mică de țesutul de detecție în afara antigenului specific. Această legare nespecifică poate apărea din mai multe motive: moleculele de aldehidă intacte rămase în țesut pot realiza punți metilenice cu anticorpul; structurile hidrofobe sau cu o polaritate mare pot "sechestra" anticorpul; sau în cazul anticorpilor policlonali, imunoglobulinele se pot lega și de antigene înrudite structural. Nu în ultimul rând, receptorii pentru fragmentele Fc pot adsorbi anticorpul pe suprafața țesutului.

Aceste potențiale neajunsuri pot fi prevenite prin tratarea speciemenelor cu soluții de proteine ce vor intra în competiție cu anticorpul pentru aceste situsuri nespecifice. Agenții de blocare frecvent folosiți sunt albumina serică bovină, cazeina (sau o soluție de lapte praf degresat), gelatină sau ser normal obținut de la specia de animal în care este dezvoltat anticorpul secundar. Aceste soluții proteice sunt folosite în concentrații variind între 1 și 10% în soluțiile tampon, iar incubarea probelor în aceste soluții cu rol de blocare se face pentru 10 minute sau mai mult la temperatura camerei. În unele laboratoare se adaugă și mici cantități de detergent (permeabilizează mai bine secțiunea prin scăderea tensiunii superficiale și

înghețării, și astfel să prelungească durata de viață de reacțiilor cu mult peste data de expirare menționată de producător în cazul menținerii la 4°C. De asemenea se va lucra cu precauție în cazul folosirii azidei de sodiu, cunoscută fiind toxicitatea acesteia. Nu în cele din urmă este posibil ca azida să inhibe activitatea fosfatazei alcaline sau peroxidazei, așadar adaosul acesteia nu este recomandat în cazul prezervării anticorpilor secundari marcați direct cu enzima de detecție.

### III.5. Surse și metode de blocare a semnalelor nespecifice de fond

Blocarea colorării nespecifice de fond este o problemă frecventă ce trebuie deci cunoscută și rezolvată în cazul tuturor reacțiilor imunohistochimice efectuate. Există trei aspecte care determină colorarea nespecifică de fond: legarea nespecifică a anticorpilor, prezența enzimelor endogene tisulare și semnalul datorat prezenței biotinei endogene.

#### Legarea nespecifică a anticorpilor

Legarea nespecifică reprezintă o problemă a anticorpilor policlonali, deoarece în antiser există o multitudine de anticorpi nedoriți. Această problemă poate fi redusă realizând o diluție optimă de lucru, dar, dacă este necesar, se poate precubina secțiunea tisulară cu ser normal de la aceeași specie de animal (pentru a bloca situsurile nedorite de legare), înaintea incubării cu anticorpul primar.

Un alt aspect al colorării nespecifice poate rezulta din faptul că anticorpii sunt molecule înalt încărcate electric și se pot lega nespecific de componentele tisulare care au o încărcătură reciprocă (ca de exemplu colagenul tisular). Aceste legături nespecifice determină reacții fals pozitive ale colagenului și a altor componente tisulare cu anticorpul utilizat, aceste reacții fiind suficiente de puternice pentru a acoperi colorația specifică. Precubarea cu ser normal poate reduce acest tip de legături nespecifice, deoarece, teoretic, proteinele din serul normal ocupă situsurile controversate din secțiunile tisulare, reducând sau excluzând atașarea nespecifică a anticorpului primar sau a celorlalți anticorpi adăugați subsecvent în timpul reacției imunohistochimice.

În practică este uzuală utilizarea serului normal al aceleiași specii ca puntea anticorpului (în metoda PAP) sau ca anticorpul secundar (în metodele conjugate și în metoda ABC), deoarece acest ser normal nu interferează niciodată și nici nu participă în reacțiile imunologice din cadrul procedurii de imunocolorare.

Un caz particular de legare nespecifică poate apărea în țesuturi care exprimă receptori pentru fragmentul Fc, așa cum se întâmplă în splină și timus. Aici, anticorpii primari de tip "moleculă întreagă" se pot atașa cu fragmentul Fc de acești receptori tisulari. Pentru a preîntâmpina acest fenomen se folosesc anticorpi primari de tipul F(ab)<sub>2</sub> la care lipsește fragmentul Fc. Mai mult, ca secundari se pot folosi în acest caz anticorpi anti-primari specifici pentru fragmentele F(ab)<sub>2</sub>.

blochează interacțiunile hidrofobe anticorp - țesut), de exemplu 0,1% Triton X-100.

Dacă țesutul de lucru este bogat în receptori pentru fragmentul Fc (de exemplu țesut limfatic), se poate opta pentru un anticorp primar în Forma Fab sau F(ab)<sub>2</sub> sau blocarea să se facă într-un ser policlonal conținând fragmente Fc.

#### Soluții pentru diluțiile de lucru ale anticorpilor

Multe laboratoare folosesc soluție tampon simplă (PBS sau TBS) pentru diluția anticorpilor de lucru. Suspensia proteică dintr-o soluție coloidală poate aglutina și precipita, scăzând concentrația reală disponibilă a anticorpului sau constituind o sursă de false semnale. Deși soluțiile tampon impiedică într-o anumită proporție aceste efecte, anticorpii reacționează optim într-un mediu cât mai apropiat cu al plasmelor sanguine, prin urmare un mic adaos de proteine este întotdeauna binevenit în a asigura și o presiune coloido-osmotică optimă. În acest scop, cele mai folosite soluții de diluție a anticorpilor sunt soluțiile de tampon (PBS sau TBS) cu adaos de 1% albumină bovină sau 1% albumină bovină și 0,05% Tween 20. Așa cum era așteptat și mai sus, detergentul ajută la o mai bună permeabilizare a secțiunilor.

Dacă în lucrul de rutină pe secțiuni de 4 μm, detergentul este opțional, el devine obligatoriu în lucrul cu secțiuni groase (2,5 μm sau mai mult) folosite atât de mult în cazul preparării speciimenelor pentru examinarea la microscopul confocal.

Secțiunile se incubază cu soluția de anticorp primar diluată corespunzător fie pentru 30-60 de minute la temperatura camerei, fie peste noapte la 4°C într-o cameră de incubare umedă pentru a preveni deshidratarea lamelor.

#### Soluții pentru diluția și prezervarea anticorpilor

După ce un anticorp este optimizat la o diluție optimă de lucru cu un anumit sistem de detecție, în special în cazul în care este foarte necesar în acel laborator, este bine să se conserve stocuri înghețate la -80°C. Orice proces, precum și cel de degradare a anticorpului sau a enzimelor atașate, este mult încetinit la această temperatură, fapt pentru care conservarea la temperaturi joase a devenit metoda ideală de conservare a anticorpilor. Anticorpul se poate îngheța direct în cantități mici în huburi separate sau se poate predilua într-o soluție de protecție. Metoda trebuie întâi optimizată pe o cantitate mică de anticorp înghețat și în cazul păstrării reactivității se poate hotărî înghețarea întregului stoc.

Se procedează după cum urmează:

1. Se prepară o soluție stoc de azidă de sodiu 1% (NaN<sub>3</sub>). Are rol de a inhiba creșterea microorganismelor.
2. Se prepară și se filtrează prin filtre de 20 μm o soluție de PBS cu 1% albumină bovină.
3. Lucrând la gheață, se prediluează anticorpul în soluția de mai sus la care se adaugă stoc de NaN<sub>3</sub> până la o concentrație de 0,02-0,05 NaN<sub>3</sub>.
4. Anticorpul astfel prediluat este gata de separat în cantități mici și de înghețat.

În practică este bine de știut că deși unele firme nu recomandă înghețarea anticorpilor, este posibil ca reactivitatea acestora să nu fie afectată de procesul

### Prezența enzimelor tisulare endogene

Prezența enzimelor tisulare endogene este cea de a doua cauză majoră, care este responsabilă de apariția colorației nespecifice. Ca urmare, blocarea enzimelor endogene are un rol important în evitarea colorării nespecifice de fond.

Aceste enzime au grade variate de susceptibilitate la denaturare și inactivare în timpul fixării. Astfel, unele enzime (peroxidaza) sunt conservate, atât în cazul secțiunilor la gheață, cât și în cazul celor la parafină, iar alte enzime (fosfatasa alcalină) sunt complet inactivate de fixarea de rutină și de procesul de închidere la parafină. Ca urmare, activitatea reziduală a acestor enzime endogene trebuie abolită în timpul imunocolorării, pentru a evita rezultatele fals pozitive, atunci când se utilizează în cursul imunoreacției aceeași enzimă sau una similară.

Activitate peroxidazică este intensă în unele celule normale și neoplazice, cum ar fi: eritrocitele, eozinofilele, neutrofilele și hepatocitele.

Este recomandat ca, atunci când se realizează un studiu imunohistochimic pe țesuturi bogate în celule sanguine (exemplu măduvă osoasă), blocarea peroxidazei să fie cuplată cu un substrat control (o secțiune tratată doar cu o mixtură de cromogen-hidrogen peroxid), pentru a vizualiza existența activității peroxidazei endogene. Se pot utiliza de altfel metode alternative (cum ar fi utilizarea metodei glucozoxidazei), pentru a evita posibilitatea confuziei cu orice activitate enzimatică endogenă.

Îndepărtarea acestei activități enzimatică este esențial să se realizeze înainte de adăugarea enzimei utilizată în procesul de colorare sau a complexelor PAP, pentru că altfel enzima utilizată în timpul imunocolorării este și ea inactivată de procesul de blocare, rezultatele fiind fals negative.

În vederea blocării peroxidazei endogene, s-au abordat mai multe metode. Metoda propusă de *Streifherk* se referă la incubarea secțiunilor cu un amestec de apă oxigenată și metanol înainte de colorarea imunohistochimică. Mai târziu, *Burns* a crescut concentrația apei oxigenate până la 10%, obținând ca rezultat adițional „albirea” hematinei. *Weir* și colaboratorii au inhibat activitatea peroxidazei endogene și au obținut o bună conservare a antigenicității imunoglobulinelor prin incubarea secțiunilor cu acid clorhidric 0,075% în etanol, timp de 15 minute, la temperatura camerei, înainte de imunocolorare.

În cele mai multe cazuri, s-au obținut rezultate satisfăcătoare prin incubarea secțiunilor timp de 15 minute într-un amestec de metanol cu apă oxigenată, chiar dacă unii autori consideră că acest amestec este prea agresiv și poate determina unele denaturări ale antigenelor, în special ale celor de suprafață celulară. Totuși, procedeele de incubare în metanol și apă oxigenată este larg folosit în cazul secțiunilor înghețate.

*Strauss* a recomandat în acest sens utilizarea fenilhidrazinei care pare să conserve antigenicitatea multor molecule, dar care are dezavantajul că nu inhibă complet peroxidaza din eozinofile. O combinație de fenilhidrazină,  $H_2O_2$  proaspăt produs de către o mixtură glucozoxidază-glucoză și azidă de sodiu, inhibă activitatea peroxidazei endogene cu leziuni minime ale suprafețelor antigenice ale limfocitelor. De asemenea, utilizarea amestecului de  $H_2O_2$  0,3% în 0,1% azidă de sodiu este considerată o tehnică simplă și eficientă.

Mult mai recent, s-a demonstrat că ciclopropanhidratul determină inhibarea peroxidazei endogene, fără a avea efecte adverse asupra antigenicității.

*Heyderman* și *Neville* au introdus o metodă prin care secțiunile sunt incubate mai întâi cu  $H_2O_2$  7,5% în apă distilată (pentru inhibarea hematinei acide), iar apoi sunt introduse în acid periodic 2,28% în apă distilată (pentru blocarea peroxidazei endogene). Deoarece grupările aldehidice, formate în cursul tratamentului cu acid periodic, pot conduce la o colorare nespecifică, secțiunile trebuie incubate cu borohidrid de sodiu 0,2% în apă distilată, înainte de a adăuga anticorpii. Această metodă poate determina însă denaturarea determinantilor de tip carbohidrat (ca în cazul antigenelor sanguine).

Azida de sodiu, o substanță intens folosită la preservarea anticorpilor datorită efectului său antibacterian, este de asemenea un inhibitor al peroxidazei. Trebuie ținut cont de acest fapt atunci când se realizează divizarea și înghețarea pe termen lung a un anticorp secundar direct marcat cu peroxidază.

Un alt sistem de detecție intens folosit, mai ales în cadrul metodelor de detecție chimică multiplă este colorarea pe bază de fosfatază alcalină. Ca și pentru peroxidază, există și forme endogene de fosfatază alcalină ce pot interfera cu detecția chimică a semnalului. În acest sens, fosfataza alcalină endogenă din țesutul osos, rinichi, ficat și leucocite poate fi inhibată prin adăugarea de soluție levamisol 1-5 mM. Fosfataza alcalină intestinală se dovedește rezistentă la soluția de levamisol, în acest caz o fierbere a secțiunilor de lucru fiind de obicei suficientă. Metodele de demascare antigenică bazate pe fierbere distrug fosfataza alcalină endogenă iar azida de sodiu nu o inactivază, fiind deci compatibilă cu prezervarea anticorpilor secundari marcați direct cu fosfataza alcalină.

### Prezența biotinei endogene

O colorație fals pozitivă poate fi dată și de existența unei intense activități a biotinei endogene în special în țesuturi ca: epitelii tubular renal, hepatocitele, oncocitele etc. Această problemă apare atunci când se utilizează sisteme de detecție bazate pe avidină-biotină și nu este întâlnită în cazul utilizării sistemelor de tip PAP sau APAAP. Acest lucru se datorează faptului că avidina din sisteme se leagă de biotina tisulară sau de moleculele biotin-like din țesut. Această colorație fals pozitivă apare aproape întotdeauna în citoplasmă, foarte rar în nucleu și niciodată în membrana celulelor.

Țesutul înghețat și demascarea antigenică prin fierbere în EDTA pH 9 sunt cazuri particulare în care se amplifică detecția biotinei endogene.

Pentru a înlătura această colorație nespecifică se va realiza o blocare avidină-biotină înaintea aplicării anticorpului primar. Acest lucru se va face prin adăugarea de avidină pe secțiuni (albuș de ou), ea legând biotina și moleculele biotin-like din țesut, după care se va adăuga biotină liberă. Biotina adăugată nu va lega avidina conjugată utilizată în pașii următori ai reacției deoarece fiecare moleculă de biotină are doar un singur situs de legare.

Azi se consideră că cei mai buni agenți de blocare avidină-biotină sunt reprezentanți de preparatele comerciale existente pe piață ce constau în soluții optimizate gata de lucru de biotină și avidină sau streptavidină.

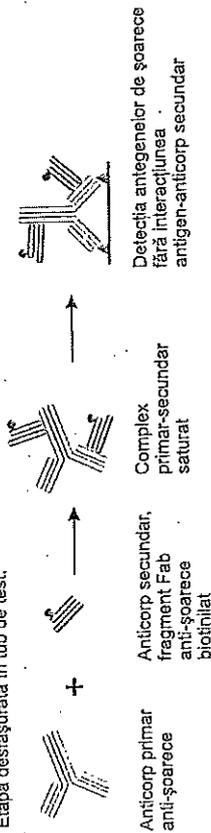
Procedeele de lucru pentru un astfel de kit este, după cum urmează:

1. După ce s-a realizat blocarea în ser heterolog sau lapte, se face o spălare rapidă în PBS și apoi se incubează secțiunile cu avidină pentru 15-30 de minute la temperatura camerei.

- Spălare rapidă în PBS.
- Incubare în biotină pentru alte 15-30 de minute sau incubare cu soluția de anticorp primar la care se adaugă 4 picături de biotină la 1ml volum soluție.

**Detecția antigenelor cu anticorpi primari de aceeași specie cu epitopul**  
 Dacă vorbim despre anticorpii specifici pentru diferite specii de animale, trebuie amintit și faptul că există situații când anticorpul necesar este disponibil numai în forma dezvoltată în aceeași specie cu țesutul animal de examinat. De exemplu, unul dintre cei mai folosiți anticorpi pentru secvența A $\beta$  (peptidul amiloid  $\beta$  ce se acumulează în creier în boala Alzheimer) recunoaște secvența de aminoacizi 17-24 a acestui peptid, secvență care este comună la om și rozătoare (anticorpul 4G8). Dacă se pune problema realizării unui experiment pe țesut de șoarece, atunci avem ca alternative utilizarea unui anticorp șoarece anti-șoarece separat într-un tub de test a anticorpului primar (anti-șoarece) cu fragmente Fab anti-șoarece biotinilate, realizându-se o saturare a fragmentelor Fab cu anticorpul primar. În final se adaugă acest compus mixt peste țesutul de analizat, anticorpul secundar nemaiputând reacționa încrucișat cu antigenele de șoarece.

Etapă desfășurată în tub de test.



#### Sistemul ARK de lucru cu anticorpi primari dezvoltată în aceeași specie cu țesutul

**Blocarea autofluorescenței dată de lipofuscina**  
 Lipofuscina este un pigment "de uzură" ce apare în special în celulele cu o viață lungă, cum este cazul miocardului, ficatului și neuronilor și mai ales la persoanele în vârstă. Pigmentul de culoare galben-brună este o încărcare a lizozomilor cu diferite elemente celulare necatabolizate, iar aceste acumulări se mai numesc și corpi reziduali. Specific, pigmentul este stabil și prezent în țesuturi după procesarea în parafină. Autofluorescența dată de acumulările de lipofuscina în sistemul lizosomal poate interfera cu aproape orice probă fluorescentă, iar pentru prevenirea acestui inconvenient se utilizează tehnica histologică Negru Sudan de acoperire a lipofuscinei cu un pigment negru care îi va bloca și autofluorescența. Se

folosește o soluție saturată de Negru Sudan în 70% alcool bine amestecată și apoi filtrată de două ori printr-o hârtie de filtru. Soluția este stabilă pentru 6 luni.

#### Protocol de lucru:

- Deparafinare 3x5 minute în băi de xilen.
  - Rehidratare până la alcool 70% (100%, 90%, 70%).
  - Incubarea lamelor în Negru Sudan peste noapte la temperatura camerei.
  - Spălare și diferențiere în alcool 70% până ce culoarea de fond a secțiunii este un gri palid.
  - Spălare abundentă în apă de robinet.
  - Acoperire în soluție de glicerol.
- În general secvența imunohistochimică se efectuează după mascarea lipofuscinei. Demascarea antigenică se face înainte de blocarea lipofuscinei.

#### IV. DETECȚIA SEMNALULUI ÎN IMUNOHISTOCHEMIE

Sistemele fundamentale de lucru trebuie să fie bine cunoscute, pentru a putea obține în final preparate imunocolorate interpretabile.

În imunohistochimie se utilizează o serie de metode lucru, de la foarte simple la complicate. Pentru alegerea sistemului de lucru, trebuie să avem în vedere mai multe aspecte, cum ar fi: sensibilitatea reactivilor, modalitatea de procesare a țesutului, durata procedurii imunohistochemice și prețul de cost pentru fiecare sistem de lucru.

Moleculele de anticorpi nu se pot vizualiza cu ajutorul microscopiei optice sau a microscopului electronic fără ca ele să fie colorate anterior sau marcate printr-o metodă care să facă posibilă evidențierea lor. *Principiul* sistemelor de detecție este reprezentat de atașarea unui colorant sau a unui marcător la nivelul anticorpului primar sau secundar pentru a face posibilă vizualizarea legăturii antigen-anticorp în secțiunile tisulare. În acest scop, s-au utilizat componente fluorescente sau enzime active ce se pot vizualiza ca urmare a proprietății lor de a induce formarea unui produs de reacție colorat, pentru un sistem substrat potrivit.

Această metodă este foarte bună în cazul microscopiei optice și ea poate fi adaptată pentru microscopia electronică, dacă produsele sunt modificate să fie electronodense printr-un tratament adecvat. De asemenea, se pot folosi o serie de coloranți vizibili direct în microscopia electronică, cum ar fi: aurul, feritina sau particulele virale. Un scop important al diferitelor sisteme de detecție este amplificarea sensibilității (prin amplificarea semnalului obținut).

#### IV.1. Detecția enzimatică

Primele imunocolorări utilizând enzime (peroxidaza) au fost realizate de către Nakane și Pierce în 1966 și apoi de către *Avrameas* în anul 1969, ei observând că sistemele enzimatică pot înlocui fluoresceina pentru marcarea anticorpilor. Dificultatea în realizarea sistemului enzimatic constă în capacitatea de

a lega o moleculă relativ mare, cum este molecula enzimatică, de o altă moleculă cu dimensiuni mari, cum este imunoglobulina, fără ca vreuna dintre molecule să-și piardă funcțiile. Astfel, anticorpul marcat trebuie să fie capabil în continuare să lege antigenul, iar enzima atașată să rămână capabilă să catalizeze reacțiile oxidative. Această tehnică directă de marcare a fost cea care a precedat numeroase alte metode care au permis acțiunii enzimatică să identifice localizarea antigenului prin intermediul anticorpului. Astfel, s-au dezvoltat metodele indirecte care au permis amplificarea semnabului obținut și care, prin folosirea unui anticorp secundar marcat, permit o mare libertate în selectarea antigenelor ce se vor studia și a anticorpilor cu care acestea se vor studia. Ca urmare această tehnică este mult mai larg aplicată decât tehnica directă.

Prin folosirea mai multor anticorpi secundari, fiecare având câteva molecule enzimatică atașate, pentru a se lega de anticorpul primar, se poate crește cantitatea de enzimă de la locul interacțiunii antigen-anticorp primar. Acest lucru va face ca reacția să fie mai ușor de observat și va permite în plus vizualizarea reacțiilor slabe, crescând deci sensibilitatea metodei. Această metodă permite creșterea diluției anticorpului primar, ca urmare este mai ieftină, dar și mai specifică, deoarece se realizează o scădere a concentrației anticorpilor nespecifici din serul primar.

Enzimele cele mai utilizate în cadrul reacțiilor imunohistochimice sunt peroxidaza și fosfataza alcalină, alături de care se pot folosi uneori și alte sisteme enzimatică minore, cum ar fi glucozoxidaza și  $\beta$ -galactozidaza.

**Peroxidaza (HRP-horseradish peroxidase)** este la ora actuală cea mai utilizată enzimă, deoarece ea se poate extrage cu mare ușurință din rădăcina de brean.

Așa cum am arătat anterior, trebuie avut în vedere faptul că este obligatorie etapa de inhibare a peroxidazei endogene, în special în cazurile în care țesuturile conțin cantități crescute de peroxidază endogenă, pentru a evita colorația nespecifică. Bineînțeles că există și alternativa utilizării celorlalte tipuri de sisteme enzimatică enumerate.

Principalele caracteristici ale peroxidazei sunt următoarele:

1. Are o greutate moleculară de 40 kDa și o grupare hem ce conține fier;
2. Situsul său activ se colorează în brun în cursul reacției;
3. Oxidează nitrații și polifenoli;
4. Cianurii și azidele sunt inhibitori ai peroxidazei;
5. Se poate atașa covalent sau non-covalent la alte proteine, ca urmare se poate conjuga cu streptavidina (fiind utilizată în tehnicile LAB și LSAB);
6. Posibilitățile sale de legare au condus la tehnici ce constau din doi anticorpi și trei molecule de enzimă (peroxidază-antiperoxidază).

Substratul care se poate utiliza în cazul peroxidazei este peroxidul de hidrogen, însă excesul de substrat poate inhiba activitatea enzimatică. Peroxidaza având funcție oxidativă, în conjuncție cu sursa de oxigen, va transfera electroni unei molecule ce se va oxida. Inițial enzima și substratul formează un complex, care reacționează ulterior cu un donor de electroni (cromogenul incolor). Cromogenul utilizat în cazul peroxidazei este DAB (3-3' diaminobenzidină

tetrahidroclorid) introdusă de Sternberg în 1979. Cromogenul realizează un complex secundar cu complexul format anterior. Complexul secundar disociază în enzima inițială și o moleculă de apă. Peroxidaza eliberată poate participa la o altă reacție cu substratul și cromogenul, producând nu numai schimbarea culorii cromogenului (care din incolor devine brun), dar și precipitarea acestuia sub forma unui precipitat insolubil oxidat. Este evident că în absența donatorului de electroni reacția va fi imposibilă. Se cunosc mai multe substanțe donoare de electroni care devin în finalul reacției produși colorați, motiv pentru care au fost denumiți cromogeni.

Oxidarea DAB realizează inițial un precipitat care apoi formează legături covalente cu țesutul, devenind astfel insolubil în alcool și alți solvenți organici, și ca urmare secțiunile vor putea fi deshidratate și clarificate în continuare, fără a exista riscul pierderii precipitatului (Figura XV.8). Deoarece are potențial carcinogen (deși scăzut), trebuie preparată în momentul utilizării sub hotă, utilizând mănuși, iar soluția se va neutraliza, după folosire, cu hipoclorit pentru a evita poluarea. Oxidarea DAB determină polimerizare, astfel apare proprietatea sa de a reacționa cu tetraoxidul de osmiu și de a forma un precipitat electronodens, ce poate fi vizualizat în microscopia electronică. Unii specialiști au propus, chiar pentru microscopia optică, osmificarea produsului final de reacție al DAB pentru a intensifica imunocolorarea, dar acest lucru are dezavantajul intensificării colorației nespecifice de fond. Un efect similar al intensificării colorării se poate obține însă printr-un posttratament cu săruri (clorură) de nichel sau cobalt, care produc un contrast foarte bun. În acest caz culoarea precipitanului se modifică din brun în albastru până la negru, fiind de mare ajutor contrastarea cu verde de metil (metil green) care amplifică precipitanul și înlătură confuziunile ce le poate crea contracolorarea obișnuită cu hematoxilină Mayer.

AEC (3 amino-9 etilcarbazon) formează după oxidare un produs final de culoare roz-roșu, care este indicat a fi utilizat atunci când pe secțiunile studiate există pigmenți endogeni de culoare galben-brună (melanină, hemosiderină, lipofuscină) (Figura XV.9). De asemenea, AEC se utilizează în cadrul dublelor imunoreacții în aociere cu DAB, pentru a pune în evidență antigene diferite.

Inconvenientul acestui cromogen este reprezentat de faptul că el este solubil în alcool și solvenți organici și, ca urmare, secțiunile vizualizate cu AEC nu se vor putea trata ulterior cu soluții alcoolice (ca de exemplu cu hematoxilină Harris care este alcoolică sau cu alcool pentru deshidratare) și nu se vor putea monta decât în medii apoase (glicerină tamponată cu fosfat, glicerol 80%) sau cu produse comerciale de tipul Cristal Mount (Biomedica) sau İmsol (Biogenex). Mediile de montare apoase conțin și ele mici cantități de solvenți organici care pot duce la difuziunea sau chiar la pierderea culorii obținute. După adăugarea medului de montare, acesta este acoperit cu un material plastic și lamele se introduc la cald la cuport. Materialul plastic se poate însă deteriora cu ușurință, astfel că, ulterior, secțiunile vor fi acoperite utilizând un mediu organic de montare de tipul Permound, care face ca secțiunile să se poată păstra în stare bună timp îndelungat. Totuși, rezoluția acestor preparate nu este la fel de bună ca în cazul în care se realizează deshidratarea în alcool și clarificarea în xilen.

AEC este susceptibil la oxidare după montare, din acest motiv preparatele se decolorează relativ rapid după expunerea repetată la lumină (de aceea, se recomandă ca secțiunile colorate cu AEC să se păstreze la întuneric).

- 4 cloro-1 naftolul este un alt cromogen ce se poate folosi în combinație cu peroxidaza. El precipită sub forma unui produs final de reacție de culoare albastră. Are aceleași inconveniente ca AEC, fiind solubil în alcool și în alți solvenți organici, iar, spre deosebire de DAB, are tendința de a difuza de la locul de precipitare.

Fosfatiza alcalină este enzima cel mai frecvent utilizată în locul peroxidazei, în special în cazul țesuturilor care conțin o cantitate crescută de peroxidază endogenă. Această enzimă a fost introdusă sub forma imunocomplexelor (APAAP-fosfatază alcalină antifosfatază alcalină). Aceste metode au fost studiate inițial de *Cordell* (1984), după care enzima a fost utilizată și în cadrul metodei ABC.

Fosfatiza alcalină hidrolizează esterii naftol fosfat într-un compus fenolic sau fosfatidic, după care fenolii se cuplează cu sărurile incolore de diazoniu, realizând un produs final de reacție colorat, de tip azoic. Activitatea sa presupune prezența ionilor de Ca, Mg și Mn.

Fosfatiza alcalină este utilizată mai frecvent decât peroxidaza, pentru că ea poate crea mai multe molecule colorate per moleculă de enzimă, realizând o sensibilitate mai mare. Fosfatiza alcalină poate reacționa cu mai multe tipuri de substraturi fiecare tip de precipitat rezultat având altă culoare. Astfel, utilizarea ca și cromogen a 5 bromo - 4 cloro - 3 indolil fosfatului (BCIP) și a nitrobluetrazolului (NBT) determină formarea unui precipitat permanent de culoare albastră (Figura XV.10), în timp ce folosirea fuchsinei (New Fuchsin) determină un produs final de reacție de culoare roșie, insolubil în solvenți organici. De asemenea, se poate utiliza drept cromogen naftol AS-MX fosfatul fie sub formă de substanță acidă, fie ca sare sodică, Fast Red TR sau Fast Blue BB, ce dau un produs de reacție final colorat roșu și respectiv albastru. Fast Red TR este de preferință utilizat pe frotiuri, dar ambii dau produși finali solubili în alcool și alți solvenți organici, necesitând montarea în medii apoase.

Fosfatiza alcalină are marile avantaje că nu interferează cu peroxidaza endogenă, ca urmare ea este recomandată în special pe preparatele din sânge și măduvă hematogenă care au un conținut crescut de peroxidază endogenă. Ea este însă prezentă în diverse țesuturi ca epitelul intestinal, epitelul tubular renal, în ficat și în os, dar activitatea sa poate fi inhibată cu ajutorul levamisolului. Totuși, nu se recomandă utilizarea acestui tip de enzimă pe secțiuni realizate de la nivelul intestinului sau a placentei, deoarece levamisolul nu este un inhibitor eficient al enzimei de la acest nivel. Fosfatiza alcalină intestinală poate fi blocată cu acid acetic 20%, apă oxigenată 0,3% sau acid periodic 2,5%, dar nici unul dintre acești inhibitori nu pare a fi suficient de eficient, tratamentul cu acid putând de asemenea altera unele antigene.

Prezentăm mai jos procedurile recomandate pentru utilizarea peroxidazei și a fosfatizei alcaline:

### Peroxidaza

- prepararea soluției de DAB stoc:  
Se dizolvă 200 mg DAB pulbere cu 10 ml PBS și 4 ml HCl 1N, apoi se aduce la un volum final de 40 ml cu PBS. Se filtrează soluția obținută și se păstrează la congelator (-20°C) în flacoane a câte 2 ml fiecare. Valabilitatea soluției în aceste condiții este de aproximativ 6 luni.
- prepararea soluției DAB pentru dezvoltare:  
Se decongelează un flacon de 2 ml DAB care se adaugă peste 88 ml PBS și 750 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (preparată în momentul folosirii). Se incubează secțiunile cu această soluție timp de 5-10 minute.

- prepararea soluției AEC [după T. Kernacs și col., 1999]:  
Se amestecă 2,5 ml de AEC 1%, dizolvat în dimetilformamidă, cu 90 ml de tampon acetat 0,1M și pH 4,6. Se adaugă 100 μl de peroxid de hidrogen 3% înainte de utilizarea soluției. Se incubează preparatele cu această soluție timp de 5-15 minute, la temperatura camerei, până se obține un produs de culoare roșu-brun.

### Prepararea soluției de tampon acetat 0,1 M pH 4,6:

Soluții stoc necesare:

- A. Soluție acetat de sodiu 0,1 M  
- CH<sub>3</sub>COONa 8,2 g;  
- Apă distilată până la 1000 ml.
  - B. Soluție acid acetic 0,1 M  
- 57 ml acid acetic;  
- Apă distilată până la 1000 ml.
- Pentru obținerea unei soluții de tampon acetat pH 4,6 se amestecă 98 ml soluție acetat de sodiu (soluția A) cu 102 ml soluție acid acetic 0,1 M (soluția B).

### Fosfatiza alcalină

- prepararea soluției Fast red TR:  
Se dizolvă 4 mg naftol AS-MX fosfat în 0,2 ml dimetil formamidă, se adaugă 9,8 ml tampon Tris pH 8,2 și 2,4 mg levamisol. Imediat înainte de utilizare se dizolvă 10 mg sare Fast red TR și apoi se filtrează soluția. Urmează incubarea secțiunilor cu această soluție, timp de 10-20 minute. Montarea se va face în mediu apos.

### Prepararea soluției new fuchsin:

#### Soluția 1

- 18 ml de 2-amino 2-metil 1,3-propanediol;
- 50 ml de tampon Tris-HCl pH 9,7;
- 600 mg clorură de sodiu;
- 28 mg levamisol.

#### Soluția 2

- 35 mg naftol AS-BI fosfat;
- 0,42 ml dimetil formamidă;

#### Soluția 3

- 0,14 ml new fuchsin (5g în 100 ml HCl 2N);
- 0,35 ml nitril de sodiu (40 mg în 1 ml de apă distilată).

Se amestecă new fuchsina cu soluția proaspăt preparată de nitrît de sodiu și se agită timp de 60 secunde. Se amestecă soluția 1 cu soluția 2 și apoi se adaugă soluția 3. Se ajustază pH-ul la 8,7 prin adăugarea de HCl. Se amestecă bine, se filtrează și se incubează secțiunile timp de 20 minute.

**Glucozoxidaza** este o enzimă care are avantajul că nu prezintă activitate endogenă la mamifere și deci nu pune probleme de colorare nespecifică. Cromogenii utilizați în combinație cu această enzimă sunt tetrazolium și tetranitroblue tetrazolium, cu care determină apariția unor produși finali de reacție insolubili de culoare albastră și respectiv neagră.

**Beta galactozidaza** este o enzimă extrasă din *E. Coli* ce se folosește în cadrul reacțiilor indirecte în doi timpi, în care enzima este conjugată cu anticorpii secundar. Această enzimă este activă la un pH (pH=7,0) mai mare față de enzima endogenă tisulară, care este activă la un pH=5,5, ceea ce crează avantajul eliminării inhibării prealabile a acesteia.

Substratul cromogen specific al acestei enzime este 5 bromo - 4 cloro - 3 indoxil-beta galactozidaza (X-Gal), a cărui hidroliză este urmată de formarea a doi compuși de culoare indigo, cu grup alcoolic și respectiv aldehidic, aceștia fiind oxidați ulterior în prezența fierului și a ferocianurii de potasiu, rezultând un grup cromogen, care precipită sub forma unui produs de culoare albastru-verzuie (Figura XV.11).

În funcție de necesități, în special dacă se vizează utilizarea secțiunilor pentru metode automate de analiză imagistică, este indicată o comparație și o alegere a culorii optime de dezvoltare a semnalului.

#### IV.2 Detecția fluorescentă

Microscopia în imunofluorescență poate fi utilizată pentru a detecta antigene și prezența unor microorganismе în multe țesuturi sau preparate celulare (inclusiv pe preparate la gheață și pe preparate anterior fixate). Țesuturile pot proveni din biopsii sau de la necropsii, iar celulele pot fi celule exfoliate, celule din aspirate, din culturi celulare sau din sânge.

Cu unele excepții, tehnicile de imunofluorescență se aplică pe țesuturi și preparate celulare la gheață, care au avantajul că înlătură legăturile încrucișate determinate de fixatori. În acest sens, congelarea trebuie realizată rapid la temperaturi foarte scăzute, pentru a preveni formarea cristalelor de gheață care pot altera morfologia structurilor ce urmează a fi studiate. Congelarea poate fi precedată de imersia probei într-o baie de acetona, alcool sau izopentana (foarte reci).

Pentru unele țesuturi se preferă montarea într-un mediu de secționare sau în gelatină înainte de congelare.

Pentru a putea fi transportate în condiții optime la laboratoare (astfel încât cele mai multe antigene să fie conservate), se poate utiliza un mediu de transport. Cel mai utilizat mediu este cel propus de *Michel*, acesta fiind un mediu cu o concentrație crescută de sulfat de amoniu. Într-un astfel de mediu, fragmentele

tisulare provenite de la nivelul pielii sau rinichiului (în vederea identificării imunoglobulinelor sau a complementului) pot fi păstrate câteva săptămâni, în timp ce țesutul limfoid (recolat în vederea fenotipării) își poate pierde determinanții antigenici în doar câteva zile.

Probele congelate se păstrează cel mai bine la  $-70^{\circ}\text{C}$ , cele mai multe antigene fiind stabile câteva luni la această temperatură.

Secționarea țesuturilor se va face la criostat la o temperatură de  $-20^{\circ}\text{C}$ , ganglionii putând fi secționați și la temperaturi mai mari, în timp ce prezența țesutului adipos în probe impune secționarea la temperaturi mai scăzute.

Grosimea optimă a secțiunilor este cuprinsă între 4-6 $\mu$ , secțiunile mai groase mascând detaliile histologice și determinând o colorație nespecifică de fond prea intensă.

Înainte de colorare este necesar ca secțiunile să fie uscate la aer timp de 15-30 de minute pentru a preveni detașarea de pe lame. În același scop se poate adăuga un adeziv pe lame anterior atașării secțiunilor.

Colorarea în imunofluorescență constă în legarea unui fluorocrom la antigenul pe care-l studiem în țesut prin intermediul unei reacții specifice antigen-anticorp.

Un fluorocrom este o moleculă capabilă să absoarbă energie luminoasă de anumită lungime de undă și să re-emită o parte din acea energie sub formă de lumină cu o altă lungime de undă (la fel de specifică și totdeauna mai înaltă ca cea absorbită).

La nivel atomic procedeul se explică prin trecerea unui electron din învelișul extern al cromoforului pe un nivel energetic superior consecutiv energiei absorbite (fenomen numit și excitație), și apoi datorită instabilității aceste configurații, electronul coboară pe nivelul energetic inițial emițând o cantitate de fotoni. O parte din energie se pierde în acest proces și deci frecvența cuantei emise este întotdeauna mai mică decât frecvența cuantei absorbite (sau lungimea de undă emisă este întotdeauna mai mare ca lungimea de undă absorbită). În afară de proprietățile intrinseci ale fluoroforului (grupul său funcțional), compoziția chimică a mediului de lucru este de asemenea un element important pentru stabilitatea fenomenului de fluorescență. Un microscop capabil de vizualizarea probelor în lumină fluorescentă are în esență trei elemente în plus față de un microscop clasic: în primul rând lumina albă a sursei de lumină (se folosesc surse speciale și mult mai puternice ca cele uzuale) este filtrată cu ajutorul unui filtru denumit „*filtru de excitație*”. Aceasta este lungimea de undă pe care cromoforul o poate absorbi. Fascicolul de lumină emis de proba fluorescentă este colectat prin reflexie de pe lamă și este separat de fascicolul incident cu ajutorul unei „*oglinzi dielectrice*”. Din acest fascicul reflectat, lungimea de undă emisă de probă este separată cu ajutorul unui la doilea filtru (deci numit „*filtru de emisie*”) și apoi trimisă către observator sau cameră fotografică.

Diferite molecule fluorescente pot fi atașate de structuri nefluorescente ca anticorpi secundari sau streptavidină. Mai folosite sunt fluoresceina izotiocianat (excitație la 494 nm și emisie la 525 nm), Texas Red (excitație la 589 și emisie la 615 nm), proteina fluorescentă în spectru verde (GFP, absorbție la 395 nm și emisie la 475 nm), luciferina, DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol); absorbție la 358 nm și emisie la 461 nm) sau cromoforul Hoechst (absorbție 350 nm și emisie 461 nm).

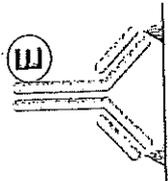
## V. TEHNICI DE LUCRU

### V.1. Detecția unui singur antigen

Tehnicile imunohistochimice de bază detectează prezența unui singur antigen, și sunt și astăzi cele mai folosite metode în practica de diagnosticare medicală, pentru claritatea, ușurința de interpretare și stabilitatea în timp a preparatelor. Chiar și în acest caz, tehnicile variază de la proceduri simple de detecție directă până la protocoale complexe de amplificare a unui semnal slab imposibil de vizualizat cu alte tehnici.

#### Metoda directă

Această metodă este cea mai veche și cea mai simplă, ea fiind foarte larg utilizată. Metoda constă în marcarea (enzimatică sau cu o substanță fluorescentă) a unui anticorp (anticorpul primar specific) și atașarea acestui conjugat direct pe secțiunile tisulare, ceea ce duce la legarea anticorpului marcat la antigenul tisular (Figura XV.14). Secvența reacției continuă cu vizualizarea acestei legături cu ajutorul cromogenului sau a microscopului cu fluorescență.



*Metoda directă - Marcatorul este atașat direct anticorpului ce are specificitate pentru antigenul studiat*

Pentru prepararea unui conjugat marcat trebuie atașate un număr maxim de molecule de marcator pentru fiecare moleculă de anticorp. O colorare de 100% a moleculelor de anticorpi ar fi optimă, dar fără ca vreunul să fie inactivat imunologic de procesul de marcarea. De asemenea, procesul de marcarea nu trebuie să inactiveze marcatorul, cum ar fi situsul activ al enzimei peroxidază sau al fluorocromului. Este de asemenea important ca reactivul marcat final să nu conțină molecule libere de marcator, deoarece acestea pot să formeze legături nespecifice cu secțiunile tisulare.

Încă din 1980 s-au lansat pe piață o serie de marcatori ca: peroxidază, glucozoxidază sau fosfataza alcalină.

Exemplu de protocol pentru marcarea directă (secțiuni atașate pe lamă):

1. Deparafinare 3x5 minute în băi de xilen.
2. Rehidratare prin trecere consecutivă câte 5 minute în etanol de concentrație descrescândă (100%, 90%, 70% și respectiv 50%).
3. Spălare 5 minute în apă distilată.
4. Efectuarea, dacă este cazul, a demascării antigenice.
5. Spălare 10 minute în apă de robinet.
6. Spălare 5 minute în apă distilată.

DAPI și Hoechst sunt deosebit de valoroși ca markeri nucleari, având afinitate pentru molecula de ADN.

Dintre markerii curent folosiți, cei mai intenși și mai stabili sunt considerați cromofonii Alexa Fluor dezvoltati de compania Invitrogen, fiind disponibili în lungimi de undă acoperind spectrul de la 350 nm (ultraviolet) la 750 nm (roșu îndepărtat). Acești compuși sunt disponibili gata conjugați pe anticorpi secundari sau streptavidină, fie în kituri de etichetare a oricărui anticorp (tehnologia Zenon, Invitrogen).

### IV.3. Marcarea cu particule de aur

Alături de marcatorii enzimatici, se pot utiliza, în conjuncție cu microscopia electronică, o serie de marcatori metalici. În acest sens, s-au dezvoltat metodele cu aur coloidal, particulele de aur fiind cu ușurință detectate în microscopia electronică, în timp ce ele sunt vizualizate cu greutate în microscopia optică.

Utilizarea coloizilor ca markeri imunocitochimici în microscopia electronică a fost introdusă de către *Faulk* și *Taylor* în 1971, ei folosind imunocoloizii pentru a localiza antigenele de pe suprafața celulelor.

O mare varietate de proteine, inclusiv anticorpi, pot fi absorbite pe aur coloidal. Dimensiunile particulelor de aur utilizate pot fi variabile (diametrul între 10-150 nm), fiind astfel posibilă identificarea localizării mai multor antigene pe aceeași secțiune tisulară (Figura XV.13). Aurul coloidal poate fi folosit ca marcator, atât în metoda directă, cât și în cea indirectă, iar producerea suspensiilor coloidale cu aur (numite "sol") este relativ ușoară.

Folosit singur, în microscopia optică, aurul dă o colorație roz-roșu, fiind necesare particule cu dimensiuni mari care însă scad sensibilitatea reacției. Ca urmare, s-a propus și aplicat o amplificare cu argint care determină creșterea dimensiunilor particulelor de aur și determină o colorație în negru. Amplificarea cu argint se poate vizualiza în lumină polarizată, unde particulele apar strălucitoare pe fondul întunecat. Soluția de amplificare conține ioni de argint (lactat de argint ca sursă de ioni) și agent reducător (hidrochinonă), într-un tampon cu pH acid. Pentru a inhiba reacția autocatalitică dintre argint și agentul reducător, se adaugă gumă arabică, albumină serică bovină, dextran sau polietilen glicol, iar datorită faptului că soluția este instabilă, trebuie protejată de lumină. Recent, s-au introdus kit-uri comerciale pentru amplificarea cu argint, ele având avantajul stabilității componentelor sale, putând fi păstrate câteva luni la frigider și fiind insensibile la lumină. Ca urmare, procedura se poate aplica în microscopia optică.

Utilizarea amplificării cu argint a fost introdusă în anul 1953 de către *W. J. Roberts*, în anul 1980 imunocoloarea cu aur a fost aplicată atât în microscopia optică, cât și în cea electronică, de către *Danscher*.

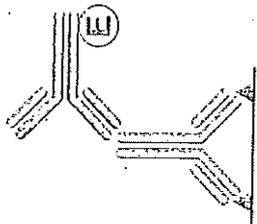
7. Blocarea peroxidazei endogene în 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diluată în apă distilată), pentru 30 de minute la temperatura camerei.
8. Spălare 5 minute în apă distilată.
9. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
10. Blocare în ser heterolog față de anticorpul primar (diluție 1:5 în PBS cu 1% albumină bovină) pentru 30 de minute la temperatura camerei.
11. Incubare cu anticorpul primar marcat enzimatic în diluția optimă (diluție efectuată în 1xPBS + 1% albumină), peste noapte la 4°C.
12. A doua zi spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
13. Se adaugă substrat pentru enzima de detecție și se verifică la microscop apariția și intensitatea semnului. Reacția este oprită prin spălare în 1xPBS.
14. Spălare 5 minute în apă distilată.
15. Contrastare cu hematoxidină.
16. Spălare 20 minute în apă de robinet (albăstrirea hematoxidinei).
17. Deshidratare în etanol (câte 5 minute în soluții de 70%, 90%, 100%, 100%).
18. Clarificare 3x5 minute în xilen.
19. Acoperire cu DPX. Dacă substratul enzimei nu este compatibil cu solvenții, atunci după albăstrirea hematoxidinei lamele sunt spălate în apă distilată și acoperite folosind glicerol.

Metoda directă are avantajul că este o metodă rapidă și performantă. În această metodă este foarte importantă puritatea anticorpului sau a antiserului (anticorpului policlonal). Un antiser conține mai multe molecule de anticorp cu specificitate diferită, astfel că fiecare dintre acești anticorpi sunt marcați în cursul procesului de conjugare și toți pot determina colorarea secțiunilor tisulare, putând duce la erori de interpretare. Astfel, această metodă devine utilă în cazul utilizării anticorpilor monoclonali.

Dezavantajele acestei metode constau în primul rând în faptul că pentru a detecta antigene diferite este necesară conjugarea separată a anticorpului primar corespunzător, iar în al doilea rând în faptul că metoda necesită o concentrație crescută a anticorpului primar. În plus, în cazul acestei metode, nu se poate realiza amplificarea antigenului, astfel că metoda nu este suficient de sensibilă pentru cerințele actuale.

#### Metoda indirectă în doi timpi

Metoda indirectă în doi timpi se bazează pe utilizarea unui anticorp secundar marcat, acesta având specificitate împotriva anticorpului primar nemarcat. În primul timp, anticorpul primar se leagă la antigenul tisular, excesul fiind îndepărtat prin spălare, după care se aplică al doilea anticorp marcat enzimatic, acesta recunoscând determinanții antigenici de pe primul anticorp (devenit antigen). Complexul format este apoi vizualizat cu ajutorul unui cromogen.



#### Metoda indirectă în doi timpi

Metoda este doar o simplă modificare a metodei precedente și are unele avantaje față de aceasta și anume:

- aplicabilitate mai largă prin faptul că un singur anticorp secundar conjugat poate realiza complexe cu o multitudine de anticorpi primari;
- procesul de conjugare se aplică doar anticorpului secundar;
- metoda este mai sensibilă decât cea directă deoarece unii anticorpi secundari pot reacționa cu mai mulți epitopi ai anticorpului primar, amplificând semnului (există mai multe molecule enzimatic atășate la antigenul studiat);
- anticorpul secundar (produs împotriva imunoglobulinei speciei de la care derivă anticorpul primar) este comercializat ca atare (marcat) și are un grad mare de specificitate și afinitate;
- metoda se pretează la controale ale specificității în care anticorpul primar poate lipsi sau poate fi substituit cu un alt anticorp cu specificitate irelevantă, oferind o apreciere a validității fiecărui mod de colorare observat.

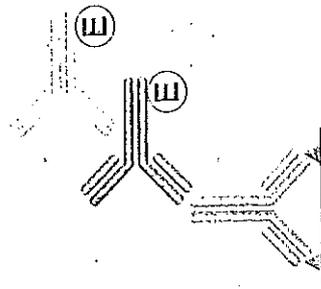
Exemplu de protocol pentru marcarea indirectă (secțiuni atășate pe lamă):

1. Deparafinare 3x5 minute în băi de xilen.
2. Rehidratare prin trecere consecutivă câte 5 minute în etanol de concentrație descrescând (100%, 90%, 70% și respectiv 50%).
3. Spălare 5 minute în apă distilată.
4. Efectuarea, dacă este cazul, a demascării antigenice.
5. Spălare 10 minute în apă de robinet.
6. Spălare 5 minute în apă distilată.
7. Blocarea peroxidazei endogene în 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diluată în apă distilată), pentru 30 de minute la temperatura camerei.
8. Spălare 5 minute în apă distilată.
9. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
10. Blocare în ser izospecie cu anticorpul secundar (diluție optimă în PBS cu 1% albumină bovină) pentru 30 de minute la temperatura camerei.
11. Incubare cu anticorpul primar în diluție optimă (diluție efectuată în 1xPBS + 1% albumină), peste noapte la 4°C.
12. A doua zi spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
13. Incubare cu anticorpul marcat secundar anti-primar în diluția optimă timp de 30 de minute.
14. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.

15. Se adaugă substrat pentru enzima de detecție și se verifică la microscop apariția și intensitatea semnalului. Reacția este oprită prin spălare în 1xPBS.
16. Spălare 5 minute în apă distilată.
17. Contrastare cu hematxilina.
18. Spălare 20 minute în apă de robinet (albăstrirea hematxilinei).
19. Deshidratare în etanol (câte 5 minute în soluții de 70%, 90%, 100%, 100%).
20. Clarificare 3x5 minute în xilen.
21. Acoperire cu DPX.

#### Metoda indirectă în trei timpi

Metoda indirectă în trei timpi se bazează pe utilizarea a doi anticorpi „secundari” marcați enzimatic cu aceeași enzimă. Acești doi anticorpi se aplică secvențial, ei prezentând echivalență de specie. Cel de al treilea anticorp amplifică semnalul obținut prin legarea anticorpului secundar (Figura XV.16). Astfel metoda în trei timpi are sensibilitate similară ce cea în doi timpi, dar produsul final de reacție este mult mai intens colorat.



#### Metoda indirectă în trei timpi

Această metodă are avantajul detectării antigenelor ce prezintă un număr redus de epitopi.

#### Metoda peroxidază anti-peroxidază (PAP) și metoda fosfatază alcalină anti-fosfatază alcalină (APAAP)

Acest grup de metode înăltură dezavantajele procedurilor de conjugare chimică, deoarece componenta colorată (marcatoare) este legată de antigen exclusiv prin legături imunologice. Această tehnică, dezvoltată de *Mason și col.*, este foarte puțin utilizată astăzi datorită apariției altor procedee mai simple și mai performante de amplificare a semnalului.

#### Metoda peroxidază anti-peroxidază (PAP)

Această metodă se bazează pe un principiu similar metodei punții enzimactice. *Sternberg* a utilizat pentru prima oară această metodă în vederea detectării anticorpilor anti-treponemă. Aceste microorganisme, invizibile în microscopia optică prin metodele obișnuite, au fost vizualizate prin metoda PAP, cu ajutorul unor diluții variate de antiserului (de la 1:100.000 la 1:1.000.000). Aceste diluții au fost de 100-1000 de ori mai mari decât cele din fluorescența indirectă, ceea ce arată că semnalul reacției enzimactice este mult mai ușor detectabil comparativ cu fluorescența, sistemul PAP fiind raportat ca având o sensibilitate de 100-1000 ori mai bună decât procedurile de conjugare comparabile. Același lucru a fost demonstrat de către *Burns* pe secțiuni la parafină, el localizând antigenul hepatitei B cu ajutorul metodei PAP.

Procedeul utilizează anticorpi primari nemarcați, anticorpii secundar, complexul imun solubil enzimă-antigen și un cromogen. Între anticorpii primari și complexul imun enzimatic trebuie să existe compatibilitate de specie (reactivul PAP și anticorpii primari trebuie să fie derivate ale aceleiași specii sau de la specii foarte apropiate, cu determinanți antigenici comuni). Anticorpii secundari (puntea) este derivat de la o altă specie și are specificitate atât pentru anticorpii primari cât și pentru imunoglobulinele încorporate în complexul PAP. Complexul PAP este alcătuit din trei molecule de peroxidază și doi anticorpi (Ig G) și este disponibil sub formă de produs comercial.

Metoda a fost foarte larg aplicată pe secțiuni la parafină, deoarece are un înalt grad de specificitate și sensibilitate, iar reactivii prezintă o mare stabilitate. Metoda este totuși limitată de faptul că reactivul PAP trebuie să fie de aceeași specie cu anticorpii primari, ca urmare această metodă este tot mai rar utilizată astăzi.

Sursele care determină colorație nespecifică pot fi grupate, ca și în cazul fluorescenței, în:

- metodologice (inerente datorită reactivilor imunologici folosiți);
- imunologice (date de reactivitatea încrucișată a anticorpilor primari).

Apariția colorației nespecifice ca urmare a surselor metodologice se datorează:

1. atașării la țesut a unei componente a antiserului primar, prin legături non-immunologice;
2. atașării directe la țesut a unei componente non-anti Ig G a antiserului secundar (link-ului), această componentă putând să fie sau să nu fie un anticorp;
3. atașarea directă la țesut a complexului PAP.

Apariția colorației nespecifice, ca urmare a surselor imunologice, poate fi evitată dacă sunt folosite concentrații ale anticorpului primar sub 1:50. Astfel, se evită background-ul dat atât de reacțiile încrucișate ale anticorpului (non-specificitatea anticorpului) cât și de legarea nespecifică a imunoglobulinelor din antiserul primar (non-specificitatea metodei).

Un avantaj al metodei PAP este acela că, datorită sensibilității sale foarte ridicate, nu este necesar să conservăm un număr mare de determinanți antigenici, spre deosebire de metodele care utilizează anticorpi marcați, la care trebuie aleasă cea mai bună cale de fixare a țesutului pentru a păstra reactivitatea antigenului sau

să lucrăm pe secțiuni la gheață (caz în care reactivitatea antigenului este cel mai bine conservată).

Procedura optimă de colorare cu metoda PAP, după Sternberg (1979), trebuie să respecte următoarele etape:

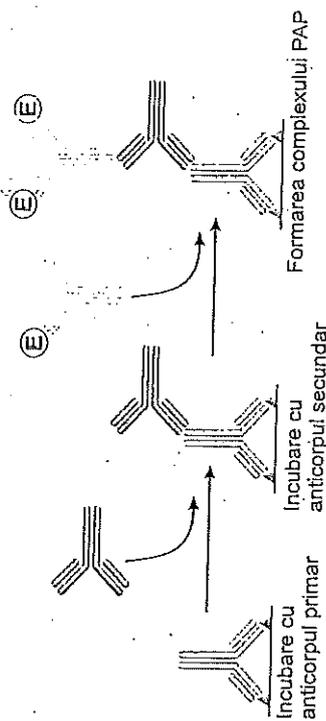
- secțiunile la parafină cu grosimea de 6 μm se atașează pe lame curate acoperite cu albumină;
- secțiunile se deparafinează imediat înaintea imunocolorării;
- se înconjoară secțiunile cu ajutorul unui creion special (PAP pen), pentru a minimaliza difuzarea pe toată lama a soluțiilor utilizate la colorare;
- pentru spălare se recomandă tampon Tris 0,05 M la pH 7,6;
- după fiecare spălare, zonele din jurul secțiunilor se vor usca prin ștergere cu ajutorul hârtiei de filtru, tot în vederea prevenirii difuzării reactivilor ce vor fi utilizați ulterior.

Ordinea aplicării reactivilor este următoarea:

1. Ser normal al speciei în care a fost obținut anticorpus secundar (link-ul) 3% în Tris salin 0,05 M, la pH 7,6, timp de 30 de minute, la temperatura camerei și spălarea lamelor, pentru a îndepărta excesul de ser.
2. Antiserul primar, diluat în tampon ce conține 1% ser normal al speciilor în care a fost obținut anticorpus secundar, 48 de ore, la 2-5°C. Ultimele două ore lamele se trec la temperatura camerei, apoi sunt spălate. Perioada de incubare poate fi redusă la incubare peste noapte sau chiar la 30 de minute la temperatura camerei, dacă se crește corespunzător concentrația anticorpusului primar.
3. Antiserul secundar (link) diluat 1:10-1:20 în tampon, timp de 30 de minute, urmat de spălare (rezultate bune s-au obținut chiar și la diluții de 1:100-1:200).
4. Reactiv PAP diluat în tampon ce conține 1% ser normal al speciilor în care s-a obținut link-ul, timp de 30 de minute, la temperatura camerei, urmat de spălare. Se va utiliza reactiv PAP (păstrat congelat) la o diluție de 1:80-1:100.
5. Soluție proaspătă de DAB 0,05% și 0,01% peroxid de hidrogen în Tris 0,05 M la pH 6, timp de 3-8 minute, urmată de spălare în apă distilată.

Burris a arătat că pași 1, 3 și 4 pot fi reduși la 5-10 minute, fără o scădere mare a sensibilității și că, pentru țesuturile bogate în eritrocite, este bine să se inhibe peroxidaza endogenă prin expunerea secțiunilor, după deparafinare, într-o soluție 0,5% de peroxid de hidrogen în metanol timp de 30 de minute.

6. Contrastare cu hematxilina.
7. Montare în DPX.



### Procedura de lucru pentru metoda PAP

Procedura de lucru pentru metoda PAP recomandată de J.A. Kiernan (2001) păstrează foarte mult din metoda lui Sternberg :

1. Aplicarea antiserului primar specific (obținut în iepure) pentru antigenul cercetat pe secțiune, diluția fiind variabilă în funcție de antigenul ce urmează a fi detectat de la 1:50 la 1:2000, timp de o oră la temperatura camerei;
2. Spălare în trei băi de PBS (tampon fosfat salin), cu pH 7,6;
3. Aplicarea antiserului secundar (capră anti-iepure sau porc anti-iepure), timp de 30 minute la temperatura camerei-diluția utilizată fiind cuprinsă între 1:10-1:40;
4. Spălare în trei băi de PBS (tampon fosfat salin);
5. Aplicarea complexului PAP (care de obicei este produs în iepure), timp de 30 minute, la temperatura camerei, diluție 1:50, în tampon fosfat salin;
6. Spălare în trei băi de PBS (tampon fosfat salin);
7. Incubare cu DAB sau AEC.

Incubarea cu ser normal se va face opțional într-o diluție de 1:10 în PBS cu ser normal de capră sau de porc timp de 30 de minute la temperatura camerei, înaintea aplicării anticorpusului primar.

Procedurile de control ale acestei metode sunt reprezentate de:

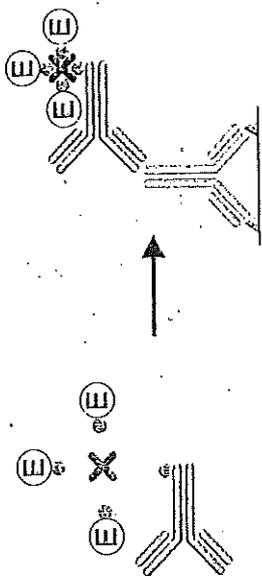
- omiterea tratamentului cu ambele antiseri și cu complexul PAP și incubarea cu agenți de blocare a peroxidazei endogene, pentru a demonstra prezența activității peroxidazei endogene;
- omiterea tratamentului cu antiserul primar, colorațiile apărute neputând fi date de antigen;
- substituirea antiserului primar cu ser non-inun (ser normal de iepure) această metodă evidențiind orice legătură non-immunologică a gantoglobulinelor cu țesutul;
- omiterea tratamentului cu antiserul primar și cu cel secundar, astfel putând fi evidențiată orice legătură nespecifică a complexului PAP.

calculată în așa fel încât rezultă moleculele de biotină incomplet saturate de moleculele de avidină (10 µg/ml de avidină și 2,5 µg/ml de biotină conjugată cu peroxidază).

Soluții necesare pentru metoda ABC:

- tampon fosfat salin (solvent pentru reactivi);
- antiser primar;
- antiser secundar biotinitat (care se combină cu Ig speciei în care este produs antiserul primar);
- soluția de avidină;
- peroxidaza biotinitată;
- soluția ABC obținută prin combinarea soluției de avidină cu peroxidaza biotinitată;
- reactiv pentru evidențierea peroxidazei (DAB sau ABC).

Sensibilitatea complexului avidină-biotină a crescut odată cu modificările aduse acestuia de către *Hsu și col.*, sistemul putând fi folosit atât ca metodă directă, cât și ca metodă indirectă.



#### Metoda ABC

Procedura de lucru pentru metoda avidină-biotină (după *Hsu și Raines*, 1981) modificată de *Cattorelli*, 1988):

1. Inhibarea peroxidazei endogene cu peroxid de hidrogen 0,3% în PBS, timp de 30 minute;
2. Blocarea colorației nespecifice de fond cu ser de la o specie diferită de cea în care s-a obținut anticorpii primar diluție 10% în PBS, timp de 30 minute (sau utilizând o altă proteină);
3. Incubarea cu antiserul primar (ex. produs în iepure), durata fiind de o oră, la temperatura camerei;
4. Clătire în trei băi de PBS;
5. Aplicarea antiserului secundar biotinitat (ex. Ig biotinitată capră anti- iepure), diluție 1:10-1:40, timp de 30-60 minute;
6. Clătire în trei băi de PBS;
7. Aplicarea soluției ABC de lucru timp de 60 minute, la temperatura camerei;
8. Clătire în trei băi de PBS;
9. Incubare cu cromogenul

#### Metoda fosfatază alcalină-antifosfatază alcalină (APAAP)

Această metodă este foarte asemănătoare cu precedenta, dar complexul PAP este înlocuit cu complexul APAAP, a cărui configurație amintește modul normal de legare a unui anticorp bivalent. Metoda a fost aplicată pentru prima oară de către *Cordell și colaboratorii* și prezintă două aplicații majore:

1. în vederea imunocolorării țesuturilor care prezintă valori crescute ale peroxidazei endogene;
  2. Pentru realizarea dublelor imunoreacții în conjuncție cu peroxidaza.
- Prin această metodă se realizează colorația specifică a structurilor tisulare într-un roșu strălucitor (substratul folosit fiind Fast red sau new fuchsin).
- Metoda este deosebit de utilă pentru imunocolorarea țesuturilor bogate în peroxidază endogenă deoarece blocarea acesteia poate fi uneori dificilă și poate duce la denaturarea unor determinanți antigenici.
- În cadrul dublei imunocolorări în conjuncție cu complexul PAP, fosfataza alcalină se utilizează secundar acestui complex.

#### Metoda complexelor streptavidină-biotină (ABC)

##### Proprietăți ale avidinei și biotinei utile în IHC

Avidina este o glicoproteină bazică, cu greutatea moleculară de 68 kDa, extrasă din albușul de ou, ce prezintă o structură terțiară, cu patru situsuri de legare, ce au mare afinitate pentru molecula biotinei. Legătura ce se realizează între cele două substanțe este o legătură chimică, de tipul legăturilor stearine de corespondență prin afinitate de formă, cu o mare specificitate, cu o constantă de disociere de 10<sup>-15</sup>. Aceste legături se formează rapid și sunt reversibile doar în condiții extreme, ca de exemplu aciditatea crescută.

Biotina (vitamina H) este un metabolit al multor tipuri de microorganisme, ce formează grupul prostetic al multor enzime. Ea poate fi legată chimic de anticorpii primari, rezultând un conjugat biotinitat care localizează antigenul pe secțiunile tisulare. Subsecvent se adaugă avidina, conjugată chimic cu peroxidaza, care se leagă strâns la anticorpii biotinitat, localizând componenta peroxidată la situsul antigenului tisular. Metoda prezintă și ea unele dezavantaje cum ar fi:

- loturile diferite de avidină și de biotină prezintă afinități diferite, acest lucru afectând sensibilitatea și reproductibilitatea metodei în laboratoare diferite;
- unele țesuturi prezintă cantități semnificative de biotină endogenă care poate lega direct complexul avidină-peroxidază, rezultând reacții fals pozitive, lucru ce poate fi evitat prin utilizarea diferitelor tehnici de blocare.

Legăturile nespecifice cu biotina endogenă rămân însă o problemă, la fel ca și legăturile electrostatice ce se pot forma între avidina liberă sau conjugată cu diverse componente celulare (în ficat, rinichi, glanda mamară și țesutul adipos), determinând colorație nespecifică (vezi blocarea enzimelor endogene).

Formarea complexului ABC presupune mixarea optimă dintre avidină (sau streptavidină cum vom vedea mai jos) și enzima biotinitată, preparată cu maxim 30 de minute înainte de utilizare. În acest complex preformat, în care avidina este liberă și biotina este conjugată cu peroxidaza, concentrația moleculelor este

O altă metodă avidină-biotină este cea denumită LAB (labelled avidin), în care avidina este marcată enzimatic (de exemplu cu peroxidaza), metodă care pare a fi de 4-8 ori mai sensibilă decât metoda ABC. În prezent, în ambele metode s-a înlocuit avidina cu streptavidina, o proteină neglicozilată ce reduce posibilitatea de apariție a semnalului de fond fals.

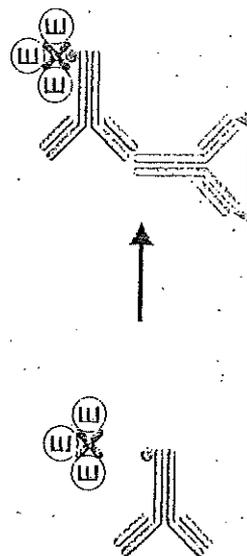
#### Metoda biotină - avidină marcată (LAB) și metoda biotină - streptavidină marcată (LSAB)

Metoda streptavidină-biotină substituie avidina cu streptavidina și are la bază conjugarea directă a streptavidinei cu moleculele enzimatic. Streptavidina este un analog tetrameric al avidinei, cu o greutate moleculară de 60 kDa, extras din bacteria *Streptomyces avidinii*, ce este capabil să lege, cu o mare afinitate, moleculele de biotină. Această afinitate este teoretic de zece ori mai mare decât cea a anticorpilor pentru antigenele lor, ducând la o detectare specifică intensă și la o amplificare a legăturilor antigen-anticorp.

Azi se preferă utilizarea streptavidinei în locul avidinei din următoarele motive:

- streptavidina nu conține carbohidrați care se pot lega nespecific de substanțele lectin-like întâlnite în țesuturile normale (ficat, rinichi, creier, mastocite);
- streptavidina are punct izoelectric neutru (în timp ce avidina are punct izoelectric la 10), ca urmare complexe cu streptavidină nu determină legături electrostatice nespecifice caracteristice pentru complexe cu avidină, care în mod fiziologic sunt încărcate pozitiv;
- reactivul comercializat poate fi depozitat timp îndelungat, el fiind foarte stabil, ca urmare a faptului că enzima este direct conjugată cu streptavidina în complexul biotină-streptavidină, care poate utiliza atât peroxidaza, cât și fosfataza alcalină ca enzimă marcată;
- sensibilitatea crește și a acestei metode permite utilizarea diluțiilor crescute de anticorpi primari, cu economisirea acestora.

Spre deosebire de metoda ABC, procedeele LAB și LSAB folosesc avidina sau streptavidina direct marcate enzimatic și nu prin intermediul altor molecule de biotină.



Metoda LSAB

#### Procedura de lucru LSAB (HRP):

1. Deparafinare 3x5 minute în băi de xilen.
2. Rehidratare prin trecere consecutivă câte 5 minute în etanol de concentrație descrescândă (100%, 90%, 70% și respectiv 50%).
3. Spălare 5 minute în apă distilată.
4. Efectuarea, dacă este cazul, a demascării antigenice.
5. Spălare 10 minute în apă de robinet.
6. Spălare 5 minute în apă distilată.
7. Blocarea peroxidazei endogene în 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diluată în apă distilată), pentru 30 de minute la temperatura camerei.
8. Spălare 5 minute în apă distilată.
9. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
10. Blocare în ser izospecie cu anticorpul secundar (diluție optimă în PBS cu 1% albumină bovină) pentru 30 de minute la temperatura camerei.
11. Incubare cu anticorpul primar în diluție optimă (diluție efectuată în 1xPBS + 1% albumină), peste noapte la 4°C.
12. A doua zi spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
13. Incubare cu anticorpul biotinilat secundar anti-primar în diluția optimă timp de 30 de minute (unele companii îl includ în kitul de LSAB).
14. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
15. Incubare cu reactiv LSAB în diluție optimă timp de 30 de minute.
16. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
17. Se adaugă substrat pentru enzima de detecție și se verifică la microscop apariția și intensitatea semnalului. Reacția este oprită prin spălare în 1xPBS.
18. Spălare 5 minute în apă distilată.
19. Contrastare cu hematoxilină.
20. Spălare 20 minute în apă de robinet (albăstrirea hematoxilinei).
21. - Deshidratare în etanol (câte 5 minute în soluții de 70%, 90%, 100%, 100%).
22. Clarificare 3x5 minute în xilen.
23. Acoperire cu DPX.

#### Metoda amplificării polimerice

Tehnica amplificării polimerice (EPOS) a fost introdusă de *Pharac și col.* în anul 1993. Metoda constă în utilizarea unui complex în care un număr mare (10 molecule) de molecule anticorpi primari și de enzimă peroxidază (70 molecule) sunt atașate la un polimer dextran.

Spre deosebire de metoda directă tradițională, această metodă oferă posibilitatea obținerii unei sensibilități similare cu cea realizată prin metoda avidină-biotină, dar într-o manieră mai rapidă (cu mai puțini pași de reacție).

Avantajele oferite de această metodă sunt reprezentate de rapiditatea sa (în special pe secțiunile la gheață) și de sensibilitatea suficient de mare pentru a pune

în evidență chiar și cantități mici de antigene. Cu toate acestea, azi metoda nu este larg utilizată, probabil datorită faptului că anticorpii primari disponibili pentru această metodă sunt destul de limitați numeric și suficient de scumpi. Totuși, metoda se poate utiliza cu succes în cazul în care este necesar un diagnostic rapid, metoda fiind rapidă în sine și cu posibilitatea de scurtare semnificativă a timpilor, fără a compromite rezultatele.

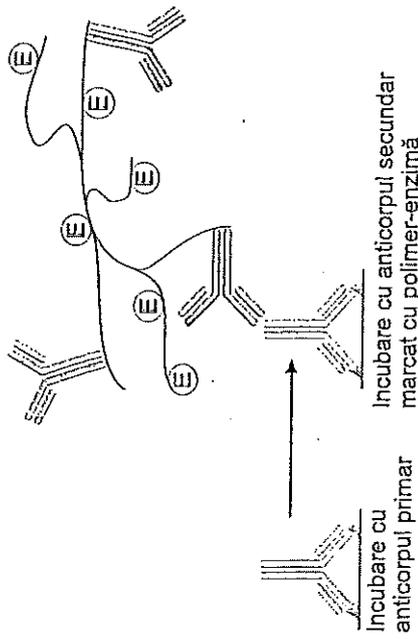
Procedura de lucru pentru această tehnică este următoarea:

- Deparafinare;
- Hidratare;
- Inhibarea peroxidazei endogene;
- Spălare în apă distilată;
- Spălare în PBS;
- Incubare cu conjugat EPOS timp de 10-60 minute;
- Spălare în PBS;
- Incubare cu cromogen;
- Colorarea nucleilor;
- Deshidratare, clarificare, montare.

Varianta actual folosită a procedurii de amplificarea polimerică a fost raportată pentru prima oară în 1995 sub numele de *metoda En Vision* (Dako, Carpinteria, CA). Metoda presupune utilizarea dextranului cu greutate moleculară mare pentru conjugarea enzimei cu anticorpii linker ceea ce pare să creeze un obstacol spațial ce compromite abilitatea de penetrare a reactivului de detecție. Astfel, în 1999, a fost testat un nou reactiv polimeric marcat (Power Vision) într-un studiu comparativ cu alte sisteme de detecție în mai mulți timpuri. Sistemul Power Vision are la bază un conjugat compact enzimă-anticorp linker, fiecare moleculă de anticorp linker, având atașat un număr mare de molecule enzimatiche. Dimensiunea moleculei este micșorată prin utilizarea unor reactivi multifuncționali liniari sau cu ramificări minime, care sunt capabili să polimerizeze într-un mod compact cu anticorpii linker și cu enzima.

Avantajele acestei metode în doi timpuri sunt reprezentate de simplitatea și sensibilitatea remarcabile pe care le oferă. În plus, metoda nu utilizează biotina și streptavidina, deci nu mai este necesară nici blocarea biotinei endogene în țesuturile bogate în vitamina H.

Utilizarea acestei metode impune folosirea unor diluții mai mari ale anticorpilor primari, în vederea înlăturării unei eventuale colorări nespecifice, lucru care este, de asemenea, avantajos în ceea ce privește economisirea acestor anticorpi.



### Procedura de lucru pentru metoda EnVision

Exemplu de protocol pentru tehnica EnVision:

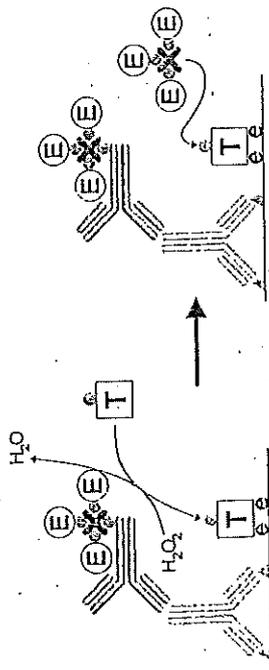
1. Deparafinare 3x5 minute în băi de xilen.
2. Rehidratare prin trecere consecutivă câte 5 minute în etanol de concentrație descrescândă (100%, 90%, 70% și respectiv 50%).
3. Spălare 5 minute în apă distilată.
4. Efectuarea, dacă este cazul, a demascării antigenice.
5. Spălare 10 minute în apă de robinet.
6. Spălare 5 minute în apă distilată.
7. Blocarea peroxidazei endogene în 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diluată în apă distilată), pentru 30 de minute la temperatura camerei.
8. Spălare 5 minute în apă distilată.
9. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
10. Blocare în ser izospecie cu anticorpii secundar (diluție optimă în PBS cu 1% albumină bovină) pentru 30 de minute la temperatura camerei.
11. Incubare cu anticorpii primari în diluție optimă (diluție efectuată în 1xPBS + 1% albumină), peste noapte la 4°C.
12. A doua zi spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
13. Incubare cu anticorpii secundar conjugat cu polimer-enzimă.
14. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
15. Se adaugă substrat pentru enzima de detecție și se verifică la microscop apariția și intensitatea semnalului. Reacția este oprită prin spălare în 1xPBS.
16. Spălare 5 minute în apă distilată.
17. Contrastare cu hematoxilina.
18. Spălare 20 minute în apă de robinet (albăstruirea hematoxilinei).
19. Deshidratare în etanol (câte 5 minute în soluții de 70%, 90%, 100%, 100%).

20. Clarificare 3x5 minute în xilen.
21. Acoperire cu DPX.

#### Metoda cu amplificarea catalizată a semnalului

Pe baza metodelor enzimatică de amplificarea adoptate în anii 80 pentru sistemele de imunodetecție, Bobrow și colaboratorii au dezvoltat un sistem de detecție catalizat prin precipitare (CARD) pentru a obține o mai bună amplificarea a semnalului în sistemele de imunodetecție în fază solidă și pe membrane. Ulterior acest sistem a fost introdus și în imunohistochimie începând cu anul 1992.

Amplificarea semnalului, prin metoda CARD, se bazează pe depozitarea tiramidă biotinilată prin intermediul formării de radicali liberi ce apar catalizați de acțiunea oxidantă a peroxidazei din țelină. Se presupune că tiramida biotinilată se va atașa covalent de regiunile bogate în electroni (conținând aminoacizii tirozină, fenilalanină, triptofan și alții), ducând la depozitarea a și mai multor molecule biotinilate în jurul situsului de reacție antigen-anticorp, adică în final, amplificarea semnalului.



#### Principiul tehnicii CARD

Aplicarea amplificării mediate de tiramidă (TSA) în imunohistochimie a ajutat la detectarea unor antigene greu de vizualizat altfel pe secțiunile fixate și incluse în parafină. Există câteva produse bazate pe TSA ce sunt disponibile de la unii producători (NEN Life Science Products, Boston, MA; CSA system, DAKO, Carpinteria, CA). În utilizarea acestor kituri cu TSA, sunt necesari câțiva pași suplimentari după sistemul clasic de detecție prin peroxidază, și anume, incubarea cu tiramidă biotinilată, spălare, și apoi incubare cu streptavidină conjugată cu peroxidază. În final, se adaugă un cromogen (DAB, AEC) prin care se realizează vizualizarea practică a semnalului.

Deși metoda TSA dă rezultate satisfăcătoare în ceea ce privește amplificarea semnificativă a semnalului pentru imunohistochimie și hibridizare in situ, nu este un procedeu larg aplicat datorită câtorva motive:

- Pași adiționali fac experimentele mai lungi.
- Semnalul de fond nespecific poate crește și el pe măsură ce crește semnalul specific.
- În unele cazuri, tratamente îmbunătățite de recuperare antigenică pot duce la același rezultat.

#### Exemplu de protocol pentru tehnica CSA:

1. Deparafinare 3x5 minute în băi de xilen.
2. Rehidratare prin trecere consecutivă câte 5 minute în etanol de concentrație descrescândă (100%, 90%, 70% și respectiv 50%).
3. Spălare 5 minute în apă distilată.
4. Efectuarea, dacă este cazul, a demascării antigenice.
5. Spălare 10 minute în apă de robinet.
6. Spălare 5 minute în apă distilată.
7. Blocarea peroxidazei endogene în 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diluată în apă distilată), pentru 30 de minute la temperatura camerei.
8. Spălare 5 minute în apă distilată.
9. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
10. Blocare în ser izospecie cu anticorpul secundar (diluție optimă în PBS cu 1% albumină bovină) pentru 30 de minute la temperatura camerei.
11. Incubare cu anticorpul primar în diluție optimă (diluție efectuată în 1xPBS + 1% albumină), peste noapte la 4°C.
12. A doua zi spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
13. Incubare cu anticorpul secundar biotinilat.
14. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
15. Incubare cu streptavidină-HRP, 30 de minute la temperatura camerei.
16. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
17. Incubare cu tiramidă biotinilată, 30 de minute la temperatura camerei.
18. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
19. Incubare cu streptavidină-HRP, 30 de minute la temperatura camerei.
20. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
21. Se adaugă substrat pentru enzima de detecție și se verifică la microscop apariția și intensitatea semnalului. Reacția este oprită prin spălare în 1xPBS.
22. Spălare 5 minute în apă distilată.
23. Contrastare cu hematxilină.
24. Spălare 20 minute în apă de robinet (albăstrirea hematxilinei).
25. Deshidratare în etanol
26. Clarificare 3x5 minute în xilen.
27. Acoperire cu DPX.

### Detectia fluorescență

Tehnicile utilizate în acest scop pot fi tehnici directe sau sandwich (bridge).

#### Tehnica imunofluorescenței directe

În cadrul acestei tehnici, fesiul este tratat cu anticorpii marcați cu fluorocrom, anticorpii se va lega la antigenul pentru care este specific, iar locul de legare este identificat cu ajutorul microscopului cu fluorescență. Excesul de anticorpi se îndepărtează prin spălare cu un tampon la pH neutru.

#### a) Procedura pentru secțiunile la gheață

- Secționarea probei urmată de uscarea lamelor la aer timp de 30 de minute;
- spălare în PBS (tampon fosfat salin) pH 7,2, timp de 10 minute;
- uscarea lamelor în jurul secțiunilor, cu ajutorul hârtiei de filtru;
- aplicarea fluorocromului conjugat, timp de 30 de minute, la temperatura camerei, în camera umedă;
- îndepărtarea conjugatului nelegat prin spălare în PBS, timp de 10 minute cu sau fără agitare;
- uscarea lamelor în jurul secțiunilor și aplicarea mediului de montare (glicerol tamponat pH 8) apoi aplicarea lamei.

#### b) Procedura pentru secțiunile incluse la parafină

Secțiunile incluse la parafină au dezavantajul că prezintă o scădere a expresiei determinantilor antigenici ca urmare a procesului de fixare, deci este mai avantajos ca ele să fie utilizate în cadrul tehnicilor imunoenzimatiche. Totuși, unele antigene (cum ar fi unii agenți patogeni infecțioși, imunoglobulinele din citoplasma plasmocitelor și imunoblastelor B) se păstrează adecvat după fixare, putându-se aplica cu succes metodele imunofluorescenței.

Procedura necesită deparafinarea secțiunilor și uneori tripsinizarea acestora. Pentru deparafinare prima baie de xilen utilizată va fi la 60°C.

Alcoolurile utilizate pentru rehidratare vor avea concentrații descrescătoare (100%, 95% și 70%), după care secțiunile vor fi spălate în PBS.

Tripsinizarea se va face la 37°C cu o soluție de tripsină 0,1% (în 0,1% clorură de calciu pH 7,8), timp de 5 până la 60 de minute, în funcție de antigenul cercetat. Atunci când este necesară tripsinizarea, este bine ca secțiunile să fie întinse pe lame cu adeziv. Pașii următori sunt aceiași ca în cazul secțiunilor la gheață.

#### Tehnicile sandwich în imunofluorescență

Metodele sandwich prezintă avantajul creșterii sensibilității și cel al scăderii numărului de reactivi conjugați cu fluorocrom necesari, comparativ cu metoda directă. Aceste avantaje se datorează faptului că, în cadrul metodelor sandwich, mai multe molecule marcate cu fluorocrom se pot lega la fiecare anticorpi primar, crescând cantitatea de fluorocrom localizat la locul de legare al anticorpii primar și astfel crescând sensibilitatea reacției. De asemenea, în cadrul metodelor sandwich, aceiași reactiv marcat cu fluorocrom poate fi utilizat pentru a identifica locul de legare al mai multor anticorpi primari, rezultând o scădere a numărului de reactivi marcați necesari.

Tehnicile sandwich includ:

- a) imunofluorescența indirectă;
- b) tehnica punții proteină A;
- c) tehnica punții avidină-biotină.

a) Procedura din cadrul *tehnicii imunofluorescenței indirecte* constă în:

- incubarea secțiunilor cu anticorpii specifici nemarcați;
- spălare în PBS;
- incubarea cu anticorpii secundar (cu specificitate pentru imunoglobulina speciei în care a fost produs anticorpii primar) marcați cu fluorocrom.

b) *Tehnica pentru proteina A* este similară tehnicii indirecte și utilizează proteina A derivată de la stafilococi. Proteina A leagă regiunea F<sub>c</sub> a moleculelor imunoglobulinice, eficiența acestei legături variind în funcție de subclasa de imunoglobuline precum și în funcție de specie. Ca urmare, proteina A poate fi utilizată ca punte între anticorpii primar specifici nemarcați și un fluorocrom.

c) *Tehnica punții avidină-biotină* utilizează avidina din albușul de ou care poate lega patru molecule de biotină (vitamină H). Această legătură non-immunologică poate fi utilizată ca punte între proteine conjugate cu biotină și alte proteine conjugate cu avidină. Această posibilitate este exploatată atât în imunofluorescență, cât și în metodele imunoenzimologice (vezi mai jos).

Biotina poate fi conjugată cu anticorpii primari, iar după ce acest anticorpi biotinilat se leagă specific de antigen, el poate fi identificat prin adăugarea de avidină conjugată cu fluorocrom. Ca o alternativă se poate utiliza un anticorpi primar neconjugat, apoi un anticorpi secundar biotinilat și în final avidina conjugată cu fluorocromul.

Colorația nespecifică dată de biotina endogenă (prezentă în special în ficat și rinichi) poate fi evitată prin procedurile de blocare a acesteia.

### V.2. Detectia de antigene multiple pe aceeași secțiune

De multe ori, în cadrul diagnosticului anatomopatologic, dar mai ales în cercetare, este necesară identificarea a două sau mai multe antigene pe același preparat. Tehnica secțiunilor seriate marcate consecutiv cu anticorpi diferiți nu poate rezolva decât foarte rar această problemă, dar nu în cazul în care situsurile de interes sunt foarte mici sau se așteaptă o colocalizare a acestor antigene.

Apariția anticorpii primari monoclonali adsorbiți specifici, a anticorpii secundari monoclonali specifici pentru o anumită izoformă de anticorpi primari (de exemplu capră anti șoarece specific pentru izotipul IgG1a), a sistemelor de detecție enzimatică multiplă sau fluorescență au făcut posibilă această abordare.

Principalele utilizări ale imunohistochimiei duble sau triple sunt deci după cum urmează:

- Marcarea a două sau mai multe tipuri celulare distincte, analizându-se raporturile și regiunile de contact ale acestora.

substratul utilizat la prima colorare să nu altereze, sau să diminueze antigenicitatea celui de a doua anticorp primar.

Deși tehnicile de imunofluorescență sunt în mai multe cazuri mai intens folosite decât metodele chimice de colorare, acestea prezintă unele inconveniente, cum ar fi: atenuearea semnului emis în prezența semnalului de excitație sau datorită unei depozități prelungite în lamelor, precum și apariția autofluorescenței în cazul fixării prelungite în formalină, neajunsuri care nu sunt prezente în cazul metodelor imunohistochimice de detecție a semnalului.

Multitudinea de combinații ale tehnicilor de imunohistochimie dublă poate fi sistematizată în două categorii principale:

Tehnici secvențiale complete sau parțiale în cadrul acestor metode fiecare secvență de reacție anticorp primar - anticorp secundar - enzimă este efectuată independent, dezvoltarea chimică a culorii de detecție putând fi făcută după fiecare ciclu (tehnică secvențială completă), sau la sfârșitul ambilor cicli de imunohistochimie (tehnică secvențială incompletă).

Redăm mai jos protocolul unei marări secvențiale complete pentru 2 anticorpi primari:

1. Deparafinare 3x5 minute în băi de xilen.
2. Reluidare prin trecere consecutivă câte 5 minute în etanol de concentrație descrescândă (100%, 90%, 70% și respectiv 50%).
3. Spălare 5 minute în apă distilată.
4. Efectuarea, dacă este cazul, a demascării antigenice.
5. Spălare 10 minute în apă de robinet.
6. Spălare 5 minute în apă distilată.
7. Blocarea peroxidazei endogene în 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diluată în apă distilată), pentru 30 de minute la temperatura camerei.
8. Spălare 5 minute în apă distilată.
9. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
10. Blocarea biotinei endogene cu ajutorul unui kit dedicat (incubare seriată cu streptavidină și biotină, câte 15 minute).
11. Spălare rapidă în soluție 1xPBS.
12. Blocare în lapte degresat 1% pentru 30 de minute la temperatura camerei.
13. Incubare cu primul anticorp primar în diluție optimă (diluție efectuată în 1xPBS + 1% albumină), peste noapte la 4°C.
14. A doua zi spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
15. Incubare cu anticorpul secundar specific biotinitat timp de 30 de minute.
16. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
17. Incubare cu streptavidină-HRP, 30 de minute la temperatura camerei.
18. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.

Marcarea diferiților constituenți ai compartimentelor subcelulare, în caz de colocalizare, obținându-se o culoare combinată (respectând principiul cromatic aditiv pentru semnale chimice separate de substracție pentru semnalele fluorescente).

Compararea tirului de marcare al unui anticorp bine caracterizat cu unul nou apărut pe piață, fiindcă înțelegerea sa este esențială în comparația cu celelalte date de sondă ADN sau ARN (hibridizare in situ) sau cu celelalte date de imunohistochimie pentru proteina codată și respectiv translatată în celulă și așa ai putea să înțelegi diferențele.

Economisirea de țesut acolo unde specimenul este disponibil în cantități foarte mici.

Pe lângă identificare și în analiză coreșpunzătoare a colocalizării a două sau mai multe antigene sunt, așadar necesare tehnici și proceduri de verificare de imunohistochimie multiplă, prin detecție chimică sau fluorescență, a doi sau mai multor antigene în același țesut și în același timp.

Detecția multiplă chimică este o tehnică care permite obținerea simultană a două antigene pe o singură secțiune, aceste tehnici fiind adaptate atât pentru metodele conjugate, cât și pentru metodele cu anticorpi marcați (Figura XIV-23). Așa de exemplu, prima secvență a imunocolorării pentru un antigen este încheiată cu dezvoltarea reacției peroxidazei, utilizând ca substrat cromogen diaminobenzidina sau colorarea pentru al doilea antigen este dusă la sfârșit cu un anticorp primar cu specificitate diferită de primul anticorp primar și cu un substrat cromogen pentru peroxidază diferit de primul (de exemplu 4-nitro-1-naftol); rezultând un produs de reacție albastru contrastat cu utilizarea bromidată de DAB: metoda aceasta este foarte potrivită pentru aplicarea în imunohistochimie.

Posibilitatea reacției încrucișate a celei de-a doua secvenței de anticorpi cu prima secvență poate fi evitată prin folosirea unor metode imunoenzimice duble, în care doi anticorpi primari specifici, produși în două specii diferite, se utilizează în combinații cu specii separate de anticorpi secundari specifici cuplați cu enzime diferite (ca de exemplu peroxidază și fosfatază alcalină sau peroxidază și glucoxidază). Această modalitate are avantajul rapidității deoarece unii dintre reactivi (de exemplu anticorpi primari) pot fi adăgați simultan.

Pe lângă metoda de colorare prin dezvoltare chimică, pentru a obține o intensitate comparabilă prin aceste două metode, sunt necesare concentrații crescute de anticorpi primari.

Pe lângă metoda de colorare chimică, pentru a obține o intensitate comparabilă prin aceste două metode, sunt necesare concentrații crescute de anticorpi primari.

19. Se adaugă substrat pentru enzima de detecție și se verifică la microscop apariția și intensitatea semnalului. Reacția este oprită prin spălare în 1xPBS.
20. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
21. Incubare cu al doilea anticorp primar în diluție optimă (diluție efectuată în 1xPBS + 1% albumină), peste noapte la 4°C.
22. A doua zi spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
23. Incubare cu al doilea anticorp secundar specific marcat direct cu fosfatază alcalină timp de 30 de minute.
24. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
25. Colorare cu un substrat pentru fosfataza alcalină (Fast Red).
26. Oprirea reacției în 1xPBS.
27. Spălare 5 minute în apă distilată.
28. Contrastare cu hematoxilina.
29. Spălare 20 minute în apă de la robinet (albăstrirea hematoxilinei).
30. Spălare 5 minute în apă distilată.
31. Acoperire în glicerol.

*Tehnica simultană* presupune efectuarea combinată a celor doi cicli anticorp primar - anticorp secundar - enzimă (incubarea țesuturilor cu un amestec de anticorpi primari și apoi de anticorpi secundari marcați), după care urmează dezvoltarea culorii pentru cele două sisteme separate de detecție.

Redăm mai jos protocolul unei marcări simultane complete pentru 2 anticorpi primari

1. Deparafinare 3x5 minute în băi de xilen.
2. Rehidratare prin trecere consecutivă câte 5 minute în etanol de concentrație descrescândă (100%, 90%, 70% și respectiv 50%).
3. Spălare 5 minute în apă distilată.
4. Efectuarea, dacă este cazul, a demascării antigenice.
5. Spălare 10 minute în apă de robinet.
6. Spălare 5 minute în apă distilată.
7. Blocarea peroxidazei endogene în 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diluată în apă distilată), pentru 30 de minute la temperatura camerei.
8. Spălare 5 minute în apă distilată.
9. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
10. Blocare în lapte degresat 1% pentru 30 de minute la temperatura camerei.
11. Incubare cu amestec format din anticorpul primar 1 (izotip iepure) și anticorpul primar 2 (izotip șoarece), ambii în diluțiile optimizate individual. Se incubează peste noapte la 4°C.
12. A doua zi spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
13. Incubare cu amestec de anticorpi secundari (de exemplu capră anti-șoarece conjugat cu HRP și capră anti- iepure conjugat cu AP), în diluții optime, 30 de minute.
14. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
15. Se adaugă substratul pentru AP
16. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.

17. Se adaugă substratul pentru AP
18. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
19. Spălare 5 minute în apă distilată
20. Contrastare cu hematoxilina.
21. Spălare 20 minute în apă de la robinet (albăstrirea hematoxilinei).
22. Spălare 5 minute în apă distilată
23. Acoperire în glicerol.

#### Observații:

- Dacă se execută o tehnică secvențială, este de preferat ca prima enzimă utilizată să fie HRP, întrucât DAB blochează în mod eficient complexul anticorp primar-anticorp secundar, prevenind astfel o posibilă reacție încrucișată a celei de-a doua perechi anticorp primar - anticorp secundar.
- Dacă se execută o tehnică simultană, este de preferat întâi dezvoltarea culorii pentru AP, întrucât apa oxigenată poate inactiva această enzimă.
- Dacă se folosește PBS ca tampon de spălare de-a lungul tuturor etapelor experimentului, este recomandat să se spele secțiunile într-o soluție Tris-HCl 100 mM, pH=8,5, înainte de detecția enzimatică a AP; cunoscut fiind efectul inhibitor al fosfatului asupra fosfatazei alcaline.
- Substraturile de detecție enzimatică se aleg astfel încât să existe un contrast maxim între cele două culori. După cum se observă în imaginea de mai jos, combinația NBT/BCIP - DAB nu este indicată datorită contrastului minim între cele două culori.

Enzimă	Cromogen	Proprietăți	Sensibilitate	Specificitate
Peroxidaza	3,3' diaminobenzidină tetrahidroclorid (DAB)	Maro, insolubil	++	++++
	DAB cu clorură de nichel	Negru - gri, insolubil	+++	+++
	DAB cu clorură de cobalt	Albastru, insolubil	+++	+++
Fosfataza alcalină	DAB cu sulfat de nichel amoniacal	Negru, insolubil	+++	+++
	3-amino-9-eticarbazol (AEC)	Roșu, solubil	++	++++
	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB)	Albastru, insolubil	+++	+++
Fosfataza alcalină	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfatat/nitroblue tetrazolium (NBT/BCIP)	Violet, solubil	+++++	++
	Fast Red	Roșu, solubil	+++	+++
	New Fuchsin	Roșu, solubil	+++	+++
p-galactozidaza	X-gal	Verde-albastru, solubil	++	++

#### Proprietățile principalelor substraturi enzimaticice folosite în imunohistochimie

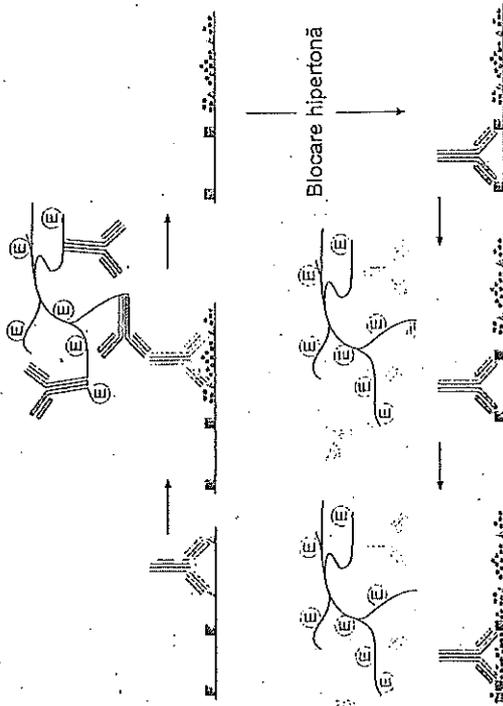
- Știindu-se faptul că AP precipită mai mult ca DAB, NBT-BCIP este o metodă mai puternică de detecție a antigenelor rare, dar mai puțin specifică.
- DAB și AEC oferă o dezvoltare mai precisă, cu un contrast mai bun comparativ cu AP.

În principiu se poate optima în funcție de necesitate orice combinație între metodele de amplificare descrise la tehnicile individuale. Trebuie avut în vedere însă întotdeauna ca anticorpii primari să fie dezvoltati în specii diferite și dacă este cazul se va bloca biotina folosită într-o primă etapă de amplificare pentru a nu fi detectată de exemplu de o streptavidină a amplificării pe anticorpii primari secund.

De asemenea, având în vedere înalta specificitate de subgrup a anticorpilor secundari existenți pe piață (de exemplu anti-șoarece IgG2a), și a multiplexelor sisteme enzimatice de detecție, se pot imagina secvențe de imunomarcare chimică triplă sau chiar cvadruplă.

În cazul în care nu sunt disponibili anticorpii primari de specii diferite, se poate utiliza un pas intermediar de fierbere în citrat pH =6 (aceiași protocol ca la demascarea antigenică), fiind dovedit că acest procedeu blochează interacțiunea celui de-al doilea anticorp secundar cu primul anticorp primar.

Nu putem încheia capitolul metodelor de imunodeteccție chimică multiplă fără a aminti de procedeu comercial En Vision Double Stain.



Legarea primului anticorp este urmată de adăugarea de anticorp secundar-polimer-enzimă și de dezvoltare. Produsul de colorare precipită insolubil iar complexul anticorpi-polimer-enzimă este decuplat prin blocarea într-o soluție hipertonă. Reacția continuă cu al doilea cuplu anticorp primar - anticorp secundar, acesta din urmă de asemenea cuplat cu polimer și o altă enzimă, după care urmează dezvoltarea celei de-a doua culori.

#### Principiul metodei comerciale En Vision Double Stain de dublă colorare

Acesta este o metodă secvențială ce se bazează pe doi cicluri anticorp primar / anticorp secundar - polimer - enzimă. În kit sunt disponibili doi secundari polimerizați cu două enzime diferite, astfel încât să se poată dezvoltarea specifică două

culori diferite. Datorită dimensiunilor stearice mari, ce ar împiedica vizualizarea antigenelor foarte apropiate, se folosește un mediu special de blocare hiperton care decuplează legăturile non-covalente ale complexului primului anticorp dar lasă pe loc substratul precipitat. După această blocare specială ciclul se reia cu al doilea anticorp primar, până la dezvoltarea unei a doua culori. În final, lama este acoperită cu un mediu pe bază de glicerol.

#### Detecția multiplă fluorescență

Tehnica de colorare imunofluorescență este metoda ideală de imunomarcare multiplă, procedeu fiind practic limitat numai de speciile de anticorpi primari disponibili. Este de asemenea metoda ideală de realizare a experimentelor de colocalizare a mai multor antigene în același compartiment celular sau subcelular. Dezvoltarea imuno-chimică are un caracter aditiv, culoarea dezvoltată în a doua etapă acoperind marcarea dezvoltată de prima enzimă, în cazul în care cele două se află la nivelul aceluiași structuri. Mai mult, colocalizarea precisă și sigură a doi sau mai mulți markeri necesită examinarea specimenului strict într-un singur plan, acesta fiind avantajul microscopiei confocale ce se poate efectua numai pe secțiuni imunocolorate prin tehnica fluorescență.

Metoda este cel mai frecvent folosită în laboratoarele de cercetare și mai puțin în scop diagnostic, datorită unor limitări relative, și anume dependența de un microscop echipat cu filtre specifice, precum și perioadei relativ mici de conservare a secțiilor astfel preparate.

Deși este posibilă atât o tehnică secvențială cât și o tehnică simultană, cel mai frecvent utilizată este tehnica simultană, procedeu fiind lipsit de inconveniențele dezvoltării chimice, ale prezenței biotinei sau enzimelor endogene.

Protocol de lucru pentru marcarea imunofluorescență simultană:

1. Debarafinare 3x5 minute în băi de xilen.
2. Rehidratare prin trecere consecutivă câte 5 minute în etanol de concentrație descrescândă (100%, 90%, 70% și respectiv 50%).
3. Spălare 5 minute în apă distilată.
4. Efectuarea, dacă este cazul, a demascării antigenice.
5. Spălare 10 minute în apă de robinet.
6. Spălare 5 minute în apă distilată.
7. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
8. Blocare în lapte degresat 1% pentru 50 de minute la temperatura camerei.
9. Incubare cu amestec format din anticorpii primari 1 (izotip iePURE) și anticorpii primari 2 (izotip șoarece), ambii în diluțiile optimizate individual. Se incubează peste noapte la 4°C.
10. A doua zi spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
11. Incubare cu amestec de anticorpi secundari (de exemplu capră anti-șoarece conjugat cu Fluorophorul 1 și capră anti-iePURE conjugat cu Fluorophorul 2), în diluții optime, 30 de minute.
12. Spălare 3x5 minute în soluție 1xPBS.
13. Spălare 5 minute în apă distilată

14. Contrastare cu DAPI
15. Spălare 5 minute în apă distilată
16. Acoperire în mediu de preservare a fluorescenței.

#### Observații:

- Se aleg anticorpii secundari specie-specifici pentru primari, în funcție de filtrele disponibile.
- Metoda este foarte sensibilă, marcarea fluorescentă în doi pași fiind echivalentă cu metoda chimică amplificată cu ABC. Dacă totuși nu este suficient, există streptavidină marcată fluorescent ce se poate folosi împreună cu un anticorp secundar biotilnat ca în cazul tehnicii ABC.
- Este de asemenea disponibilă și metoda de amplificare catalizată a semnalului în varianta fluorescentă, dar în acest caz autofluorescența țesutului devine un factor important de apariție a semnalului fals pozitiv.

## VI. CONTROLUL REACȚIILOR IHC

Pentru validarea rezultatelor imunocolorării, este obligatorie folosirea reactivilor și a țesuturilor control, fără de care interpretarea colorării imunohistochimice este lipsită de valoare. Rezultatele colorării sunt valide dacă se exclude orice interferență care determină o colorație nespecifică (controlul negativ nu se colorează) și dacă sensibilitatea tehnicii este garantată (țesutul control pozitiv este pozitiv, el conținând antigenul în studiu în concentrație redusă).

Conform standardelor internaționale, toate procedurile destinate diagnosticului *in vitro* trebuie monitorizate cu ajutorul reactivilor control și a speciemenelor control. Toate aceste controale ne indică dacă procedura a fost corect executată, dacă reactivii sunt în stare bună și, de asemenea, ne semnalează variațiile de la o reacție la alta sau de la un executant la altul.

#### Reactivii control

Primul obiectiv al utilizatorului este acela de a verifica dacă anticorpii utilizați în scop diagnostic sunt specifici pentru antigenele țintă. Înainte ca anticorpii primari să fie folosiți în scop diagnostic, acesta trebuie testat, urmărind eficiența sa asupra țesuturilor care conțin și a celor care nu conțin antigenul detectat de acesta. De asemenea, în cazul în care se utilizează anticorpi concentrați, aceștia vor fi testați în vederea stabilirii concentrației optime de lucru, pentru fiecare laborator în parte.

Pentru a verifica specificitatea unui anticorp primar policlonal, acesta se va înlocui cu fracțiunea imunoglobulinică sau cu imunoglobulina non-immună derivată de la aceeași specie, în acest fel diferențind colorarea nespecifică de cea specifică. În același scop, există și posibilitatea omisiunii anticorpului sau substituirii acestuia cu soluție diluantă, dar aceste metode nu sunt eficiente pentru controlul negativ.

Pentru un anticorp primar monoclonal, cel mai bun control negativ se obține utilizând un alt anticorp monoclonal, care este însă irelevant pentru

antigenul studiat (care imită toate fațetele anticorpului primar, cu excepția specificității), diluat bineînțeles în același tampon.

#### Țesuturile control

Colegiul American al Anatomopatologilor a recomandat ca fiecare lamă colorată cu un anticorp primar să fie însoțită de o lamă control pe care se omite adăugarea anticorpului și de câte o lamă control tisular extern pozitiv și respectiv negativ (1998), combinat cu controlul intern, care trebuie să existe pe secțiunea în studiu, dar unui anatomopatolog consideră aceste măsuri ca fiind excesive.

*Controlul tisular extern negativ* trebuie să nu conțină markerul țesuturilor cercetate și trebuie să fie prelucrat în condiții identice cu speciemenul la care urmează să se pună diagnosticul. Ca exemplu, controlul tisular extern negativ reprezentat de o secțiune din ficat normal este necesar atunci când se urmărește evidențierea pe speciemenul de diagnostic a virusului hepatitei B.

*Controlul tisular extern pozitiv* trebuie să conțină antigenul țintă și să fie procesat în aceeași manieră cu speciemenul pentru diagnostic. Acest control este absolut obligatoriu atunci când se testează un reactiv imunohistochimic nou. Același tip de țesut poate fi folosit drept control pozitiv extern pentru mai mulți anticorpi de studiat sau, pentru rapiditate, se pot utiliza secțiuni din blocuri ce conțin mai multe tipuri de țesuturi.

*Controlul intern* este considerat ideal pentru că elimină variabilele legate de fixare și prelucrarea anterioară colorării, el conținând antigenul țintă, atât în țesutul patologic ce trebuie diagnosticat, cât și în structurile normale din jur. În cazul în care acest control pozitiv intern este prezent, nu se mai impune efectuarea unui control pozitiv extern. *Batijora* a recomandat ca în scopul aprecierii controlului pozitiv intern să se efectueze colorația pentru vimentină care, fiind ubicuitară, trebuie să fie pozitivă pe toate preparatele. Clona V<sub>9</sub> a acestui anticorp recunoaște un epitop al vimentinei parțial susceptibil la fixarea în formalină, ca urmare, prezența reacției pozitive este un marker al fixării corecte. Cu ajutorul acestui anticorp putem tria secțiunile care merită să fie supuse unor alte reacții imunohistochimice.

## VI. PROBLEME TEHNICE ÎN IHC ȘI MODALITĂȚILE DE REZOLVARE

Procedura imunohistochimică este o metodă de diagnostic care se realizează secvențial, ea implicând selectarea cazurilor care vor fi imunocolorate, fixarea, procesarea și colorarea adecvată a țesuturilor. Interpretarea finală a rezultatelor se bazează pe evidențierea prezenței colorației, a patternului acesteia și a intensității produsului final de reacție ce ia naștere în urma unei reacții specifice antigen-anticorp.

În funcție de antigenul pe care vrem să-l detectăm (deci de anticorpii primari utilizați), pattern-ul de colorare poate fi: focal sau difuz, nuclear, citoplasmatic sau membranar. Când rezultatele obținute nu sunt cele așteptate, trebuie să identificăm, într-un mod sistematizat, momentul producerii unei greșeli de tehnică, analizând fiecare variabilă în parte.

Problemele tehnice ce pot apare le putem împărți în două categorii: cele care apar înaintea colorării și cele care sunt legate de imunocolorare. O parte dintre aceste probleme nu au fost suficient studiate, dar pentru cele mai multe s-a găsit deja o modalitate de rezolvare.

#### Probleme ce apar înaintea imunocolorării

Rezolvarea problemelor legate de fixarea țesuturilor a fost deja discutată.

Cităm în continuare alte probleme ce pot apare premergător imunocolorării:

- problemele date de deshidratarea inadecvată a țesuturilor pot fi eliminate prin prepararea regulată de soluții proaspete de alcool;
- pierderea aderenței secțiunilor la lame se datorează utilizării unor lame inadecvate (vezi tipul de adeziv necesar, în funcție de procedura ce urmează a fi aplicată);
- secționarea incorectă se însoțește de rupturi și falciuri ale secțiunilor, acestea ducând la o colorare neuniformă cu artefacte;
- probleme date de pretratamentul pentru demascarea antigenelor (care uneori nu pot fi evitate, datorită variabilelor implicate).

#### Probleme legate de imunocolorare

Pentru a recunoaște o imunocolorare inadecvată, trebuie studiate odată cu țesuturile testate și controalele pozitive colorate în același timp. Colorația inadecvată se poate încadra în unul din cele cinci modele de mai jos:

1. Absența imunocolorării, atât pe secțiunile studiate, cât și pe controlul pozitiv;
2. Absența colorației pe secțiunile studiate cu colorație pozitivă adecvată pe controlul pozitiv;
3. Colorație slabă pe secțiunile studiate cu colorație pozitivă adecvată pe controlul pozitiv;
4. Prezența colorației nespecifice pe secțiunile studiate, pe controlul pozitiv sau pe ambele;
5. Prezența artefactelor de colorație pe secțiunile studiate, pe controlul pozitiv sau pe ambele.

#### 1. Absența imunocolorării pe secțiunile studiate și pe controlul pozitiv

În acest caz, este necesar să verificăm dacă procedura a fost corect urmată și anume:

- dacă pașii au fost executați în ordinea corectă;
- dacă nu a fost omis un reactiv;
- dacă timpul de incubare a fost suficient;
- dacă diluția anticorpului primar a fost stabilită corect (în cazul în care lucrăm cu anticorpi concentrați);
- dacă reactivii nu sunt expirați;
- dacă tamponanele utilizate la spălarea sunt compatibile cu reactivii și dacă au pH-ul optim;

Problemele tehnice ce pot apare în timpul procedurii secțiunilor s-au uscat (se verifică dacă s-a adăugat o cantitate suficientă de reactivi pe secțiuni și dacă umiditatea de reactivi nu este prea scăzută);

decolorare dacă soluția de cromogen este recent preparată și dacă este corect preparată (se verifică prin adăugarea unei mici cantități de reactivi în cazul în care cromogenul este recent preparat și se urmărește dacă acesta își păstrează schimbă culoarea);

în cazul în care s-a utilizat AEC ca substrat cromogen, se verifică dacă deshidratarea și clarificarea s-a făcut corect și fără solvenți organici).

2. Absența colorației pe secțiunile studiate cu prezența colorației pozitive adecvate pe controlul pozitiv

în cazul în care controlul pozitiv prezintă o colorație pozitivă adecvată, el fiind luat în același mod ca și secțiunile testate; putem fi siguri că pașii procedurii au fost urmați corect și că toți reactivii au fost puși la punct; problemele se datorează precizării și urmării de fixare, procesare ulterioară și pretratamentului aplicat țesutului pe care-l studiem. Dacă se face un test de colorare în cazul în care se folosește formalina, durata fixării să nu depășească 48 de ore; procesarea prin includerea la parafină trebuie să se realizeze la o temperatură minimă de 56-60°C deoarece epitopii sensibili la temperatură vor fi distruși. De asemenea, toate cauzele enunțate la punctul anterior pot determina acest pattern de colorare.

3. Colorație slabă pe secțiunile studiate cu prezența colorației pozitive adecvate pe controlul pozitiv

în cazul în care controlul pozitiv prezintă o colorație pozitivă adecvată, el fiind luat în același mod ca și secțiunile testate; putem fi siguri că pașii procedurii au fost urmați corect și că toți reactivii au fost puși la punct; problemele se datorează precizării și urmării de fixare, procesare ulterioară și pretratamentului aplicat țesutului pe care-l studiem. Dacă se face un test de colorare în cazul în care se folosește formalina, durata fixării să nu depășească 48 de ore; procesarea prin includerea la parafină trebuie să se realizeze la o temperatură minimă de 56-60°C deoarece epitopii sensibili la temperatură vor fi distruși. De asemenea, toate cauzele enunțate la punctul anterior pot determina acest pattern de colorare.

4. Prezența colorației nespecifice pe secțiunile studiate, pe controlul pozitiv sau pe ambele

Cea mai bună confirmare a existenței colorației nespecifice este dată de prezența pozitivității controlului negativ.

Cauzele cele mai frecvente ale colorației nespecifice sunt reprezentate de:  
- legarea nespecifică a anticorpului de structurile tisulare încărcate electric (de exemplu, collagenul), care poate fi evitată prin blocare cu

- ajutorul serului neimun de la aceeași specie de animal ca și anticorpul secundar sau prin adăugarea de sare în tampon;
- prezența peroxidazei în țesutul studiat cu apariția colorației pozitive în hematii (pseudoperoxidază) și în leucocite (peroxidază endogenă), precum și prezența biotinei endogene (în special în ficat, rinichi), în acest din urmă caz putând schimba sistemul de detecție cu unul care nu conține avidină-biotină sau putem face o preincubare a țesuturilor cu avidină și biotină înainte de aplicarea anticorpului primar;
- fixarea slabă a țesuturilor;
- secțiunile prea groase;
- prezența zonelor de necroză (care de altfel vor fi excluse de la interpretare);
- deparafinarea incompletă, care duce la apariția colorației nespecifice până dincolo de marginile preparatului (de aceea, se recomandă ca analizarea la microscop a secțiunilor să înceapă cu zonele din imediata vecinătate a preparatului);
- scufundarea insuficientă a secțiunilor în tampoane sau utilizarea de tampoane contaminate;
- utilizarea de soluții de anticorp primar în concentrații prea mari sau a soluțiilor ce prezintă flocoane (produse prin congelarea și dezghețarea repetată a soluțiilor concentrate de anticorp primar);
- utilizarea unui cromogen insuficient dizolvat (se va filtra) sau într-o concentrație prea mare.

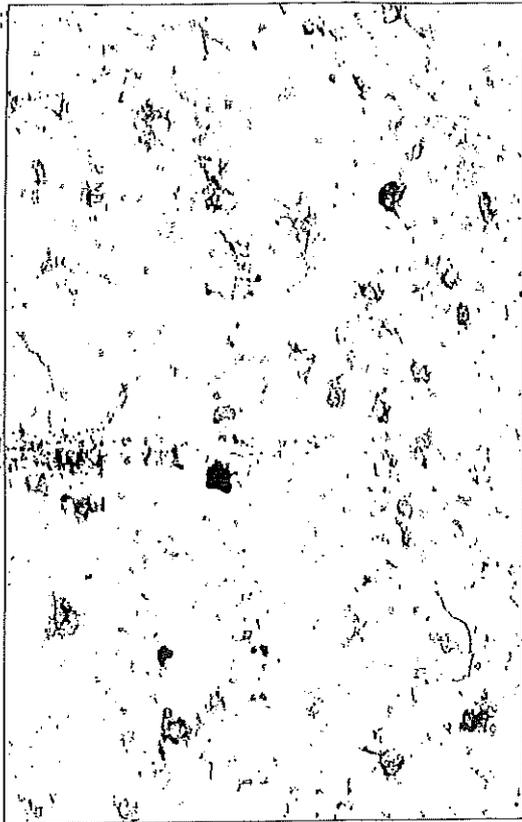
##### 5. Prezența artefactelor de colorație pe secțiunile studiate, pe controlul pozitiv sau pe ambele

Artefactele pot fi reprezentate de precipitate de cromogen sau de contracolorant nedizolvate, acestea putând fi înlăturate prin filtrare, înainte de utilizare. De asemenea, fixatorul B<sub>3</sub> poate determina uneori apariția de precipitate de culoare neagră, care însă pot fi evitate prin dezenkerizare corectă înainte de colorare.

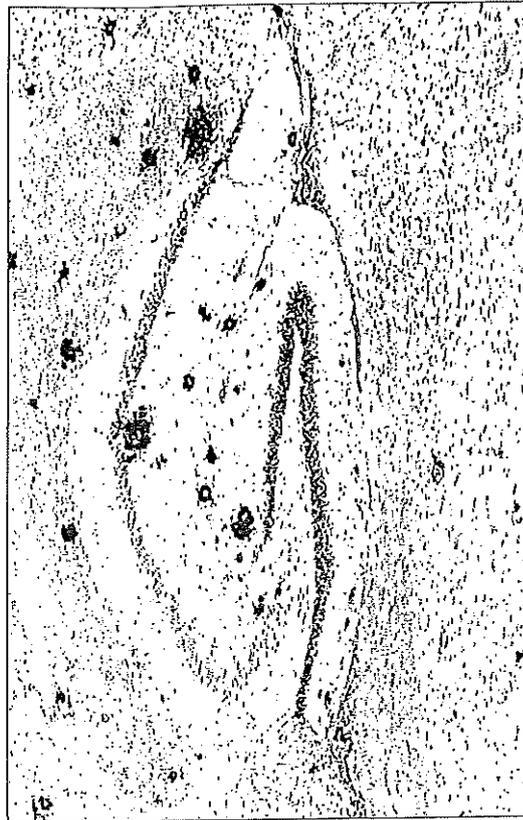
Pigmenții endogeni de culoare brună (melanina, hemosiderina) sunt ușor de identificați atunci când sunt prezenți și pe controlul negativ, altfel ei deosebindu-se cu ușurință prin folosirea unui cromogen cu culoare contrastantă (AEC-roșu).

Alteori artefactele pot fi produse de contaminarea microbiană a soluțiilor utilizate (a se verifica data de expirare a reactivilor).

Deși foarte numeroase, aceste probleme tehnice pot fi evitate dacă se realizează controlul calității reactivilor și dacă se folosesc simultan țesuturi control pozitiv și negativ.



Microgii în SNC - Imunomarcare pentru CD-68,  
Detecție cu DAB, x 200



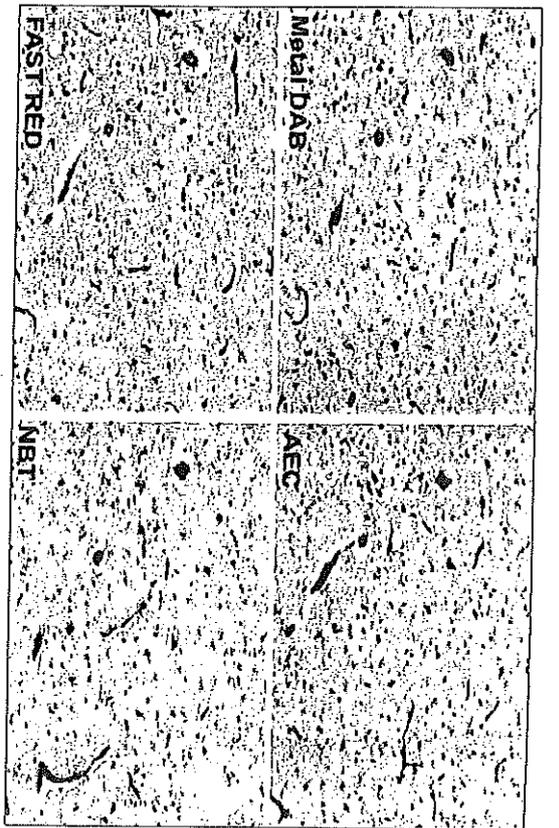
Secțiune sagitală printr-un hipocamp de șoarece transgenic depozitând mari  
cantități de amiloid  $\beta$  sub forma de plăci compacte. Imunomarcare pentru 4G8,  
Detecție cu AEC, Contrastare cu hematoxilina Weigert, x 100



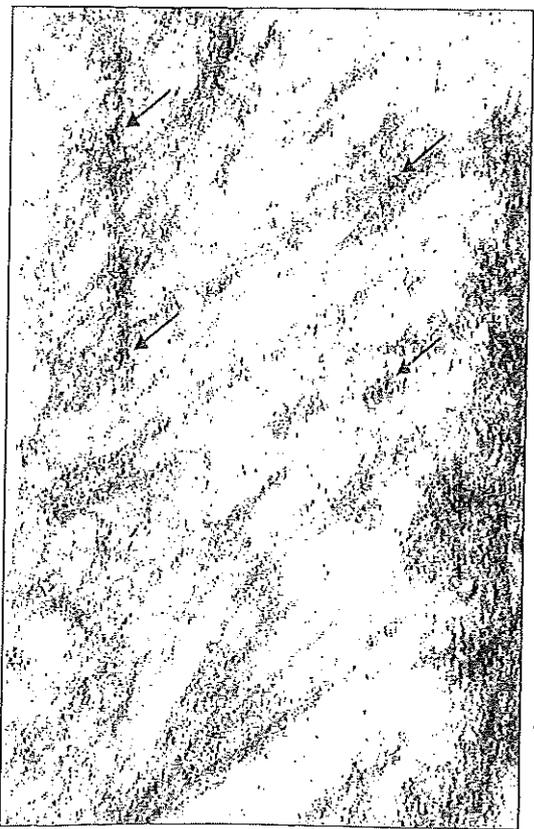
*Secțiune printr-un creier de soarece transgenic depozitând mari cantități de amiloid  $\beta$  sub forma de plăci compacte. Imunomarcare pentru 4G8 și colorare cu NBT/BCIP, x 200*



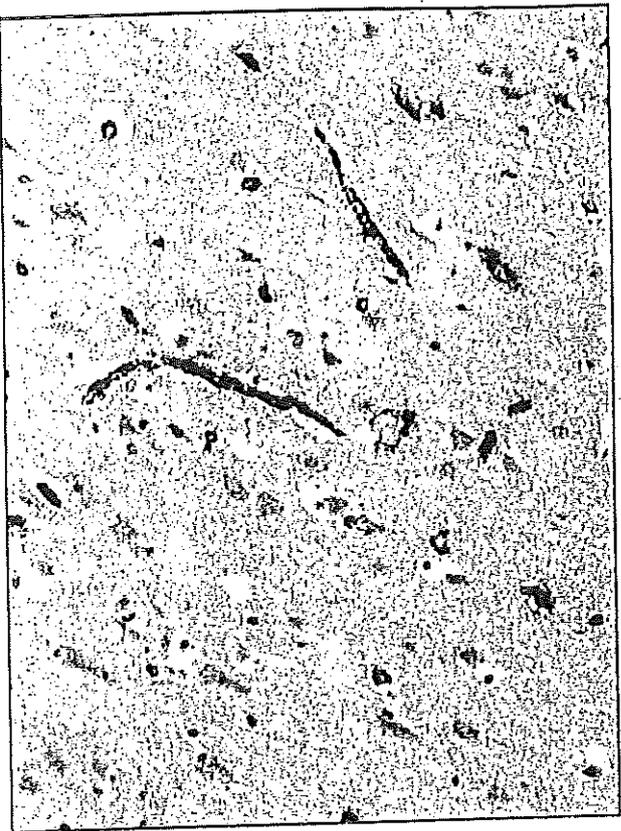
*Fragment din creierul unui pacient cu boală Alzheimer. Imunomarcare pentru amiloid (4G8), dezvoltat cu X-Gal și microglijă (CD68), dezvoltat cu DAB, x 200*



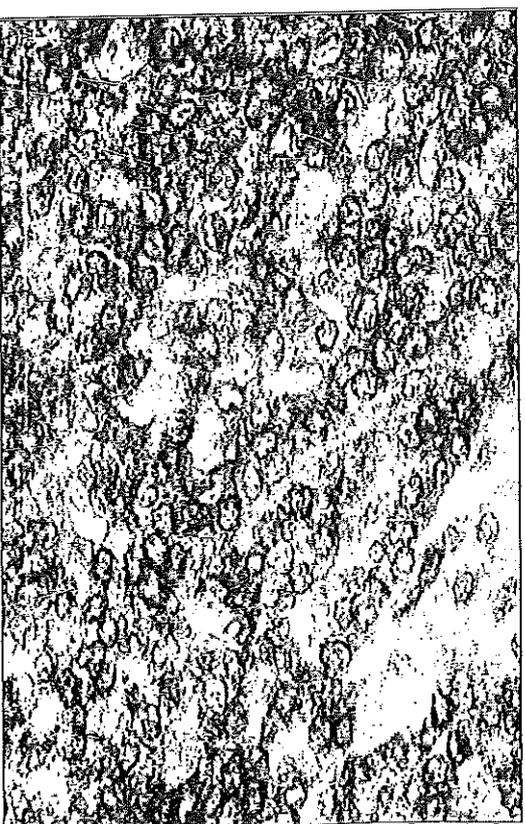
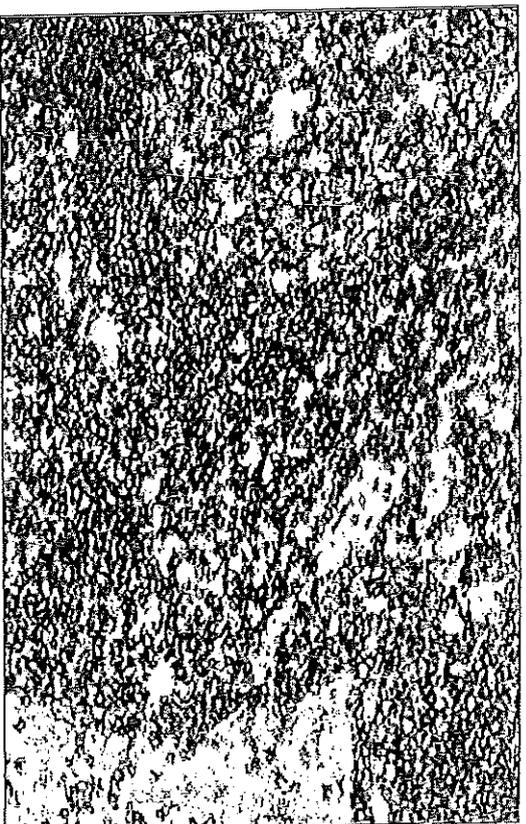
*Variante de imunodectecție chimică, x 200*



*Fibre de amiloid într-un caz de boală Alzheimer. Imunomarcare pentru 4G8 cu anticorpi secundari legați cu particule de aur de 10 nm.*



*Comparație a sistemului de detecție mediat de LSAB (sus) și a metodei CSA (fos).  
Imunomarcare pentru CD31, Detecție cu DAB, x 200*



*Tesut limfatic amigdalitar. Imunocolorare dublă secvențială completă  
Detecția populațiilor de limfocite T s-a făcut cu AP-Fast Red  
și a limfocitelor B cu HRP-DAB, x 200 (sus) și x 400 (jos)*

## CAPITOLUL XVI

### TEHNICI PENTRU STUDIUL APOPTOZEI

#### I. INTRODUCERE

Moartea celulară reprezintă o leziune celulară ireversibilă ce apare datorită suprimării tahnur activităților metabolice. Din punct de vedere morfologic, se pot descrie două aspecte: necroza și apoptoza. În timp ce necroza este dominată de activarea enzimelor litice sau denaturarea proteinelor, apoptoza este definită ca o formă morfologică a morții celulare, manifestată printr-o „împuținare” a celulei, datorată condensării cromatinei nucleare și fragmentării ADN-ului.

Apoptoza a fost prima dată descrisă de Kerr, Wyllie și Currie în 1972. Prin studii ulterioare s-a dovedit că aceasta este un proces care intervine atât în condiții fiziologice cât și patologice.

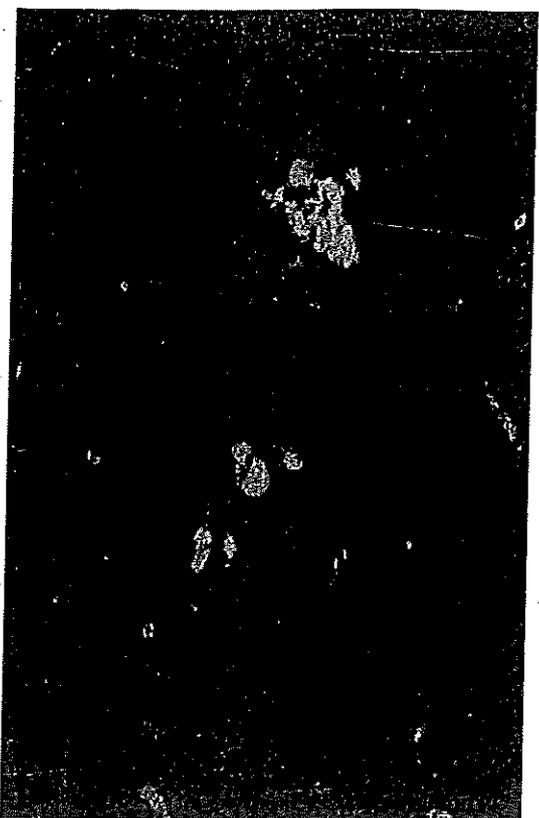
#### II. SEMNIFICAȚIA APOPTOZEI

Dezvoltarea și menținerea sistemelor biologice multicelulare depinde de echilibrul dintre formarea celulelor organismului și moartea acestora astfel încât să existe organismul ca un întreg. În organismul uman aproximativ 100.000 de celule sunt produse în fiecare secundă prin mitoză și tot atâtea mor prin apoptoză.

Apoptoza are o foarte importantă semnificație biologică atât prin participarea la procesele fiziologice ce au loc într-un organism cât și prin rolul său în apariția bolilor, cunoscut fiind faptul că disfuncțiile și irregularitățile mecanismelor apoptotice duc la apariția unor boli cum ar fi: cancer, boli autoimune, infecții virale, SIDA, boli ischemice.

Dezvoltare și morfogeneză	Homeostazie	Distrușterea anormală a celulelor
Separarea degețelor se realizează prin moartea tesutului mezenchimal interdigital	Un tipar al participării apoptozei în homeostazie este sistemul imun: milioane de limfocite B și T sunt produse în fiecare zi și majoritatea acestora sunt supuse apoptozei în timpul maturării	Celulele autoreactive ale sistemului imun sunt supuse apoptozei
Formarea sistemului de reproducere (ducher Müller și Wolf dispar prin apoptoză)	T sunt produse în fiecare zi și majoritatea acestora sunt supuse apoptozei în timpul maturării	Eliminarea celulelor infectate se realizează prin apoptoză
Apoptoza masivă intervine în dezvoltarea timpurie a sistemului nervos	menținerea unei constante a numărului final al celulelor mature.	Semnalizarea inadecvată în timpul ciclului celular duce de obicei către oprirea aceluia și apoptoză

*Exemple de moarte celulară fiziologică*



*Imunomarcare fluorescentă dublă, pentru antioid (4G8) și vase (CD31) (sus) și antioid fragment AB40 și AB42 (jos), x 400*

#### IV. MECANISMELE MOLECULARE ALE CĂILOR DE SEMNALIZARE ALE APOPTOZEI

##### Activarea căilor comune de semnalizare

Apoptoza este fin reglată și în același timp înalt eficientă prin acțiunea unor factori multipli. Componentele rețelei de semnalizare a apoptozei sunt codificate genetic și localizate în celula nucleată, fiind activate de stimuli ce induc moartea celulară. Acești factori trigger pot veni din interiorul celulei sau din exteriorul său așa cum se întâmplă în cazul legării receptorilor de pe suprafața celulei sau în cazul tratamentului citostatic sau iradiant ce produce distrugerea semnalelor pentru supraviețuire sau semnalizare contradictorie a ciclului celular.

Au fost descrise trei căi majore de inițiere a apoptozei: calea receptorilor TNF (pentru Factorii de Necroză Tumorală), calea mitocondrială și calea ce implică reticulul endoplasmic. Etapa finală, așa numită de execuție, este mediată de activarea unei familii de proteaze numite caspaze.

##### Caspazele ca inițiatori și executori principali ai apoptozei

Caspazele, cistein proteaze, sunt de importanță majoră în apoptoză, ele fiind activate în majoritatea cazurilor de moarte celulară prin apoptoză. Termenul de caspaze este derivat din *proteazele cistein-dependente, aspartat specifice*. Până acum s-au identificat 14 caspaze diferite, dintre care caspaza-11 și caspaza-12 există numai la șoareci. Caspaza-1 este de fapt ICE (Enzima de conversie a IL-1β) și alături de caspazele-4, -5, -11 și -12 este în principal implicată în maturarea proteolitică a citokinelor proinflamatorii, având importantă discutabilă pentru apoptoză. În schimb, experimentele pe animale au arătat rolul *proapoptotic* al caspazelor -3 și -9, în principal, dar și a celorlalte: -2, -6, -7, -8, -10.

În celulă, caspazele sunt sintetizate ca zimogene inactivă, numite procaspaze. În timpul maturării, procaspazele sunt despartite proteolitic în două subunități mici și mare. Caspaza activă este de fapt un heterodimer format din două subunități mici și două mari. Caspazele proapoptotice pot fi împărțite într-un grup inițiator (-2, -8, -9, -10) și un grup executor (-3, -6, -7). Caspazele executorie procesează numai prodomenii scurte, cele inițiatore procesând și prodomenii lungi ce conțin domenii efectoare ale morții (DED) pentru caspazele -8 și -10 sau domenii de recrutare a caspazelor pentru -9 și -2.

Prin prodomeniile lor, caspazele inițiatore sunt recrutate și activate ca semnale inductoare ale morții celulare fie ca răspuns la legarea receptorilor pentru apoptoză de pe suprafața celulei (căile extrinseci ale apoptozei) sau ca răspuns la semnale cu originea în interiorul celulei (căile intrinseci ale apoptozei).

##### Calea apoptotică mediată de receptorii TNF

Familia de receptori TNF (TNFR1, Fas, DR3, DR4 și DR5) se leagă prin domeniile lor citosolice („domenii ale morții” DD) cu proteine adaptor complementare cum sunt proteinele Fas asociate cu domenii DD (FADD), și care în schimb prin intermediul domeniilor efectoare (DED) activează caspazele inițiatore 8 și 10. Caspaza 8 clivează și activează caspazele efectoare 3, 6 sau 7 care la rândul lor activează o serie de endonucleaze sau distrug direct lamelle nucleare. Apare astfel fragmentarea ADN-ului genomic înainte de modificări ale

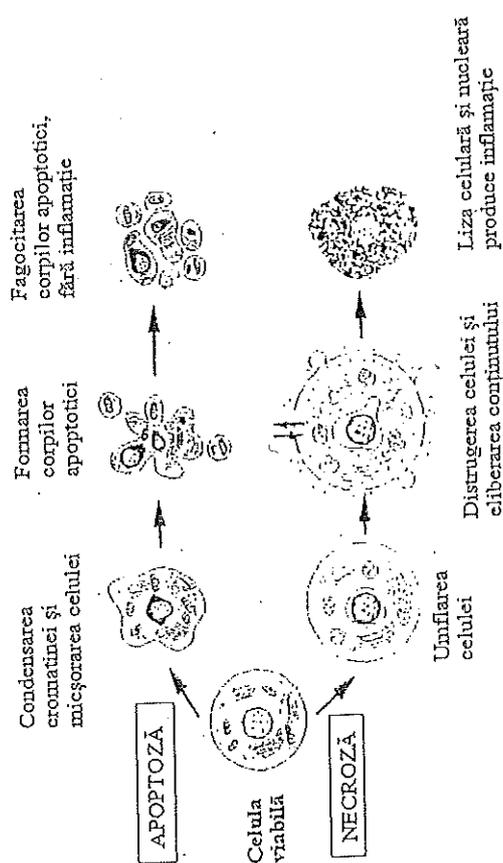
Apoptoza are un rol foarte important și în terapia unor afecțiuni, în special maligne prin inducerea acesteia sub acțiunea lentă unor stimuli care dacă ar acționa brutal ar fi nocivi (iradiere, citostatice, agent termic moderat).

#### III. MODIFICĂRI ULTRASTRUCTURALE ÎN APOPTOZĂ

Apoptoza survine în urma unei succesiuni de modificări:

- modificarea suprafeței celulare, care devine netedă prin alterarea structurilor
- micșorarea celulei și condensarea citoplasmei care devine densă
- condensarea cromatinei sub membrana nucleară în mase dense, de diferite forme și mărimi. Nucleul se poate rupe în două sau mai multe fragmente
- formarea de corpi apoptotici. Aceasta se realizează prin evaginarea citoplasmei, cu formarea unor proeminențe ce conțin sau nu fragmente nucleare și care se detașează ducând la fragmentarea progresivă a celulei în mai multe părți lipite de membrana celulei, numite corpi apoptotici. Aceștia sunt delimitați de o membrană, conțin citoplasmă condensată, organite celulare îngrămadite, cu sau fără fragmente nucleare.
- Fagocitoza celulelor apoptotice și a corpiilor apoptotici, realizată de macrofage și de celulele din vecinătate. Celulele adiacente proliferază și migrează pentru a substitui locul ocupat de celula apoptotică eliminată.

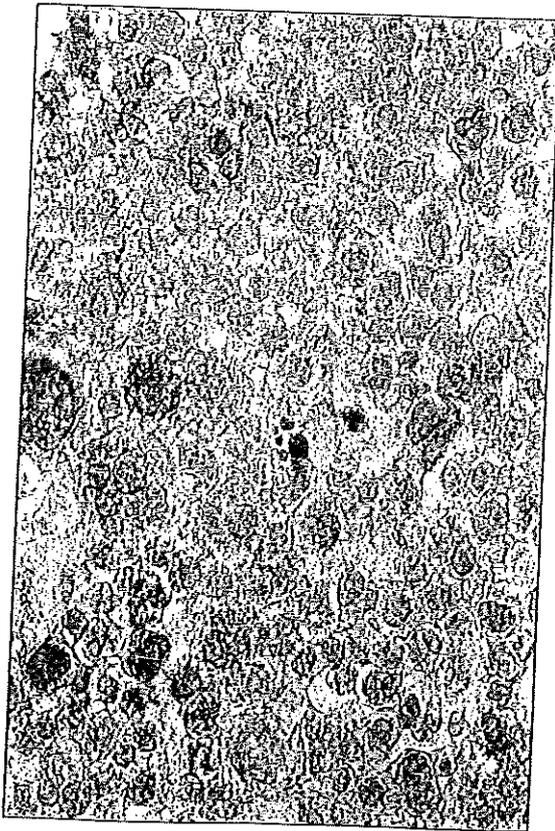
Deoarece condensarea citoplasmei și formarea corpiilor apoptotici sunt procese care evoluează rapid, fără să producă reacție inflamatorie, apoptoza poate să nu fie surprinsă histologic.



*Etapile principale ale morții celulare prin apoptoză și prin necroză (după Van Cruchten).*

3. Permeabilizare cu proteinază K (10-20 µg/ml în 10 mM Tris/HCl, pH 7.4-8). Incubare în soluția de lucru pentru 10 minute la temperatura camerei.  
Alternativ, permeabilizarea se poate efectua prin fierbere în citrat, pH 6.
4. Spălare cu PBS
5. Incubare cu un amestec format din nucleotide marcate cu fluoresceină și deoxinucleotidil transferaza terminală în concentrațiile stabilite de producător pentru 60 de minute la 37°C într-o incintă umedă.
6. Spălare cu PBS
7. Incubare cu anticorpul secundar anti-fluoresceină marcat cu peroxidază pentru 30 de minute la 37°C.
8. Spălare cu PBS
9. Developarea cu DAB.
10. Spălare cu apă distilată.
11. Contrastare cu hematoxiilină.
12. Deshidratare și clarificare
13. Acoperire cu DPX.

Rezultate:  
 - nucleii celulelor în apoptoză se colorează în maro  
 - nucleii celulelor normale se colorează în albastru



Reacția TUNEL. Melanom malin. Detecție cu DAB.

### 3 Metode bazate pe detectarea modificărilor membranare celulare

În cursul procesului de pierdere a polarității membranei celulare, reziduurile de fosfatidilserină sunt translocate de pe fața citoplasmică a membranei celulare către fața externă a membranei.

Annexina V este o proteină cu rol anticoagulant care se leagă preferențial de fosfolipidele polarizate negativ, cum este în cazul de față și fosfatidilserina. Sumetizarea membranei celulare, caracteristică pierderii energeticii celulare din apoptoză, duce la apariția unor cantități apreciabile de fosfatidilserină ce pot fi detectate de anexina marcată enzimatic sau fluorescent. Astfel, metoda implică un procedeu simplu și durează în jur de 10 minute.

### 4 Metode bazate pe identificarea activării caspazei 3

Așa cum a fost prezentat mai sus, inducerea apoptozei implică într-o etapă precoce activarea caspazelor de inițiere, printre care prima este caspaza 3. Aceasta se găsește sub forma de pro-caspaza 3 (32 kDa), iar enzima activată este un fragment de 18 kDa. Pentru acest fragment, caspaza 3 clivată, există numeroși anticorpi, procedeu de marcare fiind unul de imunohistochimie simplă. Metoda se pare că este superioară tehnicii TUNEL, prin simplitatea sa, dar și prin faptul că evită rezultatele fals pozitive care pot apărea pe materialul histologic depozitat pentru un timp îndelungat.



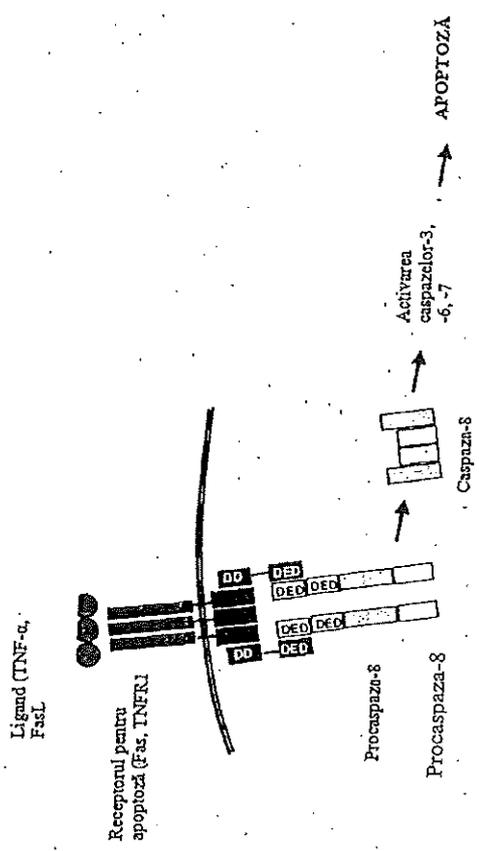
IHC pentru caspaza 3 identifică celulele apoptotice într-un centru germinativ amigdalian. Detecție cu DAB.

### 4 Alte metode bazate pe detectia unor elemente ale căilor apoptotice.

Pe măsură ce se identifică tot mai multe elemente ale căilor de semnalizare moleculară în apoptoză, apar procedee noi de detecție, multe fiind tehnici simple de imunohistochimie aplicată pentru noi anticorpi.

Oncoproteina Bcl-2 acționează ca factor inhibitor al apoptozei, ea putând fi detectată imunohistochimic cu marcaj citoplasmatic sau membranar intens mai ales la nivelul foliculilor neoplazici.

permeabilității membranei celulare (fragmentare ADN prelitică). Caspazele efectoare clivează ADN-ul în puncte localizate între unitățile nucleosomale (ADN linker) ducând la o fragmentare a ADN-ului mono- sau oligo-nucleosomală. Observată pe electroforeza în gel de agaroză, această fragmentare se traduce prin apariția unui tipar specific de benzi cu greutăți reprezentând lungimi de multipli de aproximativ 180 bp. Celulele care sunt capabile de acest mod direct de apoptoză caspază-dependentă au fost clasificate ca celule Tip I.



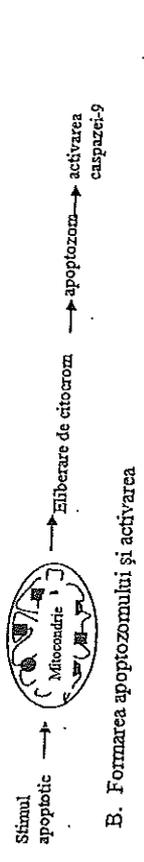
Activarea caspazelor receptor-mediată (calea mediată de receptorii TNF). Caspaza-8, inițiator, clivează și activează caspazele efectoare 3, 6 și 7 (după Gewies)

Calea apoptotică mitocondrială  
În cazul celulelor de Tip II, semnalul provenit de la receptorul activat nu duce la activarea cascadei caspazelor, în acest caz semnalul trebuind amplificat prin cai mitocondriale.

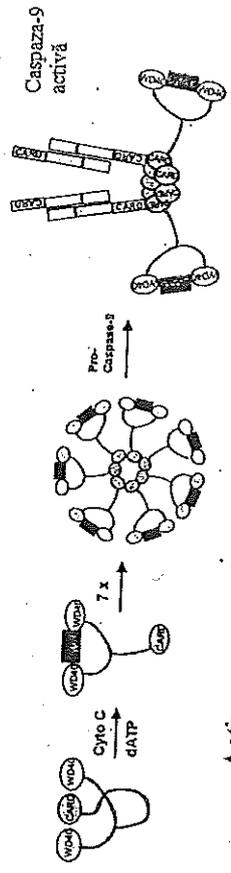
Mitocondriile eliberează în citosol în timpul apoptozei citocromul c, care apoi se leagă de domeniul APAF1 activator al caspazei 9. Caspaza 9 odată activată inițiază caspaza efectoare 3. Eliberarea citocromului c în citosol este modulată de familia de proteine anti-apoptotice BCL2, BCLXL și alți membri ai acestei familii sunt localizați pe membrana externă mitocondrială și previn în mod normal eliberarea citocromului c; proteinele pro-apoptotice BAX, BID și BIM induc în schimb eliberarea citocromului c. BAX, BID și BIM sunt inițial inactivi în citosol și trebuie să se transloce pe mitocondrii pentru a induce apoptoza, fie prin formarea directă de pori sau prin legarea de, și antagonizarea cu proteinele anti-apoptotice BCL2, BCLXL și BFL1. BID este activat prin clivarea de către caspaza 8 în timpul semnalației prin receptorii TNF, în timp ce BIM este activat după disocierea de către microtubuli. Citocromul c, prin intermediul Apaf-1 și dATP

duce la formarea apoptozomului, care la rândul său conduce la activarea procaspazei-9 în caspază-9, aceasta inițiind caspazele efectoare.

A. Calea mitocondrială a activării caspazei



B. Formarea apoptozomului și activarea



Activarea caspazei mitocondrial-mediată (cale extrinsecă). Prin activarea citocromului c și dATP proteina Apaf-1 adoptă o conformație heptamerică, apoptozomul. Moleculele de procaspază-9 se leagă în interiorul acestuia și sunt activate prin formarea de dimeri. Dimerii astfel formați activează caspazele efectoare (după Acehan)

Calea apoptotică mediată de reticulul endoplasmic

Se pare că și reticulul endoplasmic este implicat în apoptoza mediată de caspaza 12. Nu este clar încă în ce fel apare activarea caspazei 12. Oncum, este cunoscut faptul că o serie de factori anti-apoptotici (BCL2, BCLXL, MCL1 și E1b-19K) și pro-apoptotici ca BAX sunt localizați în reticulul endoplasmic.

## V. TEHNICI ȘI PROTOCOALE FOLOSITE PENTRU STUDIUL APOPTOZEI

Au fost imaginat numeroase metode pentru detectarea apoptozei, metode care se bazează pe evaluarea în special a integrității sistemelor de menținere a homeostaziei diferitelor compartimente celulare, a detectării fragmentării ADN-ului genomic sau a modificării balanței transcripționale a factorilor pro-/anti-apoptotici. Întrucât unele dintre aceste metode se adresează exclusiv celulelor pe medii de cultură, ne vom referi în cele ce urmează în special la metodele cu aplicabilitate pe țesuturile fixate și incluse în parafină.

### 1. Metode bazate pe modificările permeabilității membranelor

Alterarea permeabilității membranei celulare și eliberarea consecutivă a componentilor intracelulari în supernatant, sau internalizarea unor coloranți ce în mod normal sunt pompați activ spre spațiul extracelular, constituie baza majorității metodelor de studiu a morții celulare pe populații de celule în cultură.

Celulele sunt incubate cu molecule "reporter", ca de exemplu cu  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ , care se atașază stabil de majoritatea proteinelor intracelulare (etapa de pre-marcare). Apoi celulele sunt incubate cu un agent ce induce apoptoza, iar permeabilizarea membranei celulare va duce la eliberarea proteinelor marcate. Nivelul radioactivității în supernatant ne aduce apoi informații asupra gradului de afectare celulară.

Etichetarea se poate face și pentru moleculele de ADN care se eliberează în mediul de cultură post-lezional. În acest caz se folosesc nucleotide marcate precum [ $^3\text{H}$ ]-TdR și BrdU.

Când metabolismul celular este deficitar, celulele nu pot metaboliza sau exporta unele substanțe colorate, ca de exemplu sărurile de tetrazolium, ce se acumulează astfel intracelular putând fi explorate prin metode colorimetrice.

O metodă simplă directă, folosită în special în citometria de flux, este marcarea specifică a celulelor apoptotice cu anumiți markeri fluorescenți ca Propidium iodide sau Ethidium bromide.

În sfârșit, se poate urmări și eliberarea unor componente proprii în mediul extracelular, de exemplu prin monitorizarea prin metoda ELIZA a nivelului LDH în supernatantul celular.

Dezavantajul principal al tehnicii este că în stadiile inițiale ale leziunii factorii citotoxici sunt intracelular și pot să nu apară încă modificări de permeabilitate membranelor.

### 2. Metode bazate pe detectarea fragmentării ADN-ului

Au fost dezvoltate atât metode radioactive cât și non-radioactive de detecție și cuantificare a fragmentării ADN. În general, aceste metode se bazează pe detecția și/sau cuantificarea ADN-ului cu masă moleculară mică (LMW ADN) (aparte ca rezultat final al endonucleazelor) ce apare crescut în celulele apoptotice și a ADN-ului cu masă moleculară mare (HMW ADN) ce apare redus în celulele apoptotice.

Pentru identificarea direcției fragmentării moleculei de ADN se folosesc metode fluorescente sau enzimatice.

Metoda fluorescentă implică folosirea unor markeri precum Hoechst 33342, care nu leagă uniform de cromatina fragmentată.

Metoda cea mai folosită în prezent pentru detectarea celulelor apoptotice pe țesut este însă etichetarea enzimatică a întreruperii secvenței lanțului de ADN. După cum a fost discutat mai sus, sfărgătură ADN-ului genomic duce la apariția de mono- și oligo-somi (LMW ADN), dar și a unor întreruperi ADN monocatenare („nicks”). Aceste întreruperi mono- și bi-catenare ale moleculei de ADN pot fi detectate printr-o completare „in situ” a terminațiilor 3'-OH cu nucleotide marcate cu biotină, digoxigenină sau fluoresceină, știut fiind faptul că ADN-polimeraza poate începe polimerizarea numai în direcția 3' → 5', inițiatorul fiind deja prezent sub forma capătului 3'-OH liber. ∴

Enzimele folosite curent sunt ADN polimeraza (în situ nick translation) și terminal deoxynucleotidil transferaza (în situ end labeling).

ADN polimeraza I catalizează adăuga de nucleotide dependent de existența catenei complementare, atunci când cealaltă catenă este întreruptă. Teoretic această metodă ar trebui să detecteze nu numai celulele apoptotice, dar și fragmentările aleatorii ale ADN-ului ce se pot datoră activării endonucleazelor cu ocazia necrozei celulare.

Deoxinucleotidil transferaza terminală (TdT) este capabilă să completeze fragmente terminale de ADN, fără a avea nevoie de o matriță maror. Această metodă de detecție a fragmentelor terminale mai este cunoscută și sub numele TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling).

Metoda TUNEL este considerată a fi mai sensibilă și mai rapidă ca nick translation. În plus s-a arătat că marchează mai bine celulele apoptotice în stadiile inițiale, în vreme ce metoda nick translation identifică și celule necrotice.

Ca particularități tehnice, pentru ca enzimele exogene să poată acționa intracelular, membrana plasmatică trebuie permeabilizată înainte de reacția enzimatică. Pentru a evita pierderea LMW ADN din celulele permeabilizate, este necesară o fixare prealabilă a celulelor sau a țesuturilor, de preferat cu formaldehidă sau glutaraldehidă. Fixarea realizează legături încrucișate ale LMW ADN cu alți constituenți celulari, prevenind astfel extracția sa în etapa de permeabilizare.

Dacă terminațiile ADN 3' sunt completate cu nucleotide marcate cu biotină (biotină-dUTP) sau digoxigenină (DIG-dUTP), nucleotidele incorporate pot fi detectate cu un pas intermediar de amplificare cu streptavidină sau cu un anticorp anti-DIG marcat cu un fluorofor sau o enzimă (AP sau HRP).

Cu toate avantajele lor, metodele acestea se bazează pe detecția civării lanțului de ADN, deci pot exista rare situații când degradarea ADN-ului poate induce semnale false, cum ar fi de exemplu păstrarea îndelungată a lamelor secționare din țesutul inclus în blocuri de parafină.

**Protocol de lucru** (pentru secțiuni incluse în parafină):

1. Deparafinare și rehidratare.
2. Spălare în apă distilată și PBS 1M.

Survivina este o proteină inhibitorie a apoptozei, fiind exprimată în faza G2/M a ciclului celular. La începutul mitozei se realizează o legătură puternică între survivină și microtubuli. Ruperea acestei legături duce la pierderea funcției anti-apoptotice a survivinei, și creșterea activității caspazei-3, rezultând apoptoza în timpul mitozei. Această proteină este bine exprimată în tumori.

Anticorpul împotriva liganzilor Fas pot bloca în mod competitiv apoptoza indusă de un astfel de mecanism, pe liniile de celule testate sau pe animale de laborator.

Activitatea caspazelor duce și la clivarea unor componente ale citoscheletului, cu formarea unor fragmente noi, ce nu există în condiții normale. Pe acest principiu se bazează și identificarea celulelor apoptotice, dar nu și a celor necrotice cu ajutorul unui anticorp pentru regiunea C-terminală a unui fragment clivat al actinei de 32 KDa. Folosirea acestei metode în combinație cu imunohistochimia pentru caspaza 3 clivată duce la creșterea suplimentară a specificității acestor tehnici.

## CAPITOLUL XVII

### TEHNICI SPECIALE DE ÎMUNOHISTOCHEMIE ȘI BIOLOGIE MOLECULARĂ ÎN PATOLOGIA MAMARĂ

Cancerul mamar este o boală cu o mare variabilitate biologică și evoluție clinică variabilă. În afara factorilor clasici de prognostic folosiți în practica clinică, c-erb B2 sau Her-2/neu a devenit un important indicator pentru prognostic.

Supraexpresia proteinei și/sau amplificarea genică au fost identificate în 25 - 30% din carcinoamele mamar și ovariene invazive precum și în 40 - 60% din carcinoamele mamar intraductale, fiind asociate de obicei cu evoluția clinică nefavorabilă. Asocierea supraexpresiei și amplificării genei cu anumite caracteristici tumorale cum ar fi rata crescută de proliferare, conținutul redus sau absența receptorilor hormonalni, gradingul histologic mare (tumori slab diferențiate) și/sau aneuploidia, sugerează că gena Her-2/neu poate avea un rol important în inducerea caracterului invaziv al cancerului mamar fiind activată precoce în progresia bolii mamar maligne.

Protooncogena Her-2/neu este localizată pe brațul q (lung) al cromozomului 17 și codifică un receptor tirozinkinazic cu același nume care aparține familiei receptorilor factorilor de creștere la fel ca și receptorul factorului de creștere epidermal (EGFR). În aproximativ 90 - 95% din acestea, supraexpresia proteinei Her-2/neu este rezultatul direct al amplificării genei. Totodată, statusul Her-2/neu este un indicator prognostic valoros pentru răspunsul la terapia anti-estrogenică și la chimioterapia citotoxică.

Supraexpresia sa este un factor de prognostic nefavorabil la pacienții cu boală metastatică în limfoganglioni. Statusul Her-2/neu pozitiv este predictiv pentru răspunsul la terapia medicală convențională, dar puterea sa predictivă nu este încă bine stabilită și este în continuă cercetare.

Deoarece amplificarea și/sau supraexpresia proteinei HER-2/neu reprezintă atât un marker prognostic cât și predictiv pentru răspunsul la chimioterapia adjuvantă în cancerul mamar, cu cât acuratețea evaluării expresiei acestei proteine este mai mare, cu atât decizia terapeutică este mai eficientă.

Numeroase studii au arătat că amplificarea genei Her-2/neu a avut valoare independentă în predicția supraviețuirii generale și a intervalului liber de boală într-o analiză multivariată, la pacienți cu metastaze ganglionare. Aceste studii au arătat un răspuns semnificativ la chimioterapia adjuvantă la pacientele cu supraexpresia proteinei c-erbB-2. Astfel, asenănător receptorilor hormonalni, evidențierea supraexpresiei Her-2/neu și/sau a amplificării genei Her-2/neu ar putea deveni mai mult un test predictiv decât prognostic.

Odată cu introducerea trazuozumabului, un anticorp monoclonal „umanizat” împotriva antigenului Her-2/neu, pentru tratamentul cancerului mamar metastatic, a devenit esențială evaluarea corectă a statusului acestui antigen în determinarea managementului clinic al acestei boli.

Cele două metode utilizate cel mai frecvent în lume pentru evaluarea statusului Her-2/neu, și singurele aprobate de *Food and Drug Administration (FDA)*, sunt metoda imunohistochimică (pentru evidențierea supraexpresiei proteinei Her-2/neu) și hibridizarea in situ cu fluorescență (FISH) (pentru evidențierea amplificării genei Her-2/neu). Hibridizarea in situ cu cromogen (CISH) și hibridizarea in situ cu argint (SISH) sunt alte două metode care măsoară numărul copiilor genei Her-2/neu, dar deocamdată acestea nu sunt aprobate de FDA. Fiecare dintre aceste metode are atât avantaje cât și dezavantaje.

Metoda imunohistochimică este o metodă semicantitativă pentru evaluarea supraexpresiei proteinei Her-2/neu și poate fi folosită ca metodă complementară în selectarea pacienților pentru tratamentul cu trasuzumab. Supraexpresia proteică este considerată prezentă atunci când, prin marcat imunohistochimic se evidențiază o culoare maronie intensă și completă (circumferențială) a membranei celulelor maligne de la nivelul componentei invazive a tumorii mamar.

Pentru cuantificarea imunomarcajului, se utilizează o scală de la 0 la 3+ cu următoarea semnificație:

- 0 - absența imunomarcajului, membrana la nivelul celulelor maligne;
- 1+ - imunomarcaj membrana incomplet și de intensitate slabă în mai puțin de 10% din celulele tumorale;
- 2+ - imunomarcaj incomplet și de intensitate moderată în peste 10% din celulele tumorale;
- 3+ - imunomarcaj membrana intens și complet în peste 10% din celulele tumorale.

Se consideră că proteina c-erb B2 nu este supraexprimată atunci când scorul este 0 și 1+ (negativ) și este supraexprimată în cazul când scorul este 2+ și 3+ (pozitiv). Diferite studii au arătat că supraexpresia proteinei Her-2/neu este strâns corelată cu amplificarea genei în tumorile cu scor 3+, dar nu și în cele cu scor 2+.

Metoda imunohistochimică prezintă totuși unele dezavantaje privind acuratețea ei, și anume: variabilitatea rezultatelor testului este determinată de faptul că proteina-receptor poate fi distrusă de folosirea fixatorilor concentrați și depozitarea fragmentului de țesut în parafină sau de folosirea diferitelor tipuri de anticorpi inclusiv cei produși în diverse laboratoare; interpretarea este subiectivă și necesită un nivel ridicat de experiență și îndemnare.

Deoarece există o mare variabilitate în evaluarea scorului pentru această proteină, s-a considerat că pentru confirmarea supraexprimării proteice este necesară efectuarea unui alt test mai sensibil și mai specific. Ca urmare, a apărut metoda hibridizării in situ cu fluorescență ca o metodă citogenetică utilizată pentru depistarea și localizarea prezenței sau absenței secvențelor ADN specifice pe cromozomi, cu ajutorul probelor fluorescente care pot fi vizualizate cu un microscop cu fluorescență.

## I. HIBRIDIZAREA IN SITU CU FLUORESCENȚĂ (FISH)

Metoda hibridizării in situ cu fluorescență s-a dovedit a fi o metodă mai bună decât metoda imunohistochimică pentru cuantificarea amplificării genei c-erbB2 la nivelul liniilor celulare din carcinomul mamar uman, aflate atât în metafază cât și în interfază.

FISH este o metodă non-radioactivă, care necesită puțin material tisular tumoral, iar folosirea ei înlătură multe din limitele tehnice și de interpretare inerente altor metode de evaluare. Pauletti și colaboratorii [2000] au demonstrat că FISH oferă indicația cea mai de încredere și cu acuratețea cea mai mare a amplificării geneice pe material tisular fixat în formol și inclus la parafină. În cadrul acestei metode se utilizează o nucleotidă anti-Her-2/neu specifică care a fost cuplată de un compus fluorescent sau de digoxigenină. Digoxigenina este depistată apoi prin imunofluorescență cu ajutorul unui anticorp marcat fluorescent anti-digoxigenină. Se pot folosi însă direct, și sunt mai bune, oligonucleotidele marcate fluorescent. Astfel, se evaluează numărul genelor Her-2/neu într-o celulă care apar ca semnale fluorescente ce pot fi numărate.

Curent, există două kit-uri pentru FISH folosite pentru evaluarea amplificării genei Her-2/neu. Unul este kitul *Path Vision (Vysis)*, aprobat de Food and Drug Administration, care constă din două probe de ADN: Her-2/neu orange marcată cu fluorofor și CEP 17 verde marcată, de asemenea, cu fluorofor) ce se leagă de gena Her-2/neu și, respectiv, de centrul cromozomului 17. Proba de ADN pentru cromozomul 17 este utilizată ca un control intern pentru a diferenția disomia de aneusomie. Pentru cuantificarea amplificării genei Her-2/neu, în timp ce morfologia țesutului se menține nemodificată, se numără direct în cel puțin 20 nuclei tumoralii atât semnalele fluorescente pentru gena Her-2 cât și cele pentru Chr 17, iar rezultatul testului constă în raportul dintre cele două semnale.

Amplificarea genei Her-2/neu este definită ca un raport mai mare sau egal cu 2, dintre numărul de copii pentru gena Her-2/neu și cele pentru cromozomul 17. Determinarea acestui raport este importantă în diferențierea polisomiei cromozomului 17 de adevărata amplificare a genei Her-2/neu.

Cel de-al doilea kit pentru FISH este *Ventana INFORM Her-2 test (Ventana)* care utilizează doar proba pentru Her-2/neu și definește amplificarea genei ca numărul absolut de copii ale genei Her-2/neu pe nucleu tumoral care trebuie să fie mai mare de 4.

Așadar, cel mai bun mod de a depista supraexpresia și/sau amplificarea Her-2/neu ar trebui să fie efectuarea atât a imunomarcajului cât și a testului FISH, combinație care ar da rezultate cu o maximă sensibilitate și specificitate. Mai mult, FISH ar putea fi considerat ca un control de calitate pentru imunohistochimie și vice-versa.

Avantajele metodei FISH constau în: evaluarea mai obiectivă a genei Her-2/neu deoarece materialul genetic este foarte stabil nefiind influențat de fixarea țesutului pentru includerea la parafină; este rapidă și neradioactivă și necesită o cantitate foarte mică de material tumoral. Totodată, ea s-a dovedit a fi o tehnică în care sunt înlăturate multe din limitele tehnice și interpretative inerente

altor metode. De aceea, hibridizarea in situ s-a dovedit a fi o metodă sensibilă și specifică pentru cuantificarea amplificării genei care codifică proteina HER-2/neu, în liniile celulare provenite de la un carcinom mamar, atât la celulele în metafază cât și la cele în interfază.

Rezultatele acestei metode pot fi folosite ca date adjuvante datelor clinice și histopatologice utilizate curent ca factori prognostici în stadiul II de boală, la pacienții cu cancer mamar. De asemenea, ele sunt foarte importante ca factor predictiv al intervalului liber de boală și al supraviețuirii generale la aceste pacienți tratați cu chimioterapie adjuvantă.

Pentru a evita denaturarea lui și compromiterea rezultatelor testului FISH, kitul PathVysion trebuie păstrat la întuneric, în mediu uscat și la temperatura de 20°C, cu excepția soluțiilor tampon care pot fi păstrate la temperatura camerei; el cuprinde:

1. probe de ADN fluorescente: *proba HER-2/neu-Spectrum Orange* conține secvențe specifice de ADN pentru locusul genei umane HER-2/neu și hibridizează la regiunea 17q11.2-q12 a cromozomului 17 uman; *proba CEP 17 (Chromosome Enumeration Probe 17)/SpectrumGreen* conține ADN alpha-satelit care hibridizează în locusul D17Z1 (regiunea centromerică a cromozomului 17) (vezi figura nr.1). Kitul conține aceste probe predenaturate și premixate în soluție tampon de hibridizare.
2. substanța DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) pentru contracolorare, pulbere de clorură de sodiu și citrat de sodiu pentru soluția tampon (sol.SSC 20X) folosită înainte de hibridizare.
3. soluția tampon NP-40 pentru spălarea secțiunilor după hibridizare.

#### Tehnica hibridizării *in situ* cu fluorescență

După includerea la parafină și secționarea fragmentelor tisulare la microtom, la 3 microni, acestea sunt lăsate la termostat, la 56°, peste noapte. Apoi se trece la efectuarea propriuzisă a metodei FISH prin parcurgerea următoarelor etape de bază, și anume:

#### a. DEPARAFINAREA:

1. Deparafinarea secțiunilor în 3 băi succesive de xilen, la temperatura camerei, timp de 10 minute în fiecare baie.
2. Deshidratare în 2 băi de alcool absolut, câte 5 minute în fiecare.
3. Introducerea preparatelor într-o baie umedă, la 45°-50°, timp de 2-5 minute.

#### b. PRETRATAREA:

1. Introducerea secțiunilor într-o soluție de acid clorhidric 0.2N, timp de 20 minute.
2. Spălare în apă distilată, 3 minute.
3. Spălare în soluție tampon 2X SSC, timp de 3 minute. Incubarea secțiunilor cu soluția pentru pretratament timp de 30 minute, la 80°C.

4. Spălare în apă distilată, 1 minut.

5. Spălare în soluție tampon pentru pretratament (sol. 2X SSC), 2 băi, câte 5 minute în fiecare.

#### c. DIGESTIA CU PROTEAZĂ

1. Secțiunile se scot din soluția tampon și se usucă bine, ștergându-se marginea acestora cu hârtie absorbantă.
2. Introducerea lamelor în soluție de protează, la 37°C, timp de 10 minute.
3. Spălare în soluție 2X SSC, 2 băi, 5 minute în fiecare.
4. Uscarea secțiunilor timp de 2-5 minute la termostat, la 45°-50°C.

#### d. HIBRIDIZAREA

1. După preîncălzirea probei de ADN la temperatura camerei și agitarea acesteia pentru omogenizare, se pun 10 μl din probă pe fiecare secțiune marcată.
2. Secțiunile se acoperă cu o lamelă, iar marginile acesteia se etanșează cu o pastă specială (rubber cement).
3. Incubare la 72°C, timp de 2 minute.
4. Incubarea secțiunilor peste noapte, la 37°C, în cameră umedă preîncălzită.

#### e. SPĂLAREA POST-HIBRIDIZARE

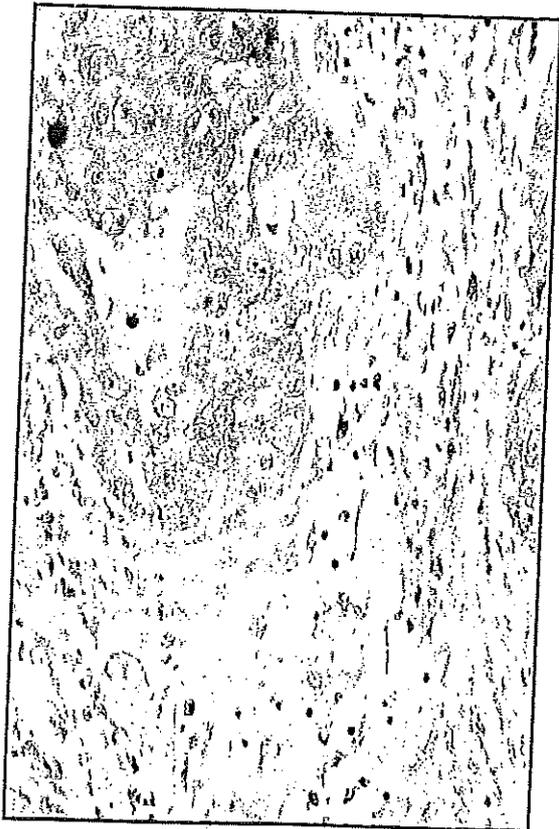
1. După hibridizare, se spală secțiunile în 2 băi cu soluție tampon post-hibridizare preîncălzită la 72°C.
2. Se îndepărtează lamela ușor cu ajutorul unei lame de bisturiu, după trecerea prealabilă a lamelor de sticlă printr-o soluție tampon post-hibridizare la temperatura camerei.
3. Îndepărtarea excesului de probă prin spălarea abundentă în soluție tampon post-hibridizare preîncălzită la 72°C.
4. Scoaterea secțiunilor din sol.tampon și uscare la întuneric.

#### f. CONTRACOLORAREA SI DEPOZITAREA LAMELOR

1. Se aplică pe fiecare secțiune câte 10 μl din substanța DAPI de contracolorare și apoi se așează lamela.
2. Depozitare la întuneric, la -20°C, înainte de examinarea la microscopul cu fluorescență.

#### INTERPRETARE

Pentru fiecare caz în parte se aleg cele mai reprezentative 4 ari tumorale diferite (în care nucleii tumorali nu sunt suprapuși, iar semnalele sunt distincte) și se numără semnalele roșii-portocalii și verzi din câte 15 nucleii în fiecare arie, conform unui ghid standardizat. În final, se face raportul dintre numărul total al semnalelor fluorescente pentru HER-2/neu și cele pentru CEP 17. Raportul mai mare de 2 reprezintă amplificarea genei Her-2/neu. Unii autori au recomandat ca valoarea raportului cuprinsă între 2 și 4 să fie considerată o amplificare ușoară a genei pentru HER-2, iar peste 5, amplificare crescută.



*Carcinom ductal invaziv – imunomarcaj 1+ pentru c-erb B2,  
tehnica LSAB, x 200.*

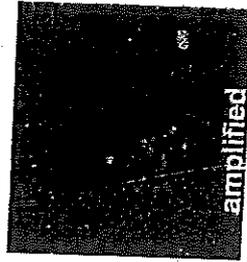
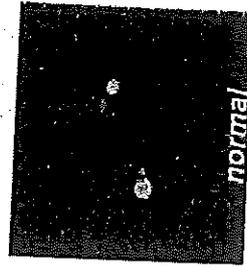
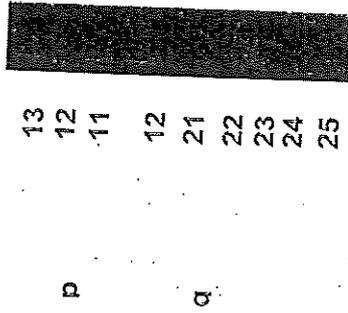


*Carcinom ductal invaziv – imunomarcaj 2+ pentru c-erb B2,  
tehnica LSAB, x 200*



*Carcinom ductal invaziv – imunomarcaj 3+ pentru c-erb B2,  
tehnica LSAB, x 200*

### Chromosome 17



*Reprezentarea locusurilor din cromozomul 17 folosite pentru hibridizare*

## II. HIBRIDIZAREA *IN SITU* CU CROMOGEN (CISH)

Hibridizarea *in situ* cu cromogen (CISH) permite detectarea amplificării genice, deleției, translocațiilor cromozomiale și identificarea cromozomilor (vezi anexa 1), cu ajutorul unui sistem de detecție convențional cu cromogen (de obicei HRP/DAB). Metoda se bazează pe capacitatea acizilor nucleici marcați cu biotina sau digoxigenina (sonda) să se lege (să hibridizeze) *in situ* de secvențele complementare ale acizilor nucleici (ARNm, ARNt sau acizii nucleici ai ADN-ului după denaturare) din proba investigată. Semnalul este apoi vizualizat cu ajutorul diaminobenzidinei (sau a altui cromogen) ca depozit brun la locul reacției antigen/anticorp/complex enzimatic.

Inițial tehnica CISH a fost utilizată pentru detectarea infecțiilor virale, ARN-ului mesager al imunoglobulinelor și centromerilor cromozomiali datorită bogăției secvențelor ce puteau fi detectate prin această metodă. În patologia tumorală aplicarea ei a fost limitată datorită semnalului nespecific apărut prin utilizarea sondelor convenționale folosite de tehnicile hibridizare *in situ*. Pentru a depăși această problemă s-au obținut sonde ADN utilizând o nouă metodă SPT (Subtracted Probe Technology) care extrage cantitativ secvențele repetitive de ADN din probă obținându-se sonde cu specificitate înaltă.

### Aplicațiile hibridizării *in situ* cu cromogen

Hibridizarea *in situ* cu cromogen și-a demonstrat deja utilitatea în stabilirea statusului genic pentru HER2, c-Myc, EGFR, NF2, TopoII alfa, N-Myc, Cyclin D1.

Amplificarea genei HER2 este cea mai frecventă alterare genetică întâlnită în carcinoamele mamare. Oncogena HER2 este localizată pe cromozomul 17 și codifică o proteină transmembranară de 185 de kDa. Amplificarea genei sau supraexpresia proteică au fost observate în 20-30% din carcinoamele mamare. Amplificarea este asociată cu un prognostic nefavorabil, recurențe locale și o perioadă de supraviețuire redusă. Stabilirea statusului genic este important și ca factor predictiv al răspunsului la terapia cu Herceptin. Deoarece s-a demonstrat faptul că terapia cu Herceptin este eficientă numai la pacienții cu amplificarea genică și/sau supraexpresie proteică, a devenit necesară determinarea cu acuratețe a statusului HER2 atât genic cât și proteic.

TopoII alfa este o enzimă cheie în replicarea ADN-ului și este ținta inhibitorilor topoizomerazei II, precum antraciclinele utilizate frecvent în terapia carcinomului mamar. Gena TopoII alfa este localizată pe brațul lung al cromozomului 17, iar amplificarea sau deleția sa au fost evidențiate în carcinoamele mamare cu amplificarea a genei HER2. Studii clinice au demonstrat faptul că amplificarea genei TopoII alfa este un factor predictiv mai specific pentru răspunsul terapeutic la inhibitorii ai enzimei TopoII alfa în carcinomul mamar, decât expresia proteică determinată imunohistochimic.

În diverse tipuri de carcinoame s-a observat o alterare a statusului genic cât și proteic al EGFR. Amplificarea genei EGFR este o frecvent întâlnită în glioamele maligne și se asociază cu un grad crescut de malignitate, prognostic nefavorabil și rezistență la radioterapie și chimioterapie. Încă nu se știe dacă amplificarea genică sau supraexpresia proteică reprezintă un factor prognostic independent la acești pacienți. Studiile recente au demonstrat faptul că amplificarea genică se însoțește de supraexpresia proteinei EGFR dar supraexpresia proteică nu este însoțită întotdeauna de amplificarea genei EGFR.

Gena Ciclului D1 localizată pe cromozomul 11q13 este un important regulator al ciclului celular. Amplificarea genei a fost întâlnită în 10-24% din carcinoamele mamare în funcție de metodele de detecție utilizate fiind asociată cu metastaze ganglionare și prognostic nefavorabil. Amplificarea genică este asociată cu supraexpresia ciclului D1, iar supraexpresia ciclului D1 este întâlnită în 50% din carcinoamele mamare în special la tumorile estrogen receptor pozitive. Supraexpresia ciclului D1 fără amplificarea genică a fost asociată cu timp de supraviețuire mai mare. Din acest motiv amplificarea genică divide grupul tumorilor ce prezintă supraexpresia ciclului D1 în două grupuri cu prognostic foarte diferit.

Proteinele MYC induc proliferarea și inhibă diferențierea în anumite celule.

Translocațiile genei C-Myc se întâlnesc în limfomul Burkitt, limfomul difuz cu celule B, limfomul folicular, leucemia acută limfoblastică cu celule T și limfoamele cu celule T. Sonda produsă de firma Zymed poate detecta toate translocațiile posibile ale acestei gene.

Gena N-Myc este localizată pe cromozomul 2p24.1. Amplificarea genei este întâlnită într-un număr mare de tumori: neuroblastoame, retinoblastoame, astrocitoame, glioame, și carcinoame pulmonare cu celule mici. În cazul neuroblastoamelor amplificarea acesteia este întâlnită în 25 % din cazuri. S-a sugerat că în cazul neuroblastoamelor decizia terapeutică să ia în considerare numărul de copii ale genei N-Myc atunci când există un prognostic nefavorabil.

NF2 este o gena tumorală supresoare situată pe cromozomul 22q12. Inactivarea genei NF2 a fost întâlnită în neurofibromatoza II sporadică sau familială.

### PROCEDURA GENERALĂ A HIBRIDIZĂRII *IN SITU* CU CROMOGEN (CISH) PENTRU SECȚIUNILE TISULARE FIXATE ÎN FORMOL ȘI INCLUSE LA PARAFINĂ ȘI PENTRU PREPARATELE CITOLOGICE DIN MĂDUVĂ OȘOASĂ/SÂNGE

Materiale necesare (altele decât cele care se livrează cu Kit-ul CISH):

1. lame Superfrost Plus
2. xylen
3. alcool etilic 70%, 85%, 95%, 100%
4. apă distilată sau deionizată
5. seringă de 5 ml, silicon (rubber cement) și ac de seringă

6. 0.5xSSC (saline sodium citrate buffer, 0,015M citrat de sodiu și 0,15M NaCl)
7. 1xPBS
8. 1xPBS/Tween 20
9. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
10. hematxilimă Mayer
11. timer
12. plită
13. oală sub presiune cu afișaj al presiunii sau cuptor cu microunde
14. Coplin jar sau vaschete de plastic
15. suport de lame
16. camera umedă
17. hârtie de filtru
18. hibridizator, termostațat la 37°C
19. micropipete și vârfuri de micropipete
20. baie de apă
21. lamele
22. mediu de montare
23. microscop optic cu obiective de 10x, 20x, 40x și 100x.

#### Procedura de lucru

### I. Pretratamentul secțiunilor înainte de hibridizare:

- A. Pentru țesuturile incluse la parafină:
  - se incubează lamele la 60°C pentru 2 ore sau peste noapte în termostaț;
  - se echilibrează Tissue Heat Pretreatment Solution și pepsina (Spot-Light) sau Tissue Pretreatment Kit (Zymed) la temperatura camerei;
  - se deparafinează secțiunile în două băi de xilen, 5 min fiecare;
  - 3 băi alcool absolut, 3 min fiecare;
  - 3 băi cu apă distilată, 2 min fiecare.

Notă: dacă următorul pas nu se poate efectua imediat se pot usca lamele

imediat după băile de alcool.

- se incubează lamele pentru 15 min cu CISH Tissue Heat Pretreatment Solution la 100°C (sau cel puțin 98°C). Acest lucru se poate efectua în urnatoarele modalități:

- utilizând o plită: se fierbe CISH Tissue Heat Pretreatment Solution, se introduc secțiunile pentru 15 minute în soluția fierbinte și se acoperă cu o folie de aluminiu;
- utilizând o oală sub presiune cu indicator de presiune: se

introduc lamele într-o vaschetă al cărei capac se înfiltrează slab și se lasă 10 minute după care se deschide capacul când presiunea a scăzut la nivelul care permite deschiderea oalei conform instrucțiunilor de folosire;

- utilizând cuptorul cu microunde și o probă pentru temperatură: se setează temperatura cuptorului la 93°C. Se introduc

328

- lamele într-o vaschetă ce conține CISH Tissue Heat Pretreatment Solution, al cărei capac se înfiltrează slab. Proba pentru temperatură este reprezentată de o a doua vaschetă fără capac, ce conține apă de robinet și se introduce prima în cuptor. Din momentul în care temperatura atinge 93°C se introduce și vascheta cu lamele de lucru și se mai lasă 15 minute, apoi se spală în 3 băi de apă distilată;
- în funcție de dimensiunile preparatului se adaugă 2-10 picături de enzimă pe fiecare secțiune. Timpul de incubare cu enzima variază între 5-15 minute în funcție de laborator, apoi se spală în 3 băi de apă distilată;
- deshidratate în alcool etilic de 70%, 85%, 95%, 100%, 100%;
- se usucă lamele pe plită la 37°C, pentru 15 min.

### B. Pentru froțiuni sanguine sau maduvă osoasă:

- se usucă froziurile pentru 1-2 ore la temperatura camerei;
- se prepară o soluție 1% paraformaldehidă folosind reactivul G din CISH Bone Marrow/Blood Smear Detection Kit. Se fixează preparatul pentru 15 min la temperatura camerei în această soluție, apoi se spală în 3 băi de apă distilată;
- deshidratate în alcool etilic de 70%, 85%, 95%, 100%, 100%;
- se usucă lamele pe plită la temperatura camerei pentru 20 min.

### II. Denaturarea și hibridizarea

Se pipetează 15  $\mu$ l de sondă pe o lamelă (volumul necesar este variabil în funcție de dimensiunile țesutului). Lama se poziționează deasupra lamelei astfel încât aceasta din urmă să acopere secțiunea;

Pentru sigilare se pot utiliza: silicoan (rubber cement) sau Under-Cover Slip.

Denaturarea se realizează prin incubarea secțiunilor la 95°C, pentru 5 min, în camera de hibridizare.

Hibridizarea: se incubează secțiunile pentru mai mult de 12 ore la 37°C, într-o cameră umedă la termostaț sau în camera de hibridizare.

### III. Spălare stringentă

- spălare stringentă cu tampon SSC (saline sodium citrate) la temperatura camerei și apoi cu SSC la 75°C-80°C în funcție de numărul de lame, pentru 5 min, în baia de apă. Pentru mai mult de două lame se crește temperatura de la 75°C cu 1°C pentru fiecare alte două lame. Ulterior se spală în 3 băi de apă distilată la temperatura camerei.

### IV. Detectia cu cromogen

Notă: toate etapele se desfășoară la temperatura camerei.

- A. Detectia sondei Spot Light DNA marcata cu digoxigenina.
  - inhibarea peroxidazei endogene pentru 10 min cu soluție 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
  - spălare cu PBS 1x Tween, 3 băi de câte 2 minute fiecare;

- blocarea semnalului nespecific prin adăugarea a 2-5 picături de soluție CAS -Block (CISH Polymer Detection Kit) pentru 10 min. Nu se spală secțiunile ci doar se scurge soluția de blocare;
- se adaugă a 2-5 picături din anticorpii anti-digoxigenina (CISH Polymer Detection Kit) și se incubează 30 min.;
- spălare cu PBS Tween;
- se adaugă 2-5 picături din anticorpii anti-șoarece polimerizat cu HRP (peroxidaza) și se incubează pentru 30 de minute;
- spălare cu PBS Tween;
- dezvoltare cu DAB pentru 30 min.;
- spălare cu apă de robinet;
- colorare cu hematoxidină pentru 1 min.;
- spălare cu apă de robinet;
- deshidratare cu alcool etilic 70%, 85%, 95%, 100%, 100%;
- clarificare în 2 băi de xilen;
- montare.

#### B. Detectia sondei centromerice Spot Light DNA marcată cu biotina

- inhibarea peroxidazei endogene pentru 10 min cu soluție 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- spălare cu PBS 1x Tween;
- blocarea semnalului nespecific prin adăugarea a 2-5 picături de soluție CAS -Block (CISH Centromer Detection Kit) pentru 10 min. Nu se spală secțiunile ci doar se îndepărtează soluția de blocare;
- se adaugă a 2-5 picături din soluția de streptavidină peroxidată HRP (CISH Centromer Detection Kit) și se incubează 30 min.;
- spălare cu PBS Tween;
- dezvoltare cu DAB pentru 30 min.;
- spălare cu apă de robinet;
- colorare cu hematoxidină pentru 1 min.;
- spălare cu apă de robinet;
- deshidratare cu alcool etilic 70%, 85%, 95%, 100%, 100%;
- clarificare în 2 băi de xilen;
- montare.

#### C. Detectia sondelor Spot Light DNA Translocation Probe Pair sau

- Chromosome XY Cocktail marcate cu biotina sau DIG
- inhibarea peroxidazei endogene pentru 10 min cu soluție 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- spălare cu PBS 1x Tween, 3 băi de câte 2 minute fiecare;
- blocarea semnalului nespecific prin adăugarea a 2-5 picături de soluție CAS -Block (CISH Translocation sau CISH Bone Marrow/Blood Smear Detection Kit Detection Kit) pentru 10 min.;
- se adaugă volum egal de streptavidină peroxidată și anticorp anti-DIG marcat cu AP (fosfatază alcalină); aproximativ 100-250 μl sau 2-5 picături (CISH Translocation sau CISH Bone Marrow/Blood Smear Detection Kit Detection Kit) și se incubează 30 min.;
- spălare cu PBS Tween;
- dezvoltare cu DAB pentru 30 min.;

- spălare cu apă de robinet;
- dezvoltare cu Fast Red pentru 10 min.;
- spălare cu apă de robinet;
- colorare cu hematoxidină pentru 1 min.;
- spălare cu apă de robinet;
- se aplică ClearMount Solution (CISH Translocation sau CISH Bone Marrow/Blood Smear Detection Kit Detection Kit);
- se incubează lamele pentru 2 h la 37°C;
- se echilibrează preparatele la temperatura camerei, apoi se introduc pentru puțin timp în xilen și se montează cu Histomount mounting Solution (CISH Kit);

#### V. Examinarea la microscop optic

Procedura permite evaluarea simultană a semnalului CISH și a morfologiei țesutului cu ajutorul unui simplu microscop optic. Se va folosi obiectivul 40x pentru evaluarea semnalului simplu CISH și obiectivul 100x pentru evaluarea semnalului din cazul dublului marcaj CISH (cu excepția probei Chromosome X/Y Cocktail care se va examina cu obiectivul 40x).

#### Protocol CISH pentru HER2

Țesurile trebuie fixate în formol tamponat timp de 12-24 ore, înainte de includerea la parafină. Se efectuează secțiuni cu grosimea de 4-5 μm și se montează pe lame Superfrost/plus sau HistoGrip™.

Tehnica de lucru:

1. Deparafinare în xilen, alcool etilic 100%, spălare în apă distilată;
2. Pretratamentul termic: în soluția tampon de pretratament termic încălzită la cel puțin 98°C, pentru 15 min, în baia de apă;
3. Digestia enzimatică: timpul de incubare cu enzima variază între 5-15 min. Timpul optim se stabilește de fiecare de laborator în parte;
4. Deshidratare în alcool etilic de 70%, 85%, 95%, 100%, 100%;
5. Uscarea lamelor pe plită la 37°C, pentru 15 min.;
6. Denaturare și hibridizare
  - Se pipetează 15 μl de sondă pe o lamă (volumul necesar este variabil în funcție de dimensiunile țesutului). Lama se poziționează deasupra lamei astfel încât aceasta să acopere secțiunea. Se sigilează lamela cu silicon (rubber cement).
  - Denaturarea se realizează prin incubarea secțiunilor la 95°C, pentru 5 min, în camera de hibridizare.
  - Hibridizarea: se incubează secțiunile pentru mai mult de 12 ore la 37°C, într-o cameră umedă la temperatură și apoi cu de hibridizare.
7. Spălare stringentă cu tampon SSC la temperatura camerei și apoi cu SSC la 75°C, pentru 5 min, în baia de apă.
8. Spălare cu H<sub>2</sub>O distilată.
9. Inhibarea peroxidazei endogene pentru 10 min cu soluție 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

10. Spălare cu PBS tween.
11. Blocarea semnului nespecific prin adăugarea soluției de blocare.
12. Nu se spală lamele și se adaugă anticorpii anti-digoxigenină.
13. Spălare cu PBS tween.
14. Se adaugă anticorpii polimerizați cu HRP.
15. Spălare cu PBS Tween.
16. Developare cu DAB pentru 30 min.
17. Spălare cu apă de robinet.
18. Colorare cu hematoxidină pentru 1 min.
19. Spălare cu apă de robinet.
20. Deshidratare cu alcool etilic 70%, 85%, 95%, 100%, 100%.
21. Clarificare în 2 băi de xilen.
22. Montare.

#### Interpretarea rezultatului

Semnahl HER2 CISH are culoare brună, este situat nuclear și apare sub formă de :

- puncte. Un punct reprezintă o singură copie a genei HER2. Are dimensiuni reduse, este rotund, cu margini netede. Celulele normale prezintă 2 puncte.
- clustere mici. Un cluster mic apare ca un grup de semnale de formă neregulată și este de 3-5 ori mai mare decât diametrul unui punct. Ca reper se pot lua punctele prezente în celulele normale sau tumorale.
- clustere mari. Un cluster mare apare ca un grup de semnale de formă neregulată și este de cel puțin 5 ori mai mare decât diametrul unui punct. Ca reper se pot lua punctele prezente în celulele normale sau tumorale.

Gena HER2 poate prezenta amplificare înaltă, joasă sau poate să nu prezinte amplificare.

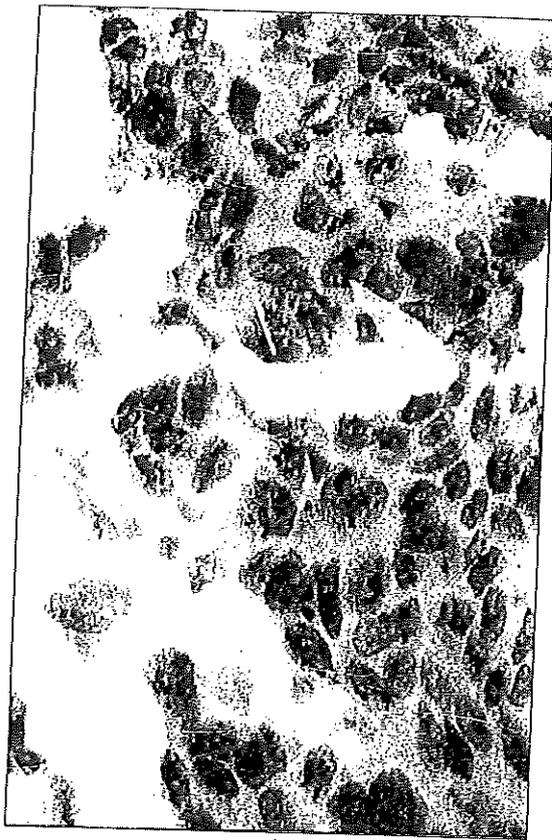
Dacă gena HER2 prezintă amplificare joasă a genei HER2 prezintă următoarele situații:

- Tumorile cu amplificare înaltă a genei HER2 prezintă mai mult de 10 puncte, sau clustere mari, sau puncte multiple și clustere mari în mai mult de 50% din nucleii celulelor tumorale din aria aleasă ca reprezentativă pentru interpretare.

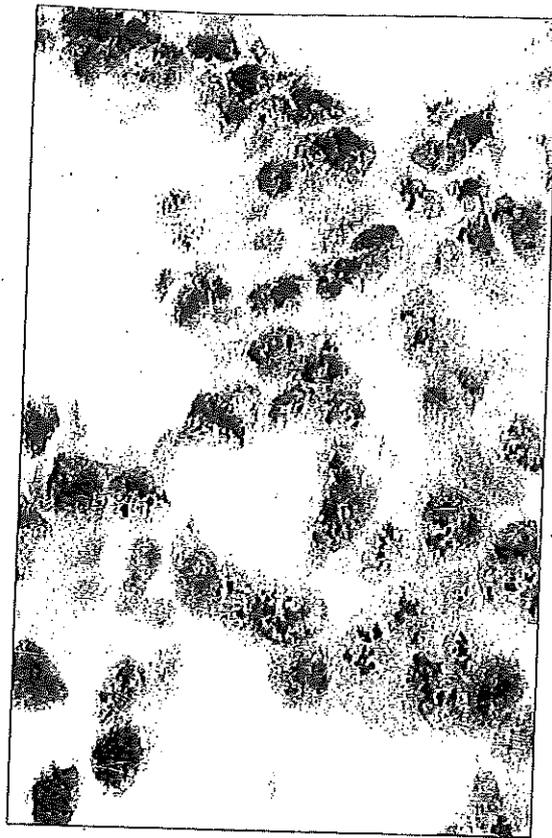
Tumorile cu amplificare joasă a genei HER2 prezintă: mai mult de 5 puncte dar până la 10 puncte, sau clustere mici, sau puncte multiple și clustere mici în mai mult de 50% din nucleii celulele tumorale din aria aleasă.

Dacă gena HER2 nu prezintă amplificare pot exista următoarele situații:

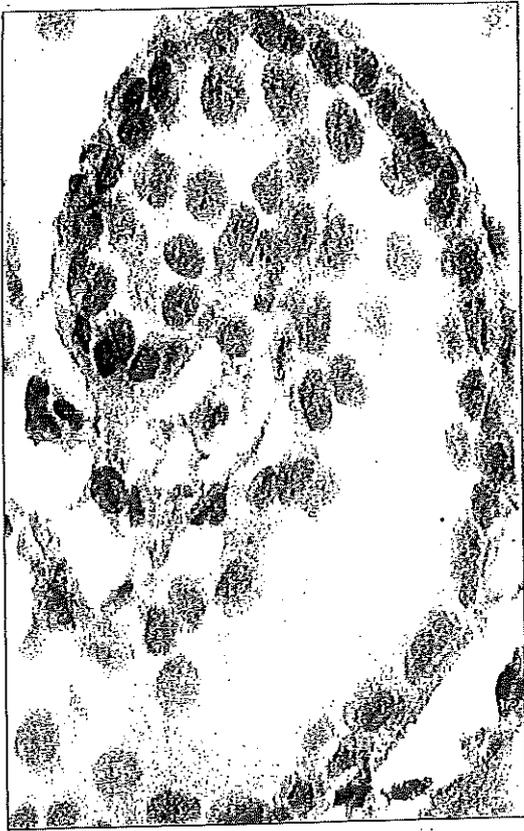
- Tumorile cu polisomia cromozomului 17: prezintă 3-5 puncte/nucleu în mai mult de 50% din celulele tumorale în aria aleasă.
- Tumorile cu status normal al genei HER2 prezintă: 1-2 puncte/nucleu în mai mult de 50% din celulele tumorale în aria aleasă.



*Carcinom ductal invaziv - Clustere mari  
CISH, x 400*



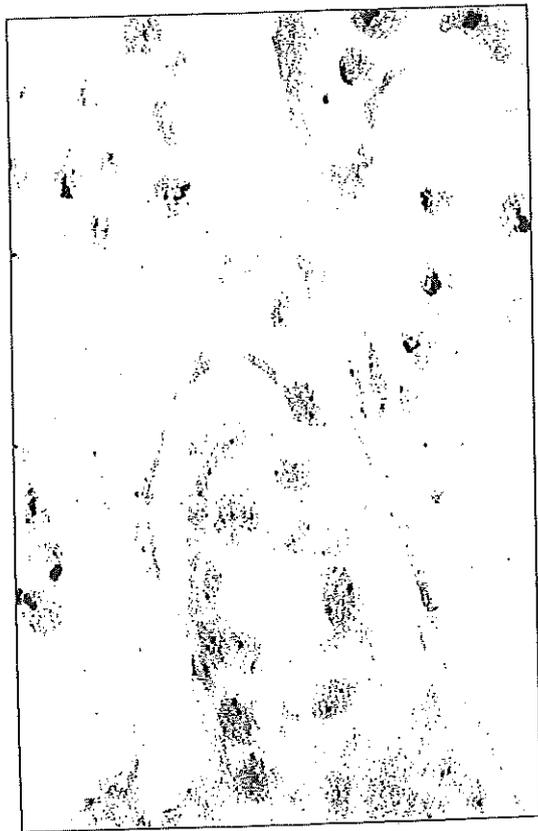
*Carcinom ductal invaziv - Clustere mari și mici  
CISH, x 400*



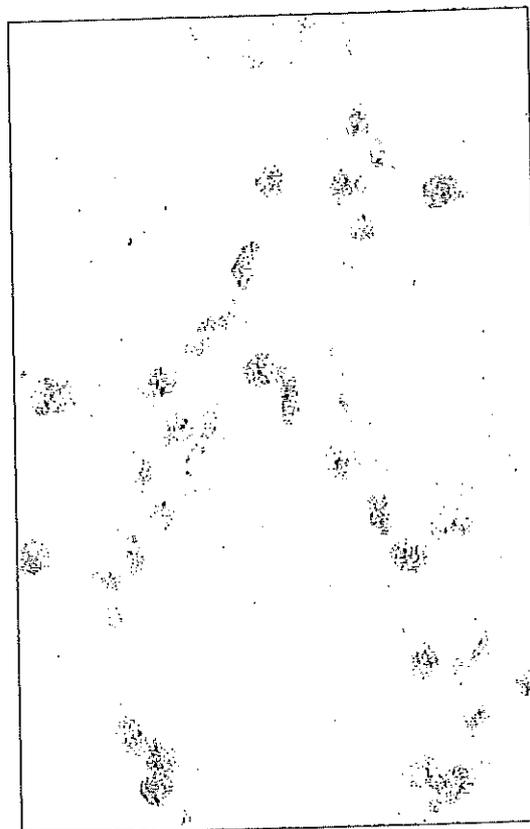
*Celule epiteliale normale- unul sau două puncte  
CISH, x 400*



*Carcinom ductal invaziv - Clustere mici - 3-5 puncte  
CISH, x 400*



*Carcinom ductal invaziv  
Clustere mari în celulele tumorale, două puncte în celulele normale  
CISH, x 400*



*Celule stromale- unul sau două puncte  
CISH, x 400*

Pentru validarea rezultatelor CISH este necesară folosirea țesuturilor control.

**Controlul pozitiv extern** trebuie utilizat de fiecare dată când se efectuează CISH. Țesutul folosit control pozitiv extern trebuie să prezinte amplificarea genică și să fie procesat în aceeași manieră cu țesutul pentru diagnostic. Acesta trebuie să prezinte în nucleii celulelor tumorale oricare din pattern-urile de amplificare genică: puncte multiple (cel puțin 5 puncte), clustere mici sau clustere mari. Este recomandat să fie prima secțiune examinată pentru a ne asigura de faptul că tehnica a fost efectuată corespunzător.

Dacă controlul pozitiv extern este invalid atunci lotul corespunzător de lame nu se poate interpreta. Acesta este considerat invalid dacă nu prezintă semnal sau atunci când se obține semnal nespecific pe țesutul normal sau tumoral. Semnalul nespecific apare de obicei sub formă de marcaj difuz. Uneori pe țesuturile formolizate excesiv poate apare un marcaj citoplasmatic. Marcajul nespecific nu trebuie confundat cu semnalul CISH pozitiv.

**Controlul pozitiv intern** este reprezentat de celulele normale (celule stromale sau epiteliale) de pe preparatul pentru diagnostic, care prezintă în mod normal 2 gene HER2 cărora le vor corespunde două puncte.

#### Indicații tehnice utile

Unul din parametrii importanți în efectuarea tehnicii CISH este temperatura. Ea trebuie respectată, din momentul recoltării țesutului până în momentul diagnosticului, conform protocoalelor standard de lucru (ex. secțiunile trebuie uscate la 60°C pentru 2-12 ore, înainte de deparafinare). Cel mai alterabil reactiv este sonda care trebuie să fie depozitată la -20°C, temperatura la care aceasta se va menține în stare lichidă.

**Pretratamentul termic** trebuie efectuat la 98°C pentru 15 min. Acesta se poate efectua utilizând:

- Oala sub presiune: se setează cronometrul la 10 minute și se deschide oala când presiunea a scăzut la 0 (temperatura va fi în jur de 95°C).
- Plita: se încălzește soluția de pretratament la 98°C și se incubează lamele pentru 15 min.
- Dispozitiv de fierț la aburi: se verifică temperatura soluției tampon de pretratament care trebuie să fie 98-100°C înainte de a se introduce lamele și se lasă să fiarbă 20 min.
- Baia de apă: se introduc preparatele histologice în vas de tip Coplin jar, apoi acesta se introduce în baia de apă. Atenție, trebuie verificată constant temperatura în vas, nu în baia de apă! Este important ca timpul (15 min) să se cronometreze după ce s-a încălzit soluția de pretratament și nu în timp ce acesta se încălzește.

**Digestia enzimatică** este momentul cheie pentru reușita metodei.

- **Digestia enzimatică** trebuie realizată după ce pepsina a fost adusă la temperatura camerei.
- Pentru început se recomandă o incubare cu enzima timp de 6 minute.
- Cu ajutorul unui vârf de micropipetă distribuți uniform enzima pe toată suprafața secțiunii.

Rezultatele variază și în funcție de prelucrarea anterioară a blocului (durata fixării, formol tamponat sau nu, includere la parafină). Nu modificați timpul de incubare cu enzima luând în considerare rezultatele obținute pe un singur bloc!

În cazul supradigestiei enzimatică nucleii nu sunt colorați cu hematoxilina, iar semnalul CISH este de intensitate scăzută sau absent. Se recomandă scăderea timpului de digestie enzimatică. Dacă timpul de digestie enzimatică este prea scurt nucleii se colorează intens cu hematoxilina, iar semnalul CISH are intensitate scăzută sau este absent. Se recomandă creșterea timpului de digestie enzimatică.

#### Denaturarea și hibridizarea:

- Nu utilizați Pap-pen-ul înainte de hibridizare pentru că acesta se va topi la 95°C în hibridizator și va difuza pe preparatul histologic.

- Nu utilizați mai multă sondă decât este nevoie pentru că nu se va putea sigila lamela datorită umezirii excesive.

- Dacă utilizați termostatul la 37°C pentru hibridizare lamele trebuie introduse în termostată imediat după ce au fost incubate la 95°C, altfel se pierde semnalul.

- Timpul pentru hibridizare poate fi variabil: timpul minim de hibridizare este de 12 ore, iar cel maxim de 72 de ore dar noi sugerăm incubarea peste noapte.

#### Spalarea stringentă:

- Dacă spalarea stringentă în SSC la 75°C durează mai mult de 5 min semnalul scade în intensitate sau se poate pierde.
- Temperatura SSC nu are voie să depășească 80°C din aceleași motive.

#### Diverse indicații:

- Secțiunile nu au voie să se deshidrateze în timpul tehnicii cu excepția pașilor când aceasta este necesară.
- Dacă pretratamentul caloric nu se poate efectua imediat după băile de apă distilată atunci lamele se pot usca imediat după imersia în alcool absolut.
- Toate soluțiile care sunt depozitate la 4°C trebuie aduse la temperatura camerei înainte de utilizare
- Contracolorarea necorespunzătoare (intensitate prea mare sau prea mică) poate compromite interpretarea rezultatului.
- Fiecare incubare se efectuează la temperatura camerei dacă nu se precizează altceva.
- Sonda poate fi utilizată rece.

#### Avantaje și dezavantaje CISH/FISH

Determinarea satatusului oncogenei HER2 a devenit necesară pentru selectarea pacienților cu carcinom mamar pentru terapia cu Herceptin. Până în prezent standardul de aur a fost metoda FISH dar nu este foarte practică pentru laboratoarele de anatomie patologică obișnuite ceea ce a condus la apariția unei

noi metode de hibridizare in situ: CISH ce utilizează reacția uzuală cu peroxidază mult mai familiară anatomo-patologilor care utilizează metodele imunohistochimice pentru diagnostic.

Comparând CISH cu FISH ambele au avantaje și dezavantaje. Un mare avantaj al hibridizării in situ cu cromogen este faptul că permite evaluarea statusului genic în contextul morfologiei țesutului înconjurător. În schimb, folosind FISH este necesară compararea cu secțiunile colorate cu HE. Acest fapt ar putea constitui o problemă în special în cazul carcinoamelor mamare când evaluarea statusului genei HER2 se realizează pe zonele invazive și nu și pe cele in situ. Un alt avantaj al hibridizării in situ cu cromogen este faptul că semnalul este permanent, lamele putând fi depozitate în condiții obișnuite, în timp ce semnalul FISH dispare în câteva săptămâni, iar lamele trebuie depozitate la 4°C. Evaluarea semnalului CISH se realizează cu ajutorul microscopului optic care implică costuri mai reduse decât microscopul cu fluorescență necesar pentru FISH, iar anatomopatologii sunt familiarizați cu acesta. Costurile mai reduse ale CISH comparativ cu FISH (care necesită achiziționarea de aparatură suplimentară) îl face mai accesibil laboratoarelor de anatomie patologică.

Unul din marile avantaje ale tehnicii FISH este faptul că permite detectarea directă a sondei. Spre deosebire de acesta, CISH necesită incubări suplimentare și deci o durată mai mare a metodei. Un alt avantaj al tehnicii FISH este posibilitatea detecției multiple multicolore în timp ce CISH este limitată la dubla detecție datorită gamei reduse de cromogeni existenți la ora actuală. Un dezavantaj al tehnicii FISH este faptul că pe blocurile incluse la parafină, proteinele celulare și extracelulare pot prezenta autofluorescență ceea ce poate masca semnalul FISH.

Interpretarea rezultatului este facilă în cazul CISH datorită utilizării sistemului de detecție convențional cu cromogen HRP/DAB, ce este folosit și în imunohistochimie.

## Anexa 1

Kituri pentru identificarea amplificării genice

- SPoT-Light C-Myc Amplification Probe
  - SPoT-Light Cyclin D1 Amplification Probe
  - SPoT-Light EGFR Probe
  - SPoT-Light HER2 Probe (US Only)
  - SPoT-Light NF2 (Chr. 22q) Deletion Probe
  - SPoT-Light N-Myc Probe
  - SPoT-Light Topoisomerase II Probe
- Kituri pentru identificarea delețiilor
- SPoT-Light Chromosome 19q Deletion Probe
  - SPoT-Light NF2 (Chr. 22q) Deletion Probe
  - SPoT-Light Topoisomerase II Probe
- Kituri pentru identificarea centromerilor
- SPoT-Light Chromosome 3 Centromeric Probe
  - SPoT-Light Chromosome 7 Centromeric Probe
  - SPoT-Light Chromosome 8 Centromeric Probe
  - SPoT-Light Chromosome 9 Centromeric Probe
  - SPoT-Light Chromosome 10 Centromeric Probe
  - SPoT-Light Chromosome 11 Centromeric Probe
  - SPoT-Light Chromosome 17 Centromeric Probe
  - SPoT-Light Chromosome 18 Centromeric Probe
  - SPoT-Light Chromosome X Centromeric Probe
  - SPoT-Light Chromosome Y Probe
  - SPoT-Light Chromosome X/Y Probe Cocktail
- Kituri pentru identificarea translocațiilor
- SPoT-Light BCR/ABL Translocation Probe Pair
  - SPoT-Light c-Myc Translocation Probe Pair
  - SPoT-Light EWS Translocation Probe Pair
  - SPoT-Light SYT Translocation Probe Pair
- Alte kituri
- SPoT-Light Bone Marrow - Blood Smear CISH Detection Kit
  - SPoT-Light CISH Centromere Detection Kit
  - SPoT-Light CISH Polymer Detection Kit
  - SPoT-Light CISH Translocation Detection Kit

## CAPITOLUL XVIII

### APLICATIILE IMUNOHISTOCHEMIEI ÎN DIAGNOSTICUL HISTOPATOLOGIC

Imunohistochimia este un procedeu de localizare a proteinelor în celule și țesuturi, utilizând ca principiu capacitatea anticorpilor de a se lega de antigeni specifici în țesuturi. Aceasta reacție antigen anticorp este marcată cu un cromogen făcând posibilă vizualizarea ei prin microscopie optică.

Imunohistochimia reprezintă întotdeauna o completare a diagnosticului histopatologic și nu reprezintă un diagnostic în sine. Ea este foarte utilă în următoarele cazuri:

- în stabilirea unui diagnostic pozitiv și diferențial al unor leziuni;
- în stabilirea etiologiei sau histogenezei;
- în diagnosticul metastazelor de origine primară necunoscută;
- evaluarea unor markeri prognostici în cazul tumorilor;
- în terapia unor afecțiuni.

#### Rolul imunohistochimiei în histogeneză și diagnostic

Evoluția continuă în terapie a creat necesitatea unei încadrări precise a afecțiunilor în diverse clasificări.

În diagnosticul imunohistochimic se dorește utilizarea a unui număr cât mai mic de markeri corelate cu rate crescute ale sensibilității (diagnostic tumoral) și specificității (cât mai puține erori în clasificarea tumorilor).

Exista un număr mare de anticorpi listați în diversele cataloage ale firmelor de profil (peste 2000), dar numărul anticorpilor specifici unei afecțiuni este relativ restrâns (de exemplu anticorpii utilizați în diagnosticul unor boli infecțioase). Deci specificitatea anticorpilor este de fapt un termen relativ, ce trebuie corelată cu contextul anatomo-clinic. Totuși anticorpii pot fi grupați în categorii mari, utilizând diverse criterii (histogeneza, proliferare celulară).

Înainte de a utiliza tehnicile imunohistochimice de diagnostic este necesară trasarea caracteristicilor leziunii și realizarea unei liste de afecțiuni pentru diagnosticul diferențial pe baza datelor histopatologice, clinice și imagistice. Într-o prima etapă se alege un panel generic de anticorpi. Pe baza rezultatelor din această prima etapă se adăuga anticorpi mai specifici. Acești anticorpi pot fi utilizați în diverse diagnostice, dar ceea ce este important este interpretarea lor în cadrul diferitelor leziuni.

**Principali markeri utilizați în diagnosticul imunohistochimic**

Markeri	Citokeratine, CEA, EMA
- epiteliali	HMB45, MelanA/Mart1
- melanocitari	Vimentina, desmina, SMA, CD31, CD34, FVII, FXIIIa
- mezenchimali	CD3, CD20, CD15, CD30 ...
- limfoizi	CD68
- histiocitari	NSE, CHR, SYN
- neuroendocrini	Ki-67, p53, PCNA
- de proliferare celulara	

Imunohistochimia în diagnosticul tumorilor este necesară în aproximativ 20% din cazurile de tumori maligne, în special în tumorile anaplazice (în 90% din cazuri) și în limfoamele maligne (50% din cazuri).

În multe cazuri imunohistochimia furnizează informații importante în confirmarea diagnosticului, identificarea fenotipului tumoral și identificarea unor noi entități și stabilirea unor noi clasificări.

Aproximativ 10-15% din tumori sunt reprezentate de tumorile cu origine necunoscută. Prima întrebare pe care ne-o punem este dacă tumora respectivă este o tumora primitivă sau metastază. În cazul unei tumori nediferențiate se pune problema dacă este carcinom, limfom, sarcom, melanom malign sau tumora cu celule germinative.

Un diagnostic histopatologic corect oferă pacientului posibilitatea unui tratament corespunzător. Acest diagnostic se elaborează pe baza examenului morfologic însoțit de tehnicile complementare (imunohistochimie, microscopie electronica, biologie moleculara), de informațiile clinice, rezultatele laboratorului clinic și imagistica.

În examenul imunohistochimic ar trebui urmărite, în funcție de complexitatea tumorii, diverse paneele de anticorpi. Primul panel utilizat diferențiază principalele grupe mari de tumori.

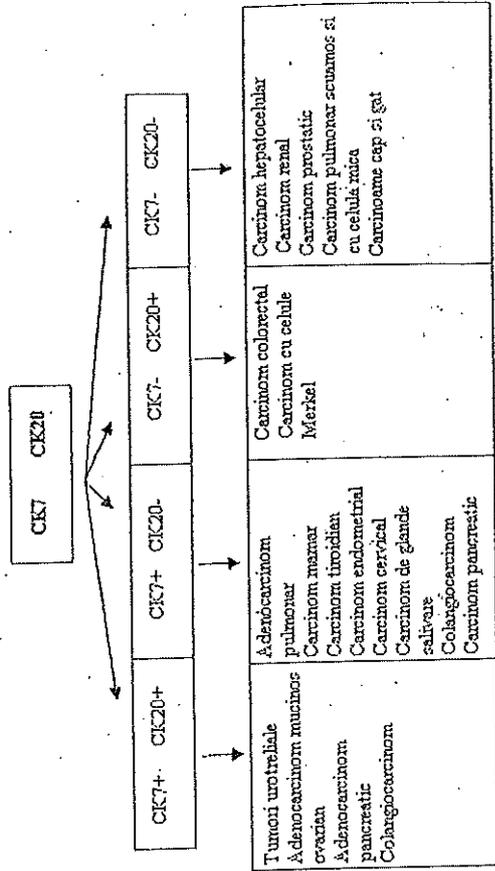
**Panelul de anticorpi primari**

	LCA	CK	VIM	S100
Carcinom	-	+	-	-
Sarcom	-	-	+	-
Linfom	+	-	-	-
Melanom	-	-	-	+

Panelul secundar de anticorpi cuprinde mai multe subgrupe:

- subtipuri de citokeratine;
- proteine oncofetale;
- proteinele neuroendocrine;
- receptorii hormonal.

Exista 20 de subtipuri de citokeratine (CK) cu diferite greutatea moleculare și expresie diferita în tipurile celulare și în țesuturile neoplazice. Anticorpi monoclonali pentru subtipuri specifice de CK se utilizează pentru a clasifica tumorile în funcție de originea lor. În tumorile de origine primară necunoscută se utilizează în principal CK7 și CK20. CK7 se întâlnește în tumorile pulmonare, ovariene, mamară și endometrială și este absentă în tumorile de tract gastro-intestinal inferior. CK 20 se exprima în epitelul gastrointestinal, uroteliu și celulele Merkel.



**Expresia subseturilor de citokeratine 7 și 20 în diverse tumori**

Proteinele oncofetale sunt markeri nespecifici și sunt prezente în diferite tipuri de cancer. Ele sunt exprimate în celule în timpul dezvoltării embriologice dar și în celule tumorale. Cele mai cunoscute antigene oncofetale sunt antigenul carcinoembrionar și alfa-fetoproteina.

Tumorile neuroendocrine sunt caracterizate de prezența de granule secretorii și producția de hormoni peptidici. Deși există un spectru larg de markeri neuroendocrini, cromogranina și sinaptofizina sunt cei mai utilizați în diagnosticul acestor tumori.

Efectul hormonilor în organele țintă este mediat de peptide intracelulare cunoscute sub numele de receptori hormonal. Sunt disponibili anticorpi pentru receptorii de estrogen, progesteron și androgen.

În funcție de aspectul morfologic leziunile pot fi generic clasificate în cinci subclase, a cincea constituind de fapt diviziuni ale primelor două clase:

1. tumori cu celule rotunde;
2. tumori cu celule poligonale mari (epitelioid)
3. tumori cu celule fuziforme
4. tumori cu pleomorfism celular
5. tumori hematopoietice.



### Tumorile cu celule mari poligonale (epitelioid)

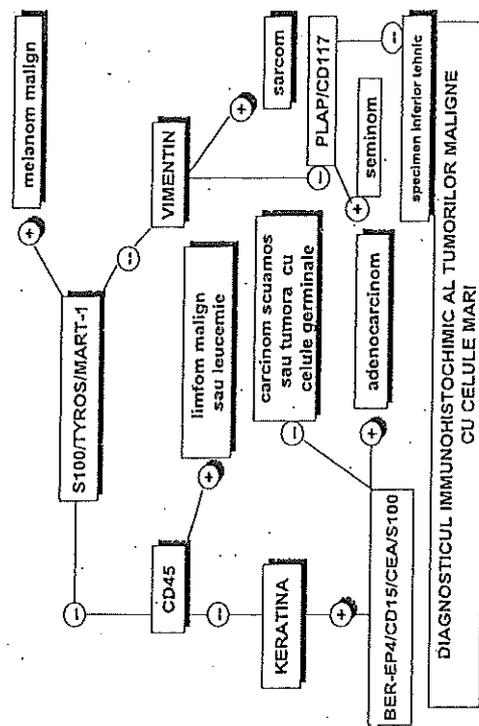
Aceste tumori sunt compuse din celule epitelioid mari sau poligonale cu aspect asemănător carcinoamelor, deși nu toate fac parte din aceeași familie de aceea examinarea atentă morfologică completată de teste suplimentare de diagnostic pot duce la elaborarea unui diagnostic corect. Din acest grup fac parte:

- carcinomul scuamos slab diferențiat cu celule mari
- adenocarcinomul
- mezoteliomul
- melanomul malign
- sarcoame cu celule epitelioid (sarcomul epitelioid, sarcomul alveolar de părți moi, sarcomul cu celule clare, leiomiocarcinomul epitelioid, schwanomul malign epitelioid)

Anticorpii utilizați sunt: citokeratinele, vimentina, Ber-Ep4, CD45, CD15, MOC31, CD 117, S100, HMB45, MART, calretinina (CAL).

	VIM	CK	Ber-Ep4	CAL	HMB45	MART-1
Carcinomul scuamos slab diferențiat cu celule mari	-	+	+	-	-	-
Adenocarcinomul	-	+	-	-	-	-
Mezoteliomul	+	+	+/-	+	-	-
Melanomul malign	+	-	-	-	+	+
Sarcoame cu celule epitelioid	+	+/-	-	-	-	-

### Anticorpi utilizați în diagnosticul tumorilor cu celule mari



Algoritm de diagnostic al tumorilor cu celule mari, după Wick MR, 2001

Pentru diferențierea cu pattern adenomatoid sau adenomatoid sunt necesari markeri suplimentari ca CA125, CEA, CK(5,7,20), ER, PGR, TTF1; pentru diferențierea subtipurilor de sarcoame cu pattern epitelioid sunt necesari markeri suplimentari ca: markeri vasculari(CD31 CD34, factor VIII, factor XIII, ), CD117, SMA, S100, NSE.

Tumorile cu celule mari poligonale îmbracă de obicei aspectul carcinoamelor. Markerii imunohistochimici au rol în diferențierea unui carcinom de un melanom sau a unui mezoteliom de un adenocarcinom, evoluția clinică și conduita terapeutică fiind diferite.

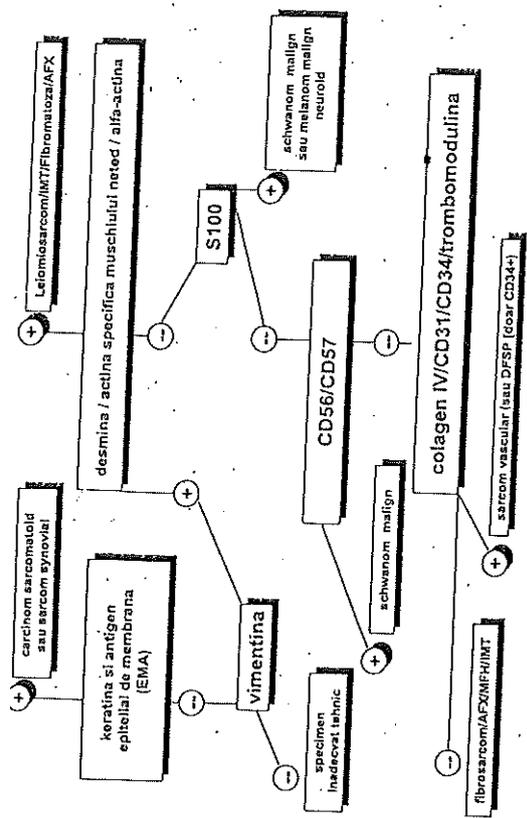
### Tumori maligne cu pattern fuziform

Aceste tumori au comun aspectul fuziform al celulelor, cele mai frecvente fiind sarcoame de țesuturi moi. Din acest grup, fac parte: carcinomul scuamos sarcomatoid, melanomul malign cu celule fuziforme, sarcoamele de țesuturi moi cu celule fuziforme (histiocitomul fibros malign, fibrosarcomul, leiomiocarcinomul cu celule fuziforme, sarcomul Kaposi și sinoviomul malign monofazic cu celule fuziforme, tumorile maligne de nerv periferic (MPNST).

### Anticorpi utilizați în diagnosticul tumorilor cu pattern fuziform

	Carcinom scuamos sarcomatoid	Melanom malign cu celule fuziforme	Sarcoame cu celule fuziforme
CK	+	-	-
EMA	+/-	-	+/-
VIM	-	+	+
DES	-	-	+
SMA	-	-	+
S100	-	-	+
CD56	-	-	+
CD31	-	-	+
CD34	-	-	+
HMB45	-	+	-
MART-1	-	+	-
CD68	-	-	-

Din grupa tumorilor cu pattern fuziform, cele mai frecvente sunt sarcoamele de țesuturi moi. Markerii imunohistochimici sunt foarte utili în stabilirea histogenezei acestora. De exemplu actina și desmina se utilizează pentru tumorile cu origine musculară, CD56, CD57, S-100 pentru cele cu origine nervoasă și CD34 și CD31 pentru cele cu origine vasculară. De asemenea imunohistochimia are rol în diferențierea unui carcinom sau melanom cu celule fuziforme de un sarcom.



DIAGNOSTICUL IMUNOHISTOCIMIC AL TUMORILOR CU CELULE FUZIFORME

Algoritm de diagnostic al tumorilor cu pattern fuziform, (după Wick MR, 2001)

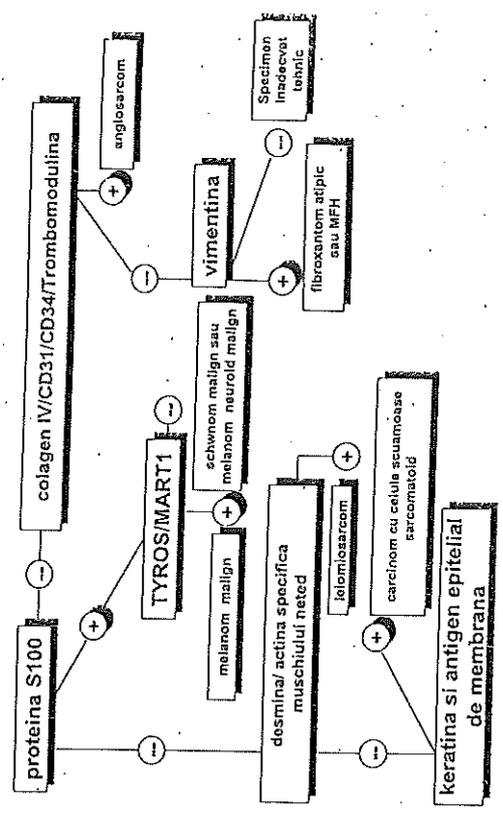
**Tumori maligne cu pattern pleomorf**

Sarcoamele de țesuturi moi care prezintă aspect microscopic pleomorf includ histiocitomul fibros malign, rabdomiosarcomul pleomorf, liposarcomul pleomorf și dediferențiat, leiomiiosarcomul dediferențiat și MPNST. Majoritatea markerilor imunohistochimici ai acestor tumori de țesuturi moi sunt slab reprezentate, doar în arile dediferențiate sau pleomorfe, cu excepția rabdomiosarcomului și MPNST.

Anticorpi utilizați în diagnosticul tumorilor cu pattern pleomorf

	Carcinom scuamos pleomorf	Melanom malign pleomorf	Sarcoame pleomorfe
CK	+	-	-
EMA	+/-	-	+/-
VIM	-	+	+
HMB45	-	+	-
MART-1	-	+	-
VIM	-	+	+
DES	-	-	+
SMA	-	-	+
CD31	-	-	+
CD34	-	-	+
CD99	-	-	+

În tumorile cu pattern pleomorf, imunohistochimia joacă un rol important în stabilirea histogenezei. Totuși acesta constituie un examen dificil datorită existenței zonelor întinse de necroză ce limitează plajele celulare necesare pentru reacția antigen-anticorp și stabilirea unui diagnostic de certitudine.



DIAGNOSTICUL IMUNOHISTOCIMIC AL TUMORILOR MALIGNE PLEOMORFE

Algoritm de diagnostic al tumorilor cu pattern pleomorf, după Wick MR, 2001

**Tumori hematopoietice**

După realizarea diagnosticului diferențial între un limfom și un carcinom sau sarcom este necesară stabilirea tipului de limfom : limfom Hodgkin sau nonhodgkin. Limfoamele nonhodgkiniene sunt clasificate în limfoame cu celule B sau T.

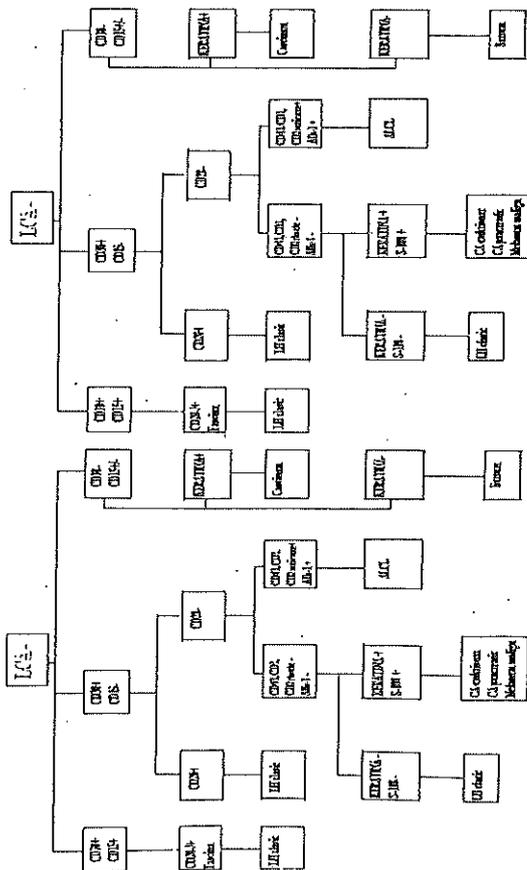
Limfomul Hodgkin este o proliferare clonală malignă de limfocite B sau mai rar, de limfocite T înconjurate de celule inflamatorii și fibroză, ducând la apariția a doua subtipuri histologice majore: limfomul Hodgkin clasic și limfomul Hodgkin cu predominantă nodulară.

Pentru diagnosticul tipului de boala Hodgkin, rezultatul histopatologic poate fi completat cu colorațiile imunohistochimice, utilizându-se în principal anticorpii CD15 (LeuM1), CD30 (Ki-1), CD45 (LCA). CD 30 detectează un epitop rezistent la formalina al antigenului Ki-1, Cd15 este un marker monocit-granulocitar. CD45 este utilizat mai ales pentru identificarea subtipului cu predominantă nodulară. Imunohistochimia a fost utilizată în trecut și pentru studiul originii celulelor Reed-Sternberg.

**Anticorpi utilizați în diagnosticul bolii Hodgkin**

	CD3	CD15	CD20	CD30	CD45	CD75
Linfom Hodgkin clasic	-	-/+	-/+	+	-	-
Linfom Hodgkin cu predominantă nodulară	-	-	+	-	+	+

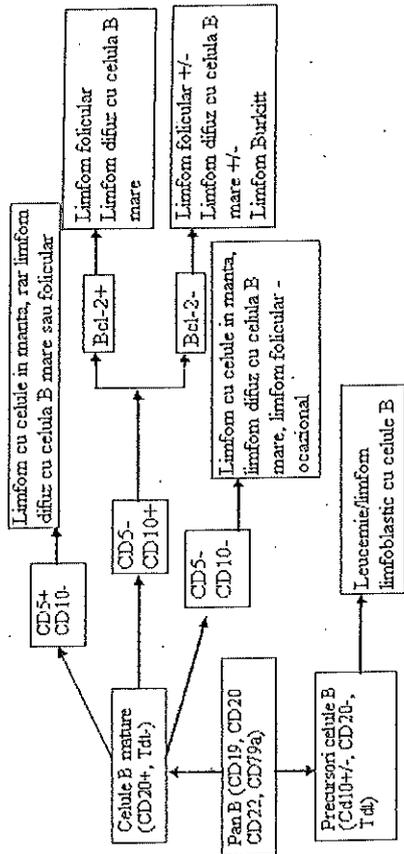
În limfomul Hodgkin prezenta granuloamelor necazeoase pune problema diagnosticului diferențial cu alte leziuni granulomatoase nehematopoietice sau hematopoietice după cum este ilustrat în figura de mai jos.



**Algoritm diagnostic al limfomului Hodgkin clasic, (după Dabbs, 2006)**

Limfoamele maligne non-hodgkiniene sunt clasificate în limfoame cu celule B și limfoame cu celule T.

Limfoamele cu celule B sunt limfoame cu grad scăzut de malignitate (cu celula mică) și cu grad înalt de malignitate (cu celula mare).



**Algoritm orientativ în diagnosticul limfoamelor cu celula B, (după Prakash S, 2007)**

În tabelul de mai jos este reprezentat diagnosticul diferențial între limfomul Hodgkin și celelalte tipuri de limfoame.

**Diagnosticul diferențial al limfomului Hodgkin, (după Dabbs, 2006); LH - limfom Hodgkin, ALCL - limfom cu celula mare anaplastic, MLCBCL - limfom cu celula B mare mediastinal, TCRBCL - limfom cu celula B bogat în celule T**

	LH	ALCL	MLCBCL	TCRBCL
CD30	+	+	uneori	-
CD15	+	rar	-	-
CD20	uneori	-	+	+
CD3	rar	+	-	-
CD40	+	-	+	+
CD45(LCA)	-	uneori	+	+
EBV-LMP-1	uneori	-	-	-
ALK	-	+	-	-
Fascina	+	uneori	-	-

Diagnosticul cu celula B mica se realizează de obicei pe baza aspectului histopatologic caracteristic. În cazurile mai dificile se utilizează un panel de anticorpi ce utilizează CD20, CD79a, CD10, CD23, bel2 și ciclina D1.

**Caracteristicile imunohistochimice ale limfoamelor cu celulă B mica**

	CD20	CD79a	CD5	CD10	CD23	Bcl2	Ciclin D1
LLC-B	+/-	+	+	-	+	+	-
Limfom cu celule în manta	+	+	+	-	-	+	+
Limfom limfoplasmodic	+/-	+	-	-	-	+	-
Limfom folicular	+	+	-	+	-	+	-
MALT	+	+	-	-	-	+	-
Limfom de zona marginala	+	+	-	-	-	+	-
Limfom de zona marginala splenica	+	+	-	-	-	+	-
Leucemia cu celule parvoase	+	+	-	-	-	+	-

Limfoamele B cu celulă mare reprezintă aproximativ 20% din limfoamele nonhodgkiniene. Sunt agresive din punct de vedere histologic iar aspectul citologic este caracteristic. Alături de aspectul histopatologic, pozitivitatea la CD20 și uneori la CD79a, duce la determinarea diagnosticului.

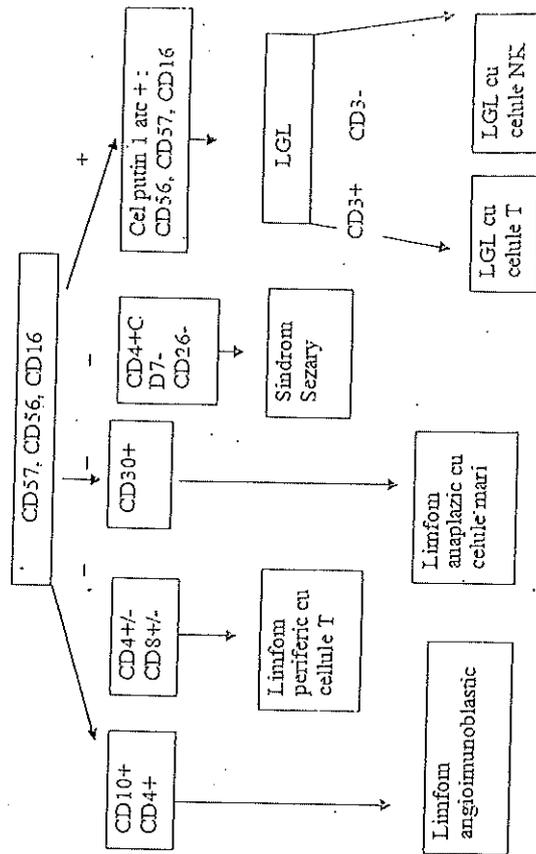
Aspectul histopatologic împreună cu pozitivitatea pentru CD3 (marker pan T) sunt caracteristice și suficiente pentru diagnosticul majorității limfoamelor cu celule T. Cel mai frecvent se întâlnesc limfoamele anaplastice cu celule mari și limfoamele cu celule T periferice NOS. În cazurile dificile de limfoame cu celule T și NK se utilizează markeri imunohistochimici suplimentari cum ar fi CD57, CD56, CD16.

În diagnosticul unei tumori trebuie să ne întrebăm ce fel de tumora este: carcinom sarcom, limfom, tumora neuroendocrina, etc. și în funcție de asta să alegem un panel de anticorpi. Scopul creării unui astfel de panel este selectarea markerilor ideali în combinația ideală pentru rezultate cât mai precise.

De exemplu:

- panelul pentru carcinoame cuprinde citokeratinele fie cocktailul (AE1/AE3, MNF116) sau citokeratine cu greutate moleculară mica (CK5/6/7/8) sau mare (CK18/20);
- panelul pentru sarcoame cuprinde vimentina, actina musculară netedă, Myo D1, mioglobina, desmina, proteina S100, neurofilamente, factor VIII, CD31;
- panel pentru limfoame cuprinde CD3, CD5, CD10, CD79a, CD20, CLA, bcl-2 CD15, CD30;

- panel pentru leziunile bifazice de tip mezotelioame, sinovioame cuprinde: calretinina, mezotelina, vimentina, EMA, MNF116, CK7, CK19;
- panel pentru melanom: Melan A, MITF, HMB45, vimentina, S100;
- panel pentru leziunile histiocitare: E-caderina, CD11d, CD18, CD45, CD68;
- panel pentru leziunile neuroendocrine: chromogranina, synaptophysin, NSE;
- panel pentru tumorile endocrine:
  - leziunile hipofizare: ACTH, endorphin, FSH, MSH, oxytocin, TSH;
  - insulele pancreatice, insulina, glucacon, somatostatina, gastrina, VIP, pancreatic polypeptide;
  - tiroida/paratiroida TTF-1, thyroglobulina, calcitonina, parathyroid hormone.



**Algoritm de diagnostic al limfoamelor cu celula T, (după Laboratoriles ARUP, 2007 modificat)**

Imunohistochimia joacă un rol important nu numai în diagnosticul tumorilor ci și în diagnosticarea altor leziuni cum ar fi cele infecțioase. Avantajele sunt reprezentate de rapiditatea diagnosticului, de posibilitatea utilizării blocurilor de parafină scăzându-se riscul îmbolnăvirii; blocurile de parafină se pot utiliza și în studii retrospective. Un mare avantaj îl reprezintă specificitatea anticorpilor monoclonali și policlonali în identificarea unor agenți patogeni (infecții virale, infecții bacteriene, fungi și protozoare). De exemplu panelul utilizat pentru

identificarea virusurilor hepatice (HCV); cuprinde o serie de markeri cum sunt cei acestea pot fi pentru virusul hepatitei B și pot avea localizare nucleară (core), citoplasmatică sau membranar, în funcție de stadiul replicării virale și pentru virusul hepatitei C cu localizare intranucleară. (Markerul pentru identificarea EBV (virusul Epstein-Barr) este localizat intranuclear; EBV este asociat unor tipuri de limfoame și unor carcinoame din sfera orofaringiană. HPV (Human papillomavirus) prezintă un grup de 30-40 de subtipuri localizarea cea mai frecventă este genitală, respiratorie și cutanată. Unele subtipuri (16,18,31) sunt numite tipuri cu risc înalt pentru că pot induce cancer cervical, anal, penian. Tipul 16 este asociat în special leziunilor orofaringiene. Colorația pozitivă este puternică în nucleu și în citoplasma perinucleară; uneori se pot observa și rări granule intracitoplasmatică.

#### METASTAZE

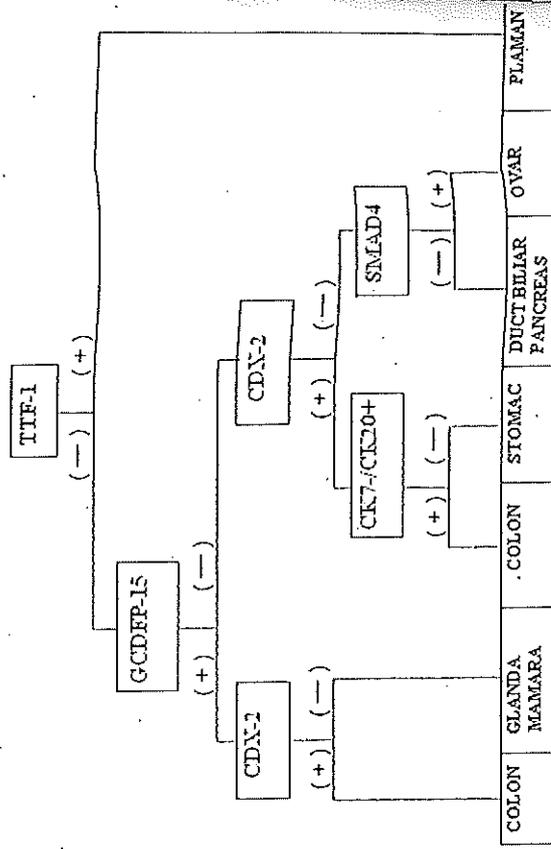
Deși majoritatea neoplasmelor se prezintă la locul de origine, 10-15% se prezintă totuși ca metastaze în organele solide, cavități libere și ganglioni limfatici. Dintre acestea majoritatea sunt adenocarcinoame, iar principalele localizări sunt, în ordinea frecvenței, glanda mamară, colon, plămân, ovar, pancreas, prostata și stomac.

De prima intenție în depistarea unei tumori primare nu este însă imunohistochimia. Aceasta intervine abia după ce examinarea clinică și imagistica nu a adus nici o informație pertinentă. Doar examinarea histopatologică pe colorații uzuale poate fi insuficientă deoarece metastazele de adenocarcinom cu diferite origini pot fi foarte asemănătoare, îngreunând identificarea tumorii primare.

Au fost descriși ca utili numeroși markeri imunohistochimici, printre care combinația CK7/CK20, TTF-1 (thyroid transcription factor 1), CEA, receptorii pentru estrogen, GCDFFP-15 (gross cystic disease fluid protein 15).

Diferențele în imunomarcarea citokeratinele cu greutate moleculară mică CK7 și CK20 sunt utile în diagnosticul diferențial al metastazelor, mai ales cele de origine pulmonară.

Park et al. într-un studiu ce a avut ca obiectiv dezvoltarea unei abordări cât mai eficiente a evaluării imunohistochimice a adenocarcinoamelor metastatice în funcție de locul de origine, au creat un „arbore de decizie” bazat pe sensibilitatea și specificitatea a șase markeri: TTF-1, GCDFFP-15, CDX-2, CK7, CK20, SMAD4. Utilizarea acestui arbore a avut în cazul lor o valoare predictivă pozitivă de 65,3%.



Arbore de decizie pentru diagnosticul localizării primare a metastazelor

În general, toți markerii imunohistochimici ar trebui cuantificați astfel după numărul de celule colorate: 0 negativ sau foarte rare celule izolate (<10 celule colorate); 2+ (10%-50% din celule colorate); 3+ (peste 50% din celule colorate), după intensitatea culorii: 0 absent, 1+ colorație foarte slabă, fond, 2+ colorație moderată definită, 3+ colorație puternică definită, după localizarea celulei a markerului: nucleară (p53, Ki67, PCNA, ER, TTF-1, CDX, citoplasmatică (CEA, CK7, CK20, MUC2, MUC5AC, GCDFFP-15).

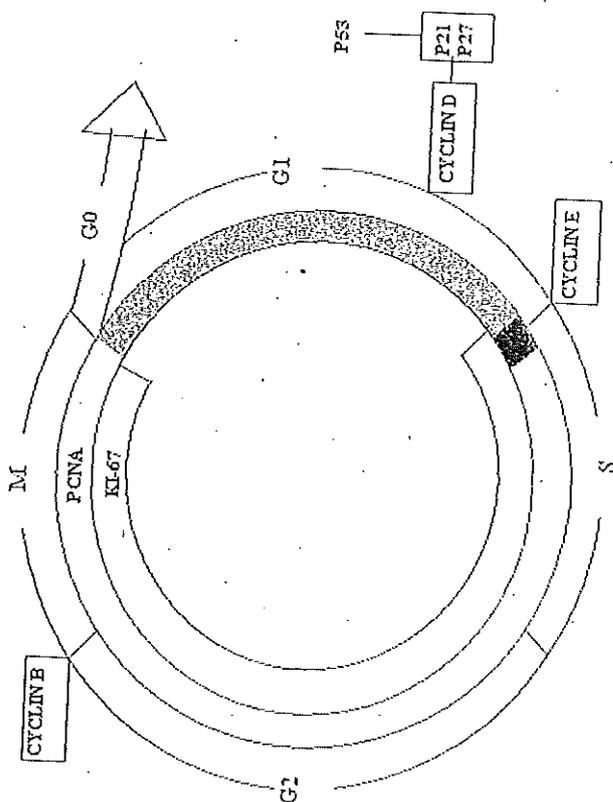
#### EVALUAREA UNOR MARKERI PROGNOSTICI

Celulele canceroase sunt caracterizate de o creștere incontabilă dezordonată datorită unui dezechilibru între proliferarea celulară și apoptoza celulară. Ciclul celular se împarte în patru faze: G1, faza S (sinteza ADN), G2 și faza M (mitotică). Biologia moleculară a elucidat o parte din relațiile existente între diversele gene și controlul ciclului celular. Modificările în expresia protooncogenelor și genelor supresoare tumorale joacă un rol important în oncogeneza. Distribuția celulelor neoplazice de-a lungul fazelor ciclului celular poate fi observată prin utilizarea unui panel de markeri imunohistochimici. (fig. 1) Studiul ciclului celular prin metode imunohistochimice are o în portanță valoare prognostică.

Ki-67 este un antigen nuclear prezent în celulele proliferative. Valoarea Ki-67 se corelează cu gradul tumoral și supraviețuirea. Proteina p53 este exprimată raspuns la lezarea ADN. Ea reglează diviziunea celulară prin întreruperea progresiei de la faza G1 la faza S, permițând astfel repararea ADN.

Proteinele p21 și p27 sunt inhibitori CDK (cyclin dependent kinase) și intervin în reglarea ciclului celular. Cyclin D1 în colaborare cu CDK facilitează progresia de-a lungul fazei G1.

PCNA (antigenul nuclear de proliferare nucleara) crește de-a lungul fazei G1, atinge un vârf la tranziția între faza G1 și faza S și descrește de-a lungul fazei G2.



*Relația între diferite gene și ciclul celular*

## IMUNOHISTOCHEMIA ÎN TERAPIE

Metodele de investigare imunohistochemice sunt implicate nu doar în diagnosticul și în terapia diverselor neoplazii. Informațiile aduse de diverșii markeri ghidează medicul curant în ceea ce privește alegerea terapiei optime.

Statusul receptorilor de estrogen și progesteron este determinat prin imunohistochimie. Ei constituie importanți factori de prognostic în cancerul mamar și pozitivitatea lor în celulele tumorale mamar reprezintă o indicație pentru terapia hormonală. Tamoxifenul este un medicament cu afinitate pentru receptorii de estrogen. El face parte din categoria modulatorilor selectivi ai receptorilor de estrogen (SERM). Este prescripșii pacientelor cu cancer mamar noninvaziv și invaziv în orice stadiu cu receptori hormonal pozitivi. Totuși acest medicament este mai

eficient în premenopauza, în postmenopauza preferându-se inhibitorii de aromataza, ce reduc cantitatea de estrogen circulant.

Her-2/neu este un receptor aflat la suprafața celulelor tumorale mamar ce controlează creșterea celulelor tumorale, invazia și răspândirea lor în organism. Trastuzumab (Herceptin) este un medicament ce blochează Her-2/neu, împiedicând astfel creșterea celulelor tumorale, cu eficiența sporită la pacienții Her-2/neu pozitivi. De aceea determinarea statusului Her-2/neu la pacienții cu cancer mamar este importantă. Deoarece rezultatele testării Her-2/neu decid abordarea terapeutică este important ca procesul de testare Her-2/neu să fie cât mai exact.

Rituximab aparține unui grup de terapeutice antineoplazice cunoscute sub numele de anticorpi monoclonali. Este utilizat în tratamentul limfoamelor nonhodgkiniene cu celula B, ce prezintă ca trăsătura comună pozitivitatea la CD20. CD20 este un marker specific al limfocitelor B din stadiul pre-B până în cel de limfocit matur. Anticorpii monoclonali sunt utilizați pentru a distruge celulele canceroase prin recunoașterea unor proteine de pe suprafața lor. Rituximab (MabThera) se fixează pe CD20 ce se găsește la suprafața limfocitelor de tip B normale și anormale, pe care le distruge. Acțiunea sa se exercită prin trei mecanisme principale: inducerea apoptozei, liza prin sistemul complement și citotoxicitate celulară. Sistemul imun înlocuiește limfocitele normale reducând astfel numărul reacțiilor adverse.

Tratamentul GIST în stadii avansate și metastatic a fost revoluționat începând cu anul 2000 când pe piața produselor farmaceutice a apărut Gleevec (Imatinib). Gleevec este un inhibitor al receptorilor de tirozin kinaza kit, explicând eficacitatea terapiei la pacienții C-kit (CD117) pozitivi. Gleevec este folosit pentru tratamentul adulților diagnosticați cu GIST la care rezecția chirurgicală a tumorii nu este posibilă sau care au metastaze în alte părți din organism.