



LA DOBLE TINCIÓN EN INMUNOHISTOQUÍMICA

(Zaragoza, Mayo 2011)

Inés Martín-Lacave y José C Utrilla Alcolea

Dptº de Citología e Histología Normal y Patológica

Facultad de Medicina

Universidad de Sevilla

LA DOBLE TINCIÓN EN INMUNOHISTOQUÍMICA

Ventajas sobre la IF:

1. Uso del MO tradicional, lo que permite observar la morfología y la inmunotinción simultáneamente
2. Permanencia de las tinciones → posibilidad de almacenamiento
3. Mayor facilidad para fotografiar los resultados

Desventajas sobre la IF:

- Procedimiento muchísimo más complejo
- No es útil para la colocación intracelular de Ag



Para Ag localizados en distintas células o compartimentos celulares

Material a emplear: parafina > criostato > cultivos celulares

LA DOBLE TINCIÓN EN INMUNOHISTOQUÍMICA

Premisa: NO utilizar anticuerpos primarios o específicos marcados directamente, ya que disminuye la sensibilidad del método



La demostración de cada antígeno ha de hacerse mediante la utilización de un método indirecto

Existen 2 alternativas principales:

1. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PROCEDENTES DE DISTINTAS ESPECIES (MONOCLONAL-POLICLONAL) o SUBCLASES DE Ig (IgG₁-IgG_{2A})
2. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PROCEDENTES DE LA MISMA ESPECIE:
 - MONOCLONAL-MONOCLONAL
 - POLICLONAL-POLICLONAL



PROBLEMAS POR REACCIONES CRUZADAS ENTRE LOS DISTINTOS ANTICUERPOS

1. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PROCEDENTES DE DISTINTAS ESPECIES (MONOCLONAL-POLICLONAL) o SUBCLASES DE Ig (IgG1-IgG2A)

1.1. Doble inmunotinción simultánea: cuando se emplean distintas enzimas

Posibilidades:

- IFsI (Ag1) + IPxI (Ag2)
- ABC-Fsa (Ag1) + EV-Px (Ag 2)
- IFsI (Ag1) + EV-Px (Ag 2)
- APAAP (Ag1) + PAP (Ag 2)

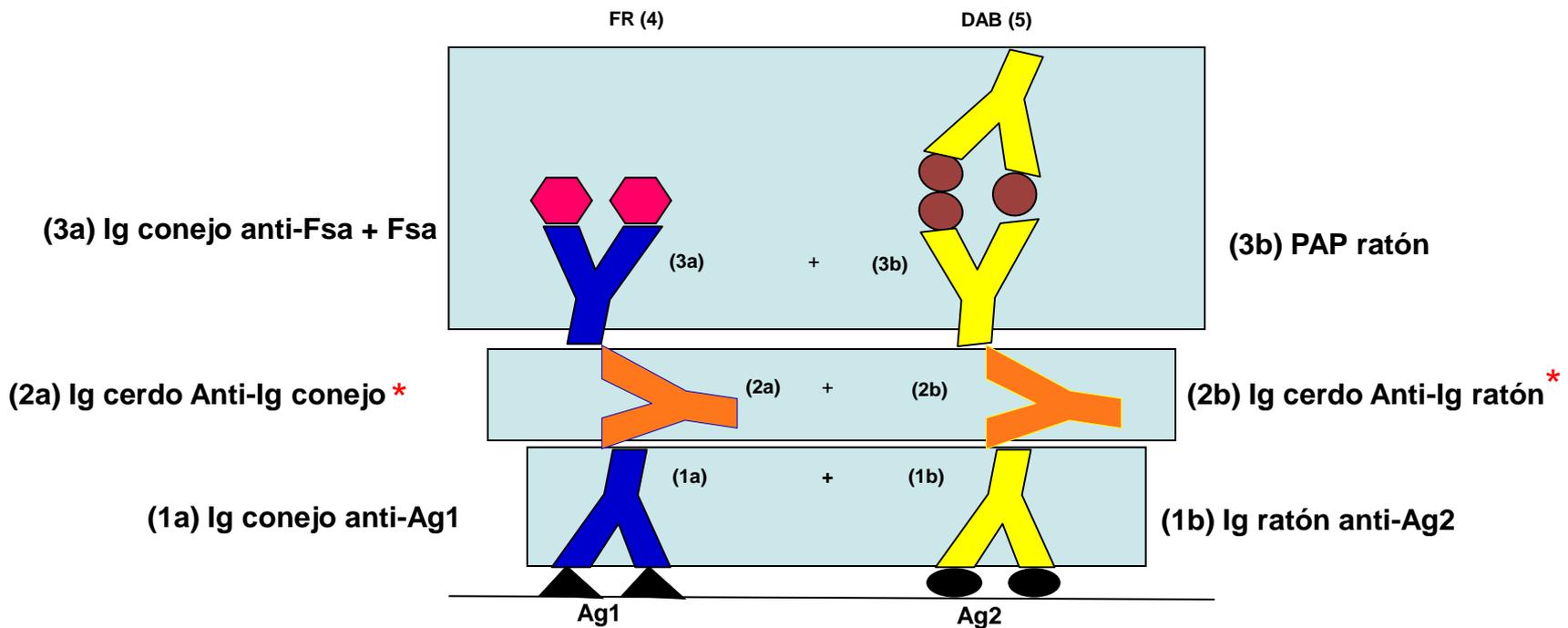
1.2. Doble inmunotinción secuencial: solo si se emplea la misma enzima

Posibilidades:

- PAP (Ag1) → PAP (Ag2)
- ABC-Px (Ag1) → EV-Px (Ag2)
- EV-Px (Ag1) → EV-Px (Ag2)

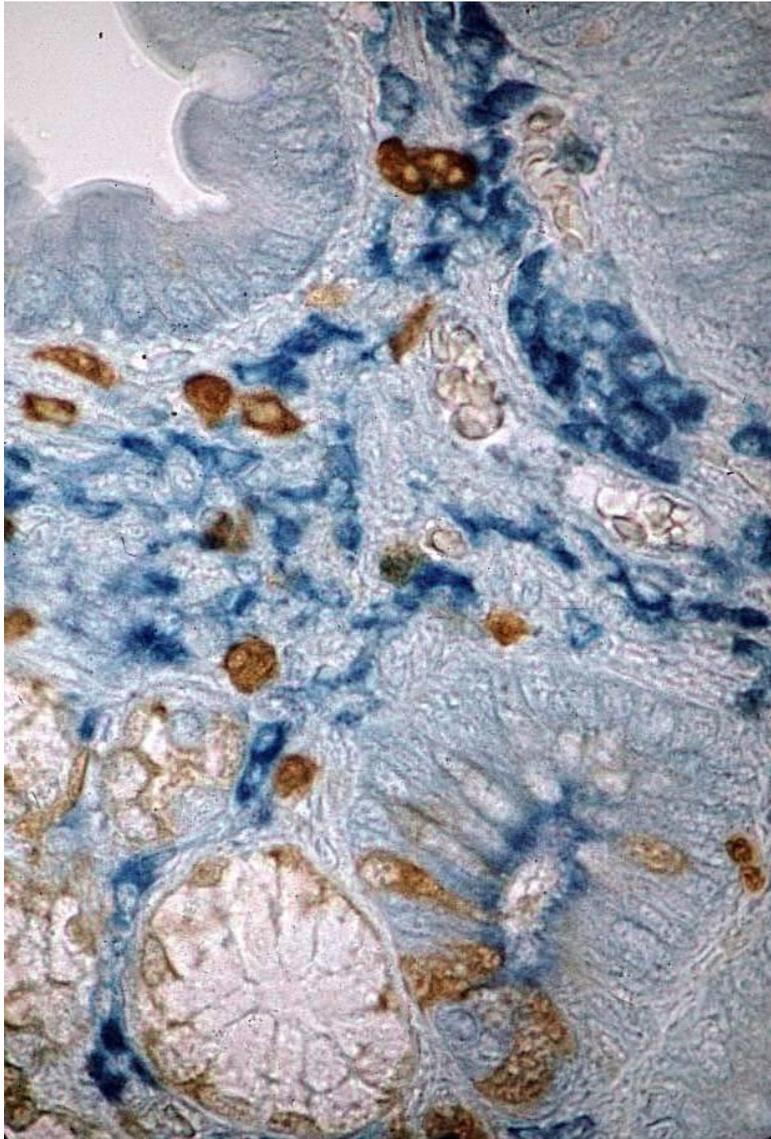
1.1. Doble inmunotinción simultánea

Primer ejemplo: APAAP (Ag1) + PAP (Ag 2) (*Masson&Sammons, 1978*)

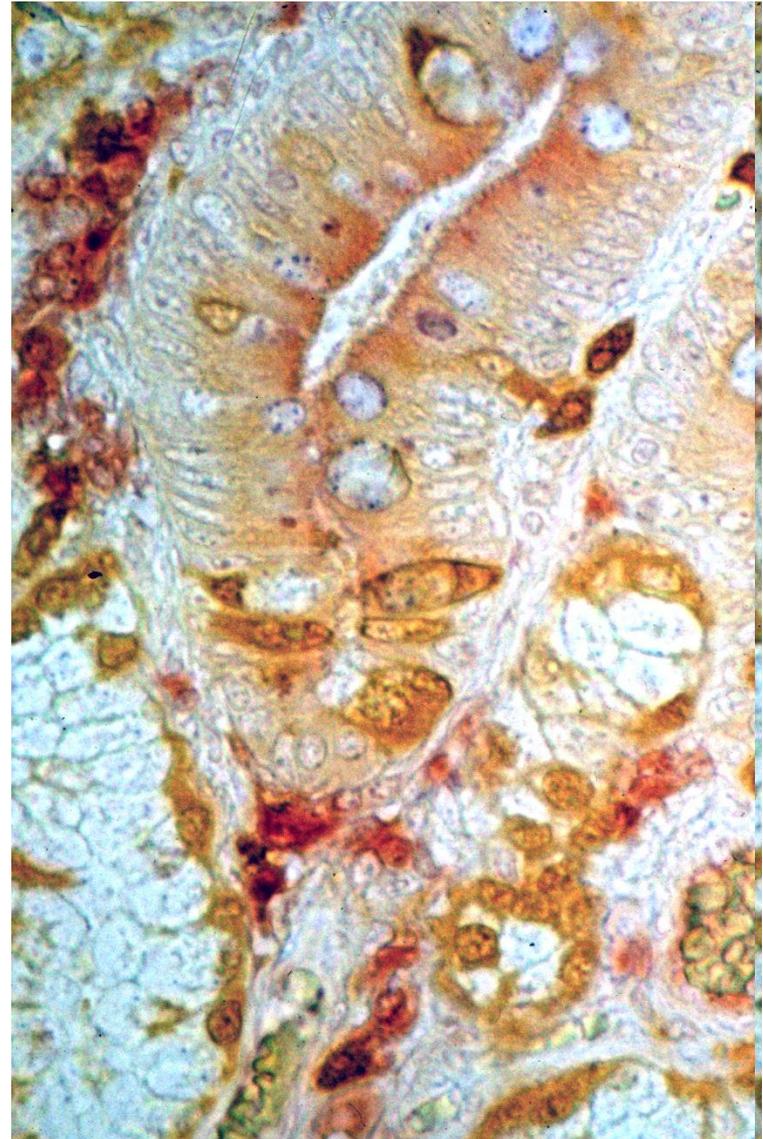


* Los anticuerpos secundarios deben pertenecer a la misma especie

Intestino delgado: demostración de IgA y lisozima



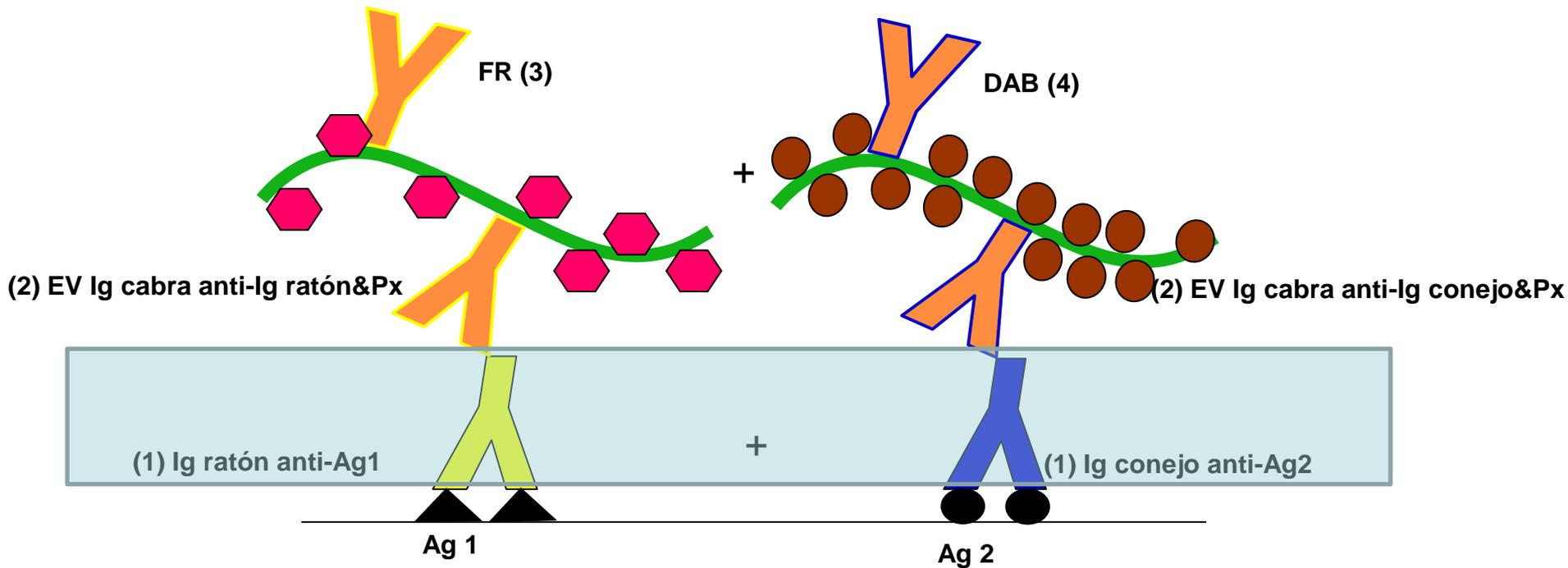
IgA/Fsa-FB + Lis/Px-DAB



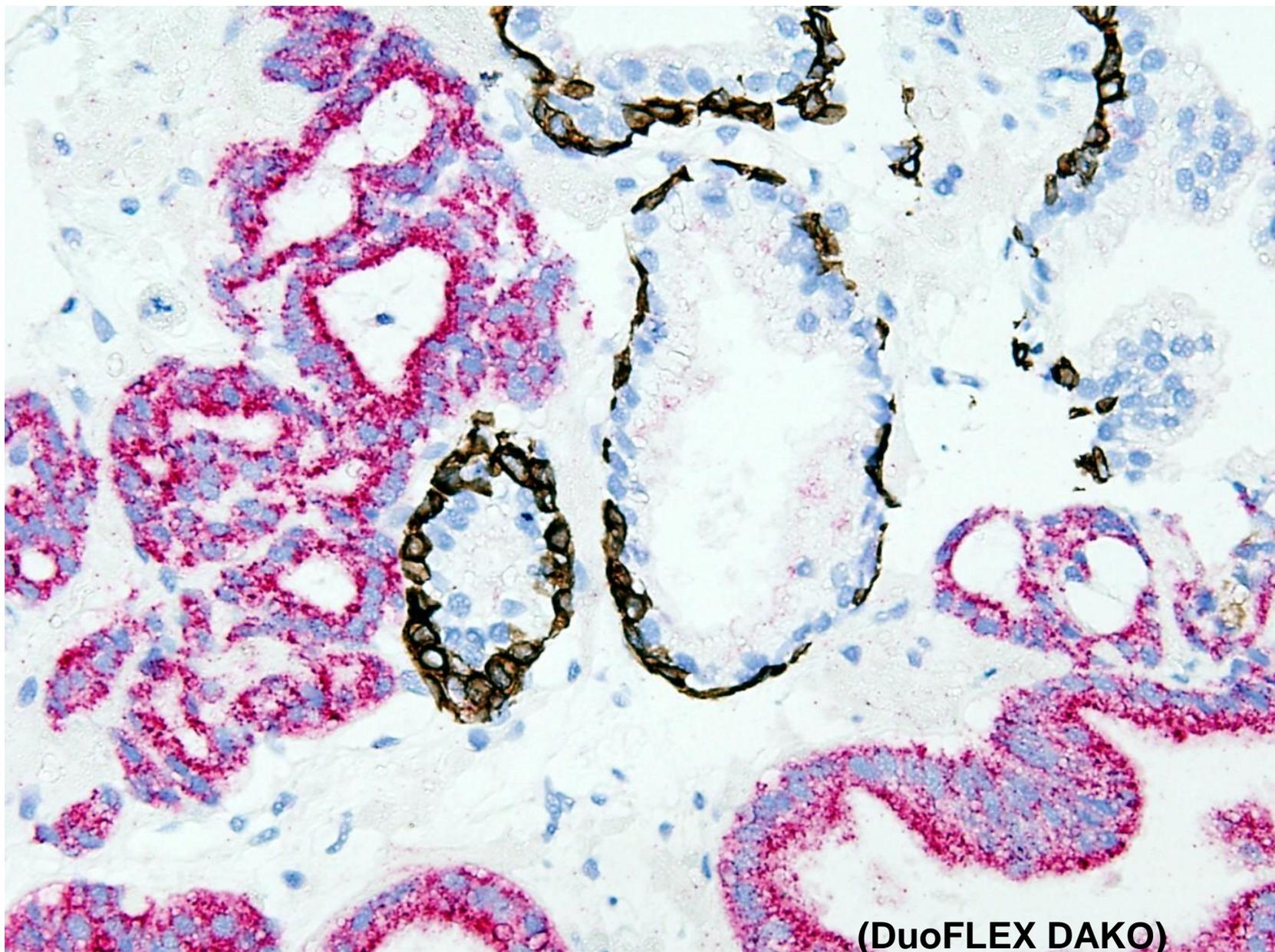
IgA/Fsa-FR + Lis/Px-DAB

1.1. Doble inmunotinción simultánea (DuoFLEX DAKO)

Ejemplo: EV-Fsa-FR (Ag1) + EV-Px-DAB (Ag2)

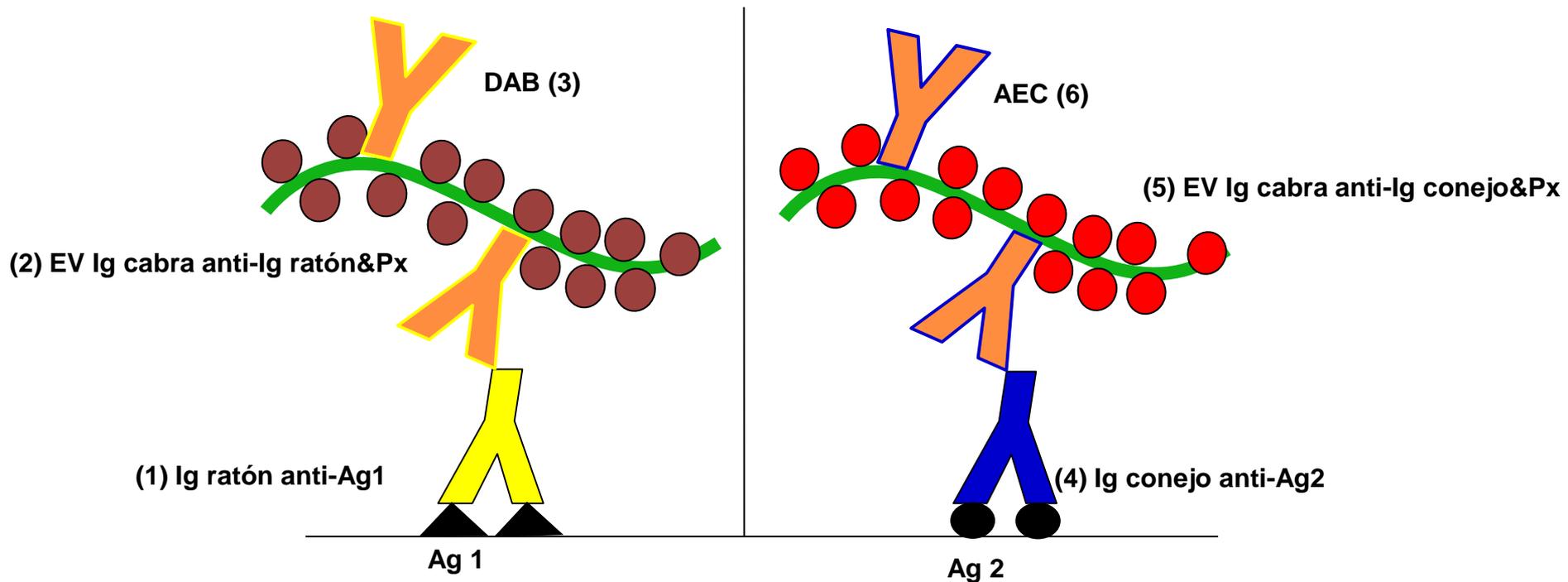


Adenocarcinoma de próstata: Racemasa/FR + CK5/6/DAB



1.2. Doble inmunotinción secuencial (solo si se emplea la misma enzima)

Ejemplo: EV-Px-DAB (Ag1) → EV-Px-AEC (Ag2)



Advertencias:

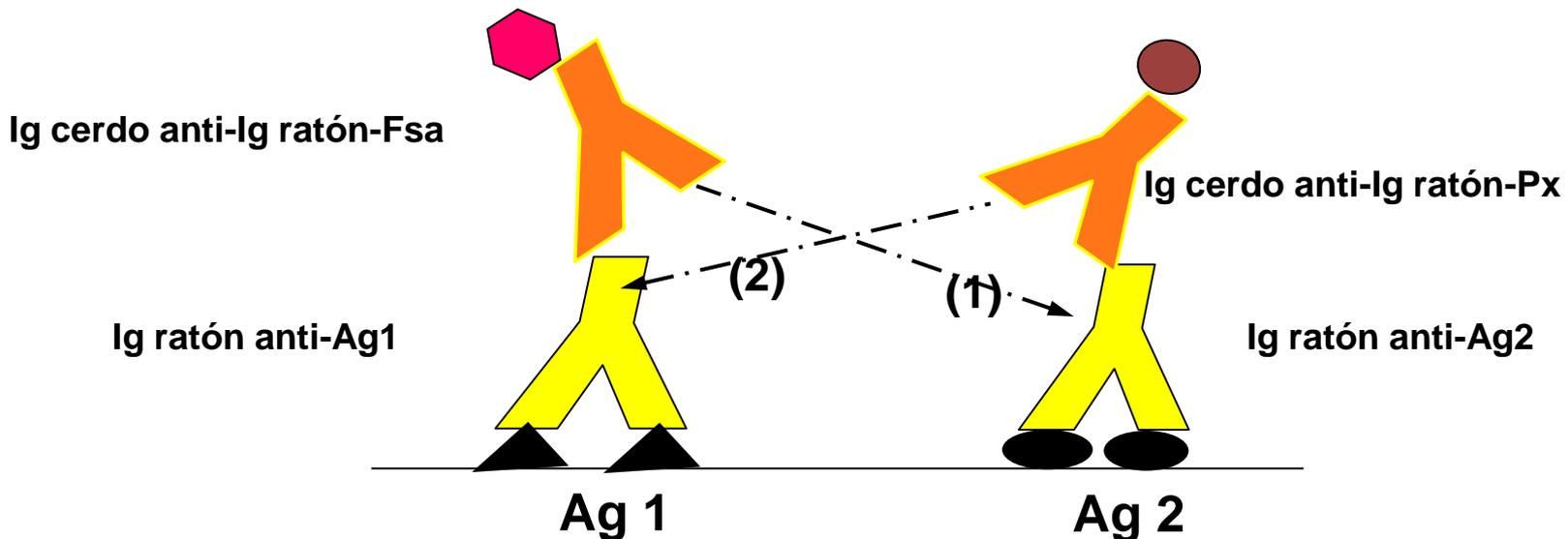
- Elegir como primer antígeno el menos abundante
- Usar la DAB como primer cromógeno

2. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PROCEDENTES DE LA MISMA ESPECIE: Monoclonal-Monoclonal; Policlonal-Policlonal

➔ SECUENCIAL

Posibles reacciones cruzadas:

1. Del Ac específico de la 2ª serie con el Ac secundario de la 1ª serie.
2. Del Ac secundario de la 2ª serie con el Ac específico de la 1ª serie.



Para impedir que se produzcan reacciones cruzadas entre los anticuerpos pertenecientes a las dos cadenas de revelado, existen varias alternativas:

2.1. Enmascarar la 1ª serie de anticuerpos con DAB

2.2. Marcar el anticuerpo específico de la 2ª serie con biotina

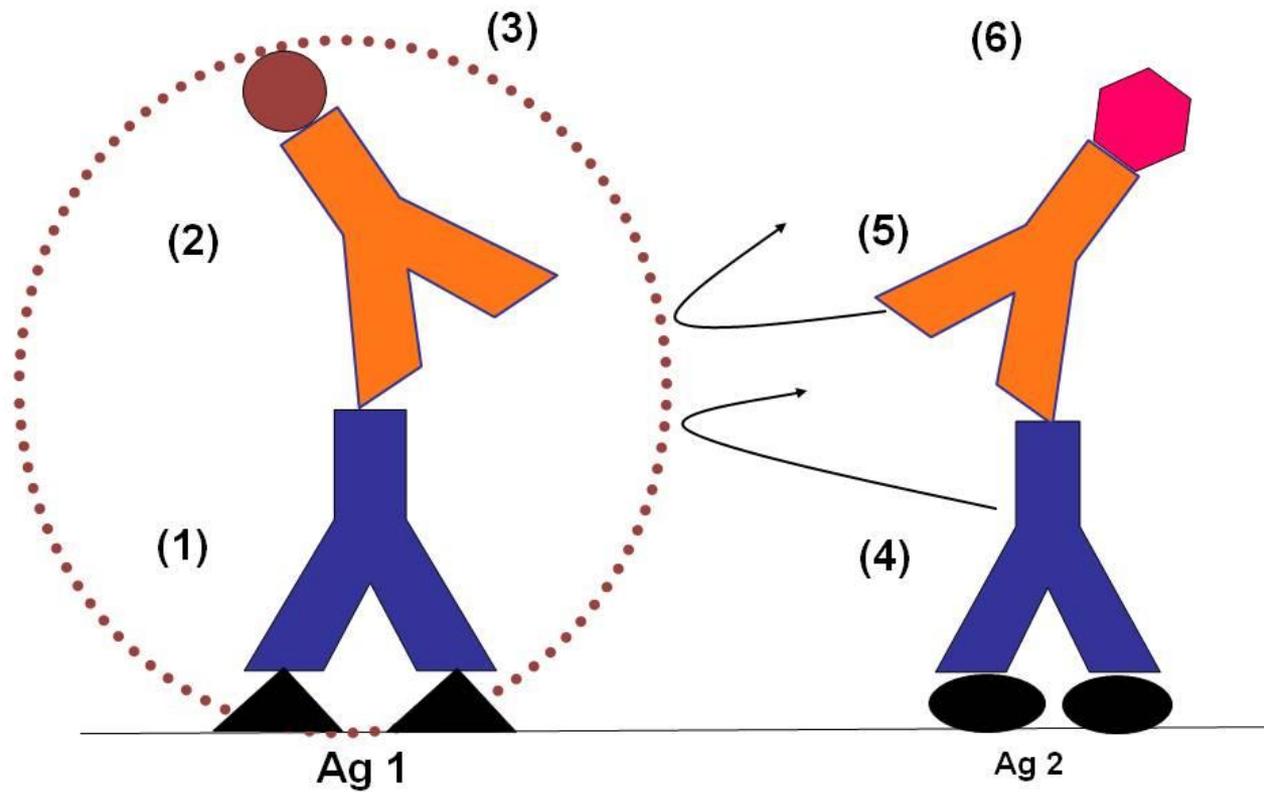
2.3. Preincubar el 2º anticuerpo específico con su anticuerpo secundario biotinado

2.4. Utilizar anticuerpos secundarios monovalentes: F(ab)

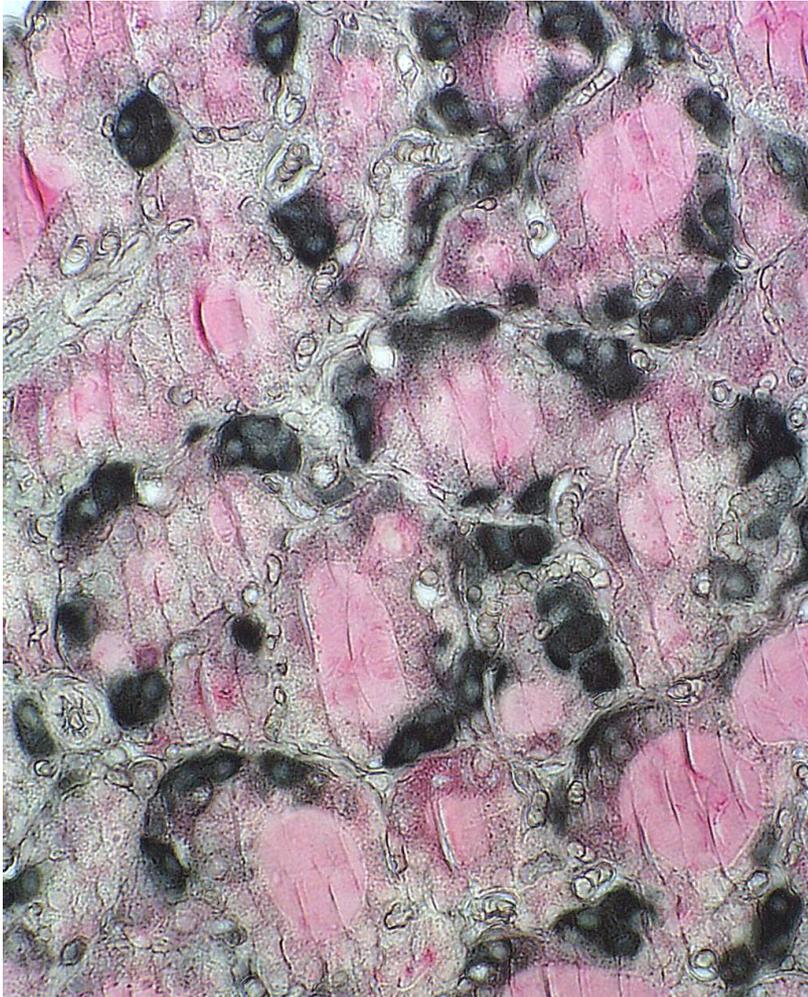
2.5. Eliminar la 1ª serie de anticuerpos mediante elución o calor, una vez que se haya puesto de manifiesto la 1ª actividad enzimática

2.1. ENMASCARAR LA 1ª SERIE DE ANTICUERPOS CON DAB (Stenberger, 1979)

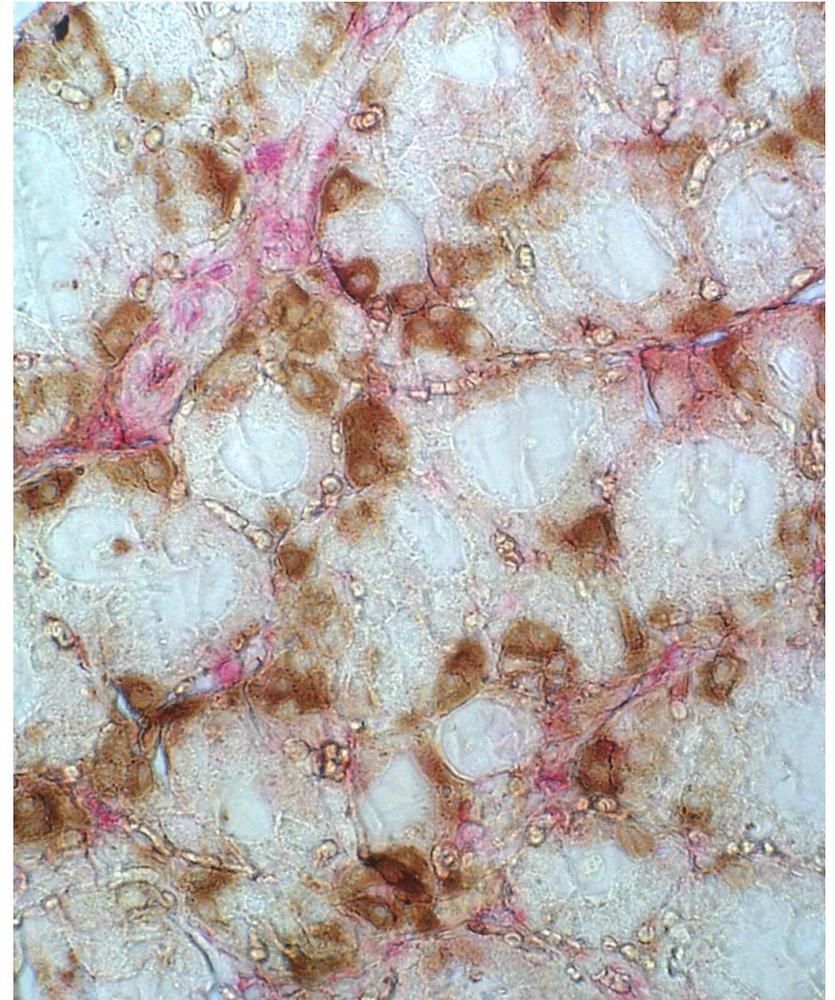
“Efecto coraza o escudo de la DAB”



Tiroides de rata: demostración de CT-TGB y CT-Vm



CT/Px-DAB-Co → TGB/Fsa-FR



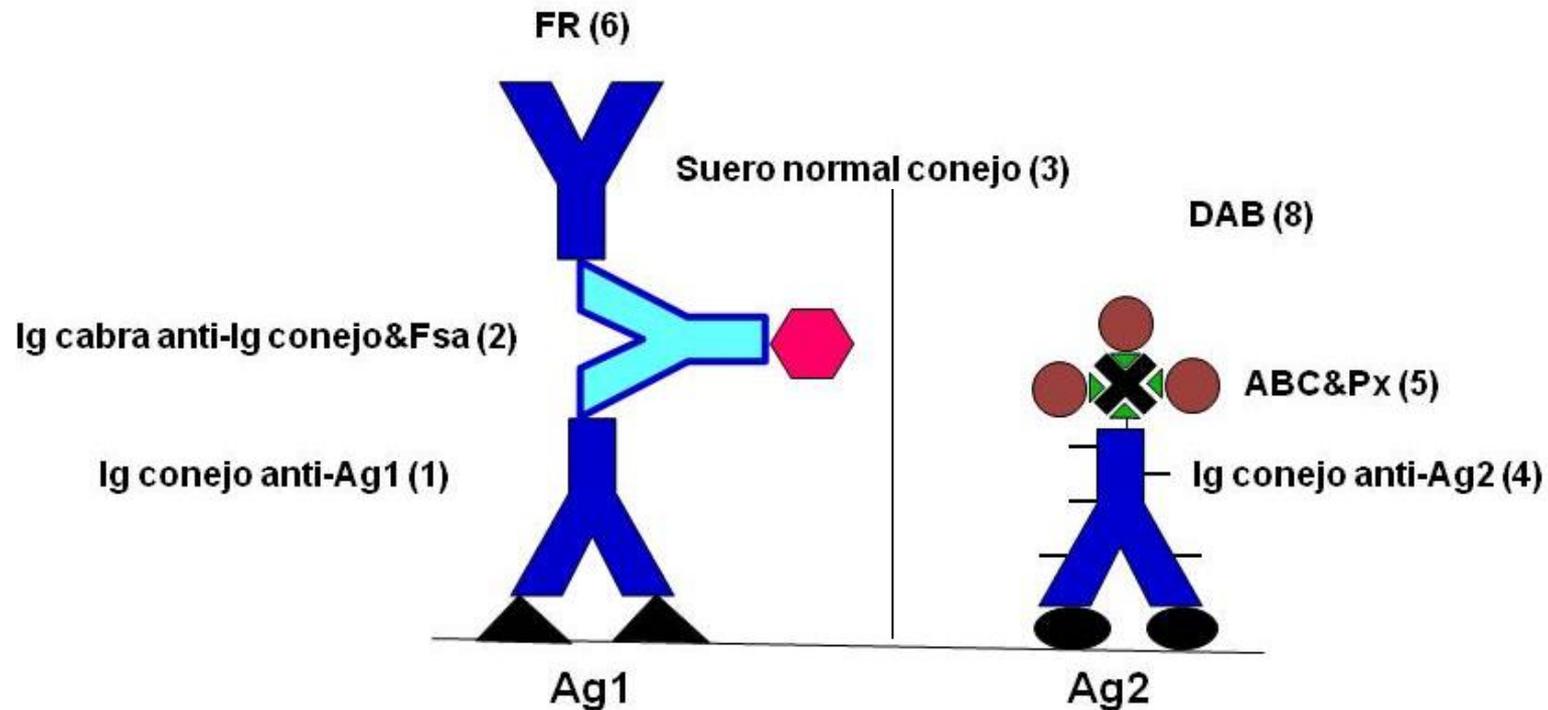
CT/Px-DAB → Vm/Fsa-FR

➔ Precauciones:

- Demostrar en primer lugar el antígeno menos abundante.
- Ajustar la dilución del anticuerpo específico del primer antígeno

2. 2. MARCAR EL ANTICUERPO ESPECÍFICO DE LA 2ª SERIE CON BIOTINA

(Van der Loos et al., 1988, 2000)

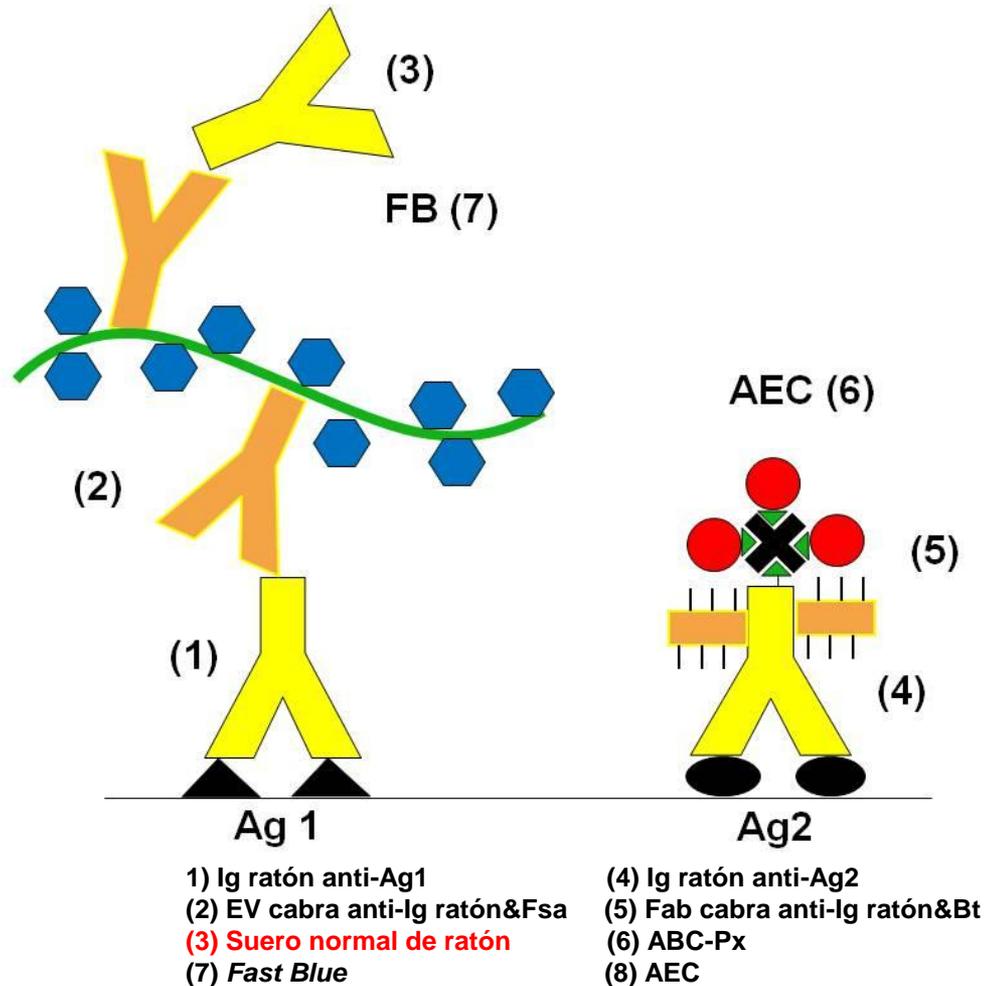


➔ Advertencias:

- En tejidos ricos en biotina endógena, proceder a su bloqueo al inicio
- Tras revelar el primer Ag, siempre se deben bloquear los lugares libres del anticuerpo secundario de la 1ª serie con un exceso de suero normal de la misma especie que los anticuerpos específicos,

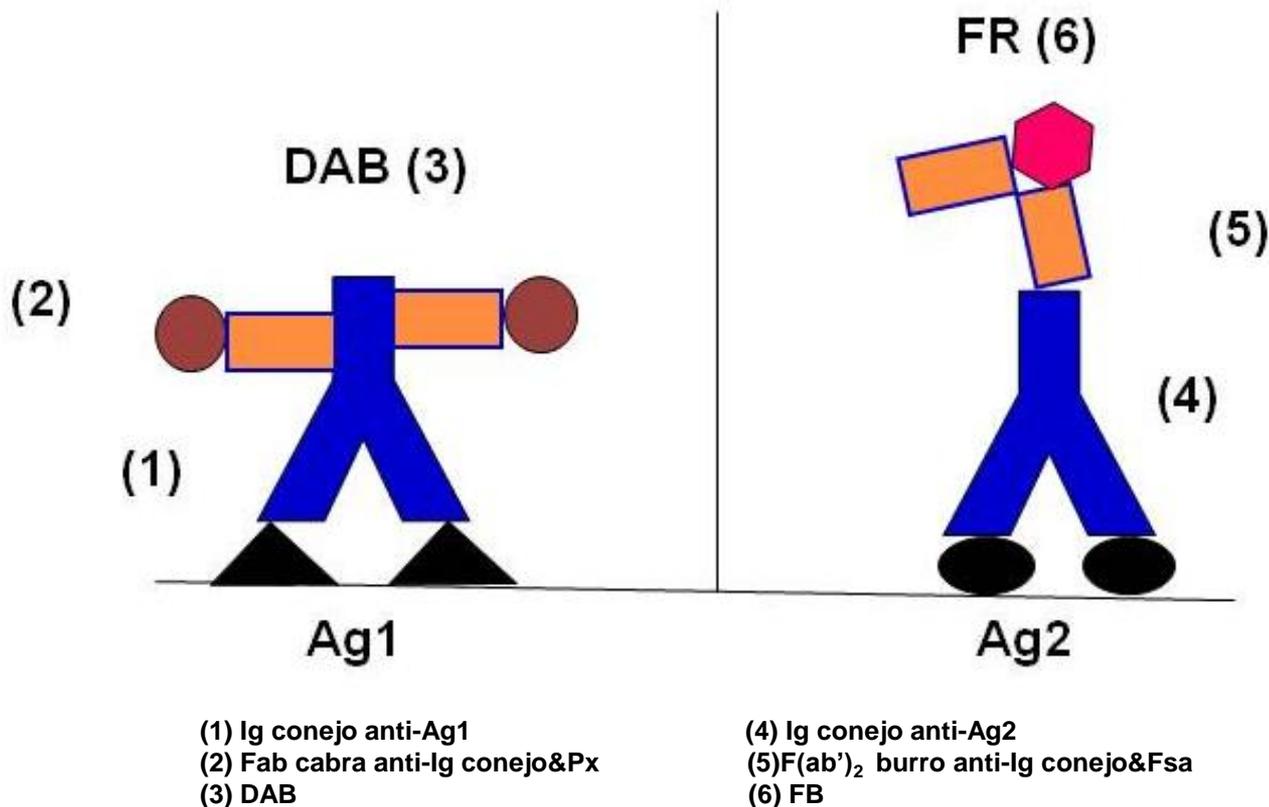
2.3. PREINCUBAR EL ANTICUERPO ESPECÍFICO DE LA 2ª SERIE CON SU ANTICUERPO SECUNDARIO MONOVALENTE BIOTINADO

(Van der Loos y Göbel, 2000).



2.4. UTILIZAR ANTICUERPOS SECUNDARIOS MONOVALENTES: F(ab)

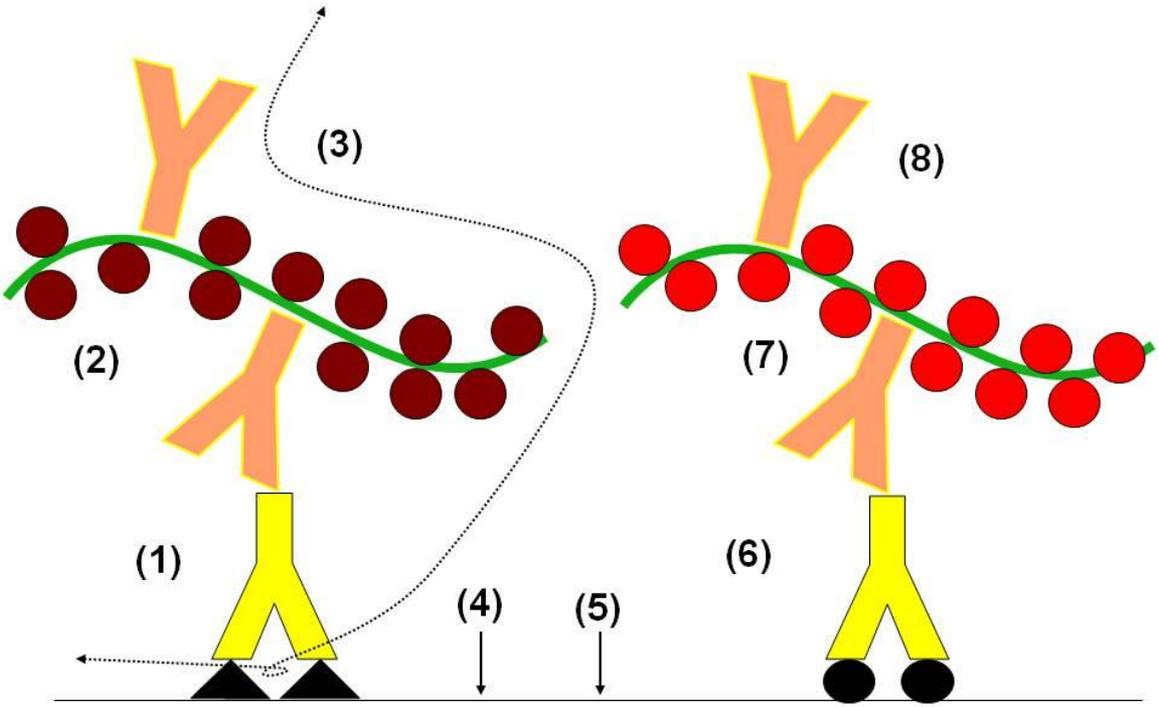
(Negoescu et al, 1994)



2.5. ELIMINAR LA CADENA DE REVELADO DE LA 1ª SERIE: MEDIANTE ELUCIÓN

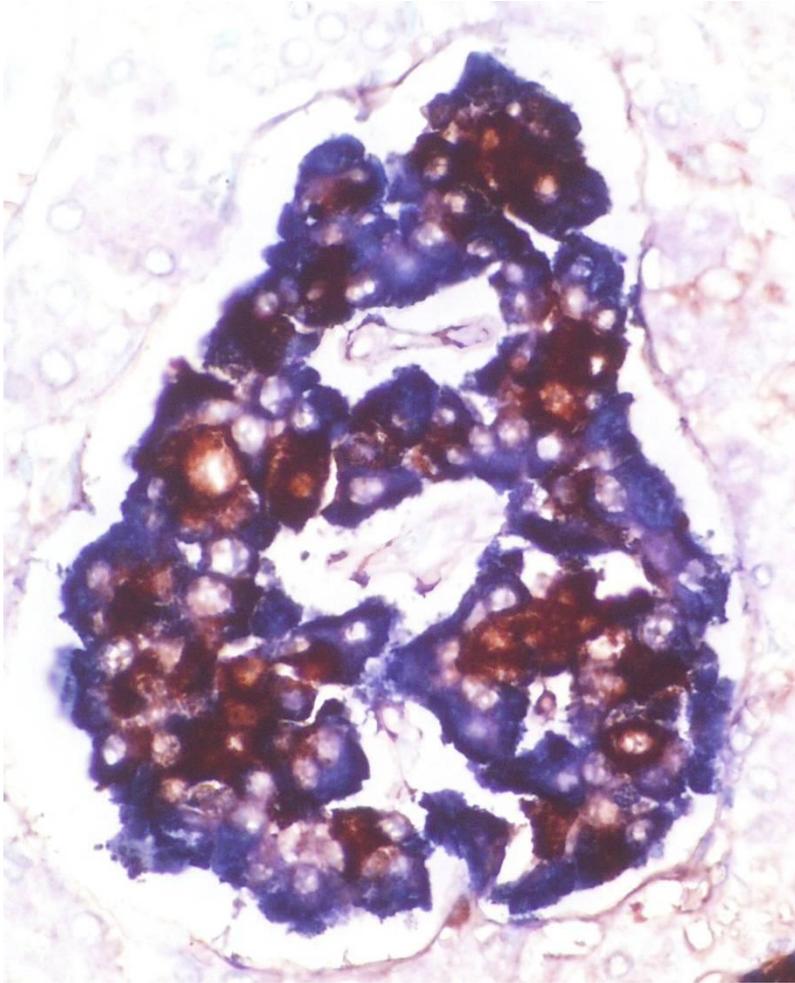
(Nakane, 1968; Pirici, 2009)

Ejemplo: EV-Px-DAB (Ag1) → EV-Px-AEC (Ag2)



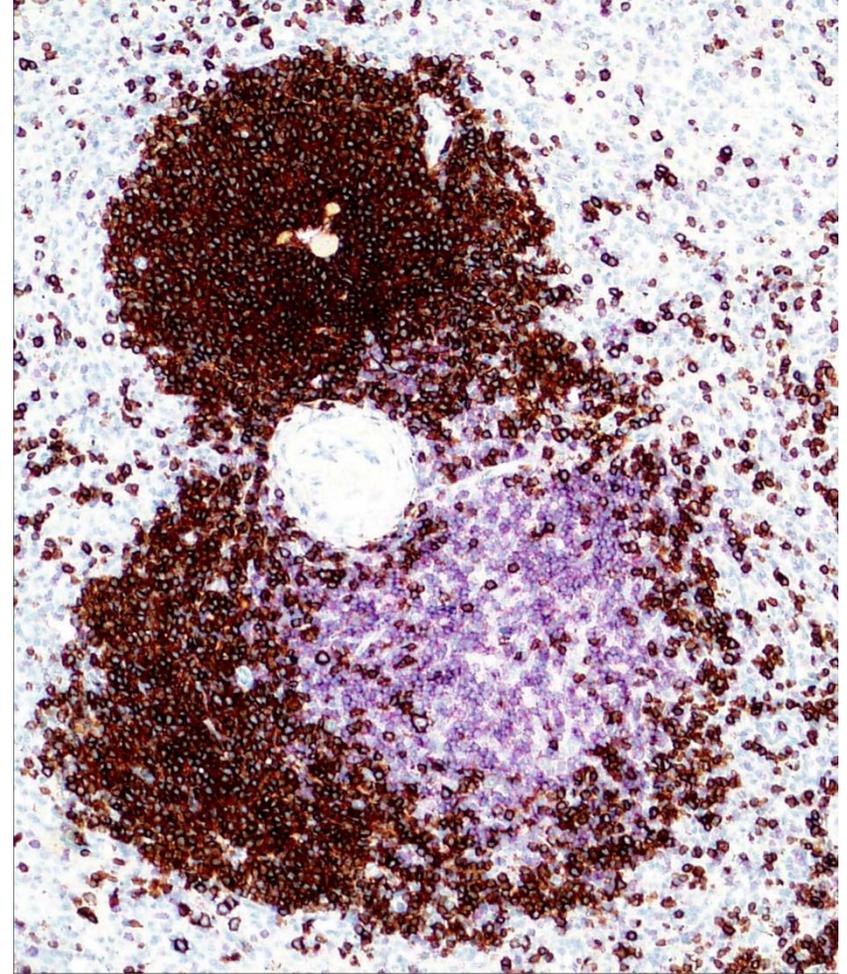
- (1) Ig ratón anti-Ag1
- (2) EV cabra anti-Ig ratón&Px
- (3) DAB
- (4) Glicina-HCl pH 2
- (5) Bloqueo proteínas
- (6) Ig ratón anti-Ag2
- (7) EV cabra anti-Ig ratón&Px
- (8) AEC

Islote pancreático



Glucagón-Px (DAB) → Insulina-Fsa (FB)

Nódulos linfáticos

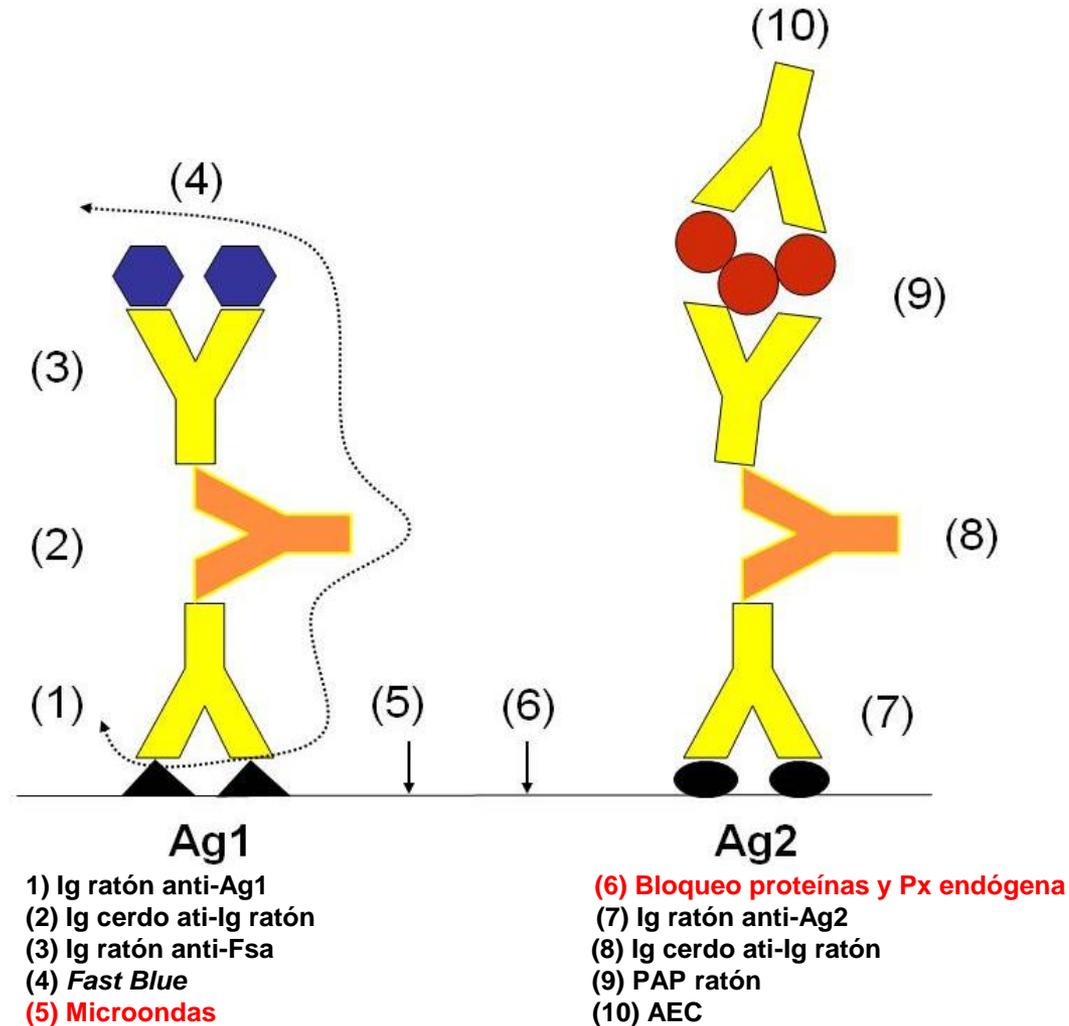


LT-Px (DAB) → LB-Fsa (FB)

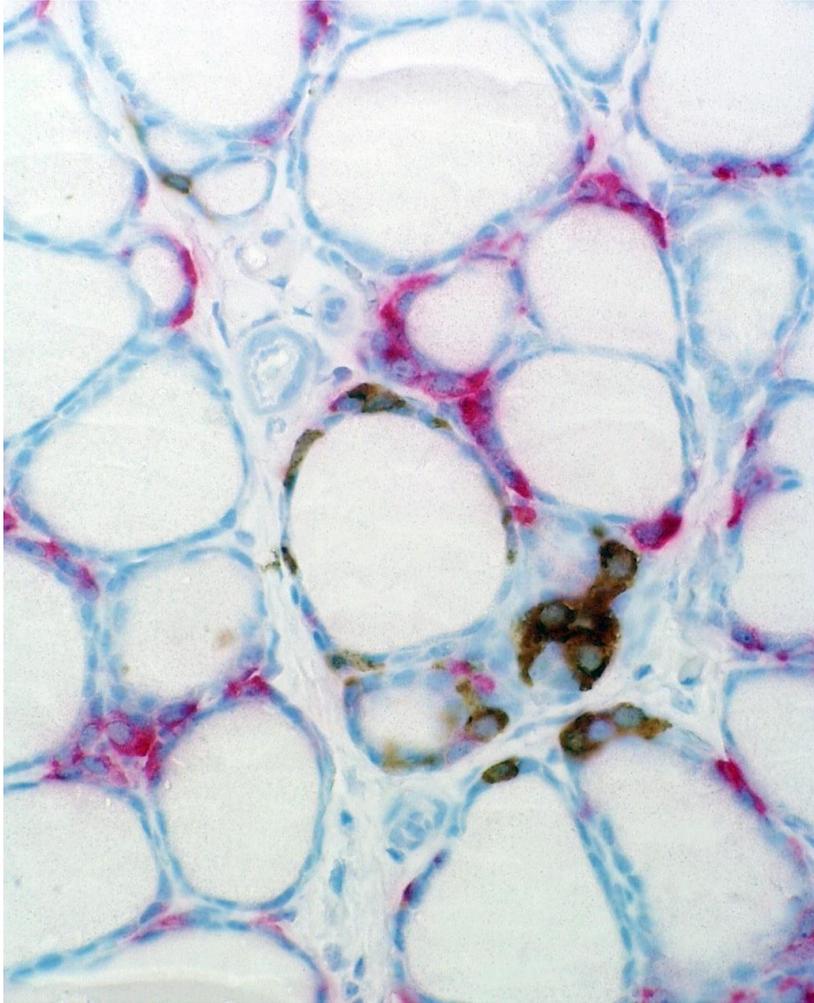
2.5.b. DESNATURALIZAR LA CADENA DE REVELADO DE LA 1ª SERIE MEDIANTE CALOR

(Lan et al., 1995)

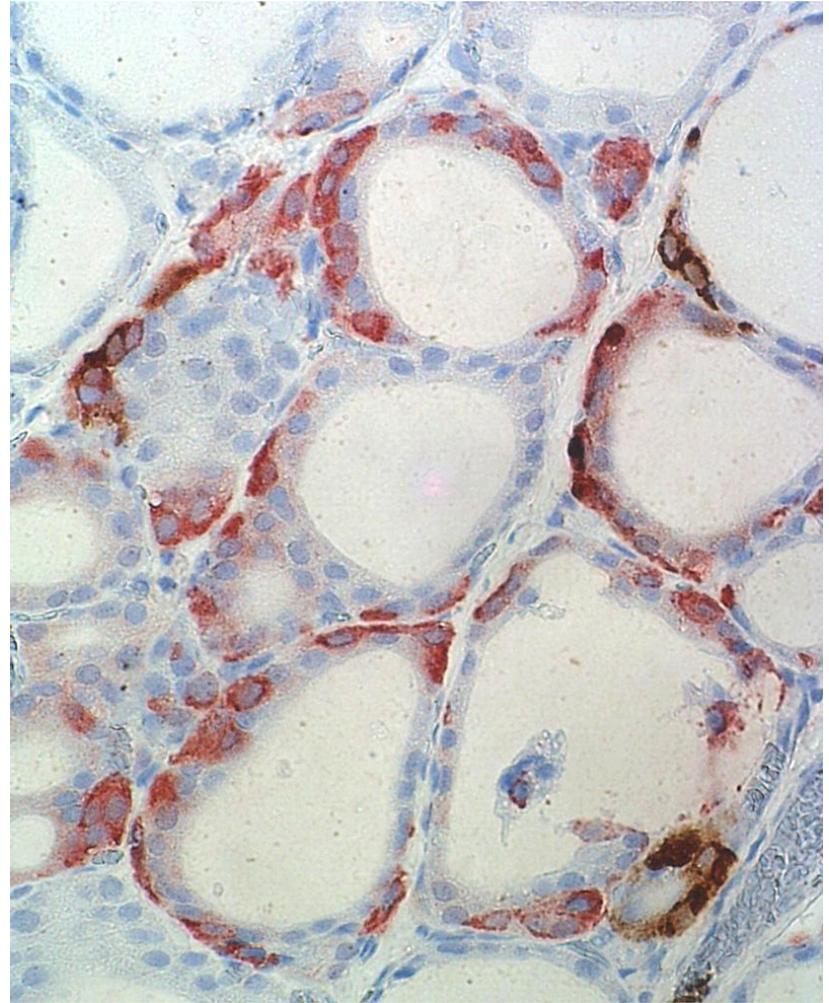
Ejemplo: APAAP-FB (Ag1) → PAP-AEC (Ag2)



Tiroides de rata: células C



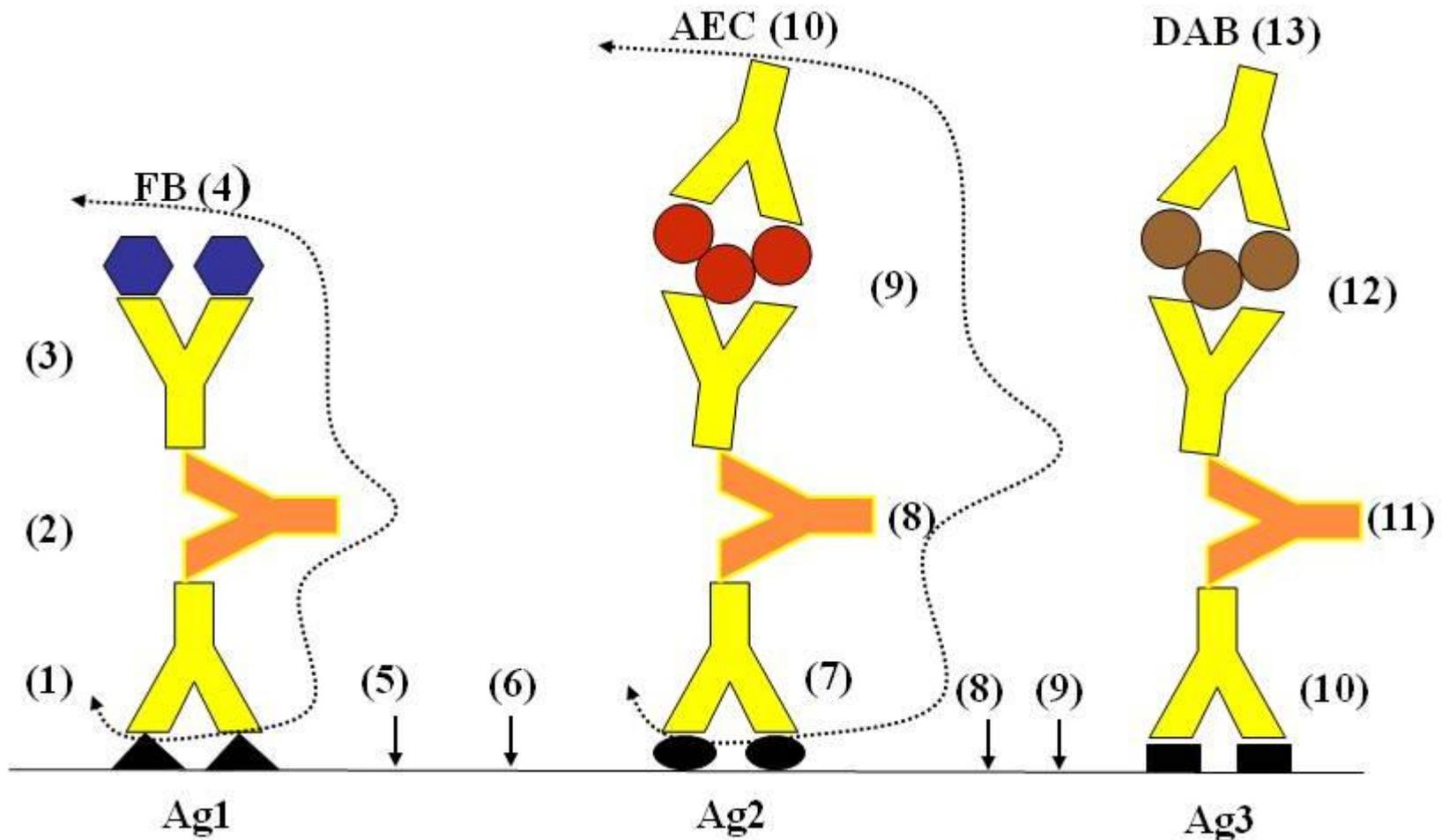
CT/Fsa-NF → **SS/Px-DAB**



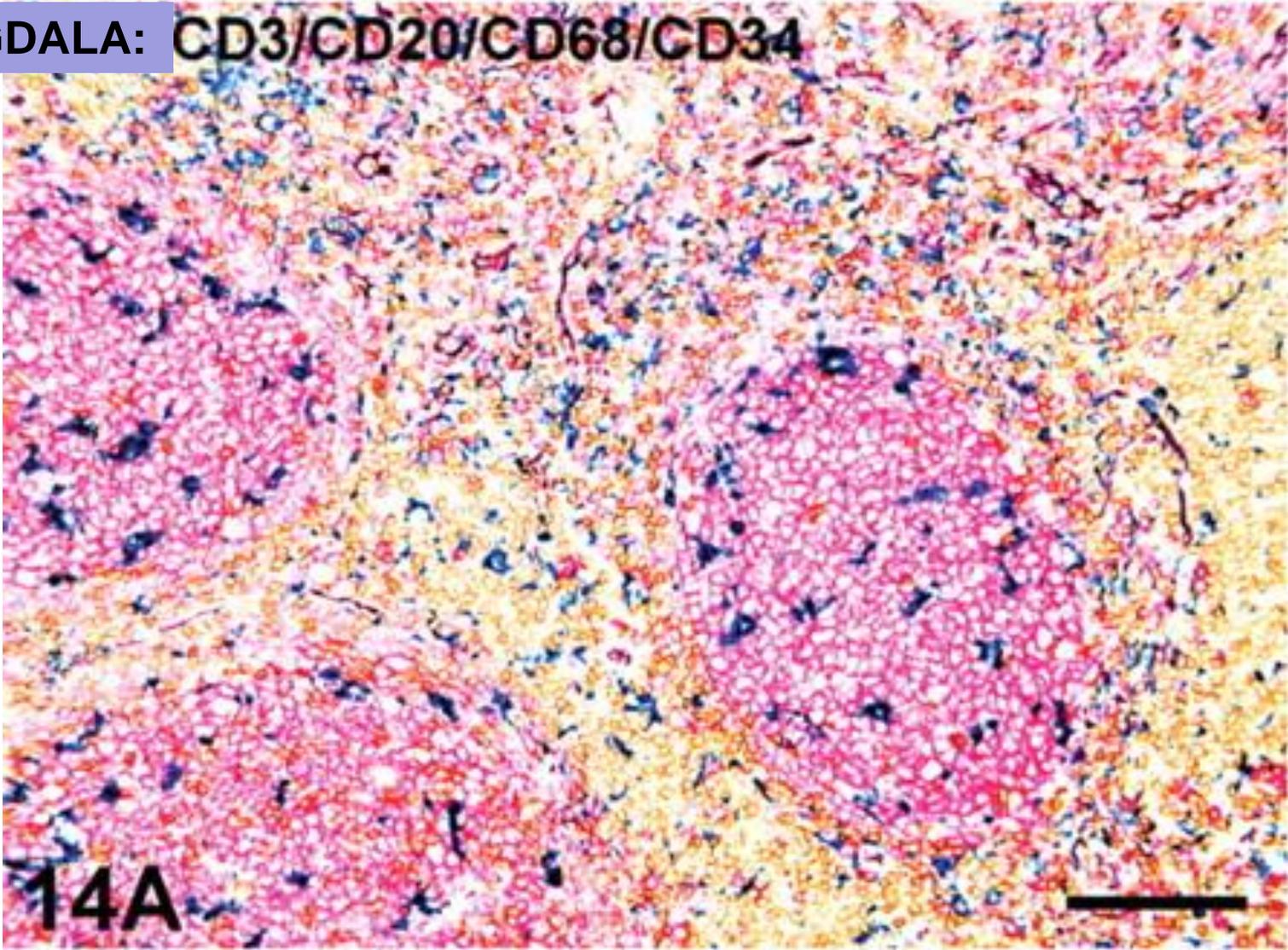
CT/Px-AEC → **SS/Px-DAB**

DEMOSTRACIÓN DE MÁS DE 2 ANTÍGENOS

(Lan et al., 1995)



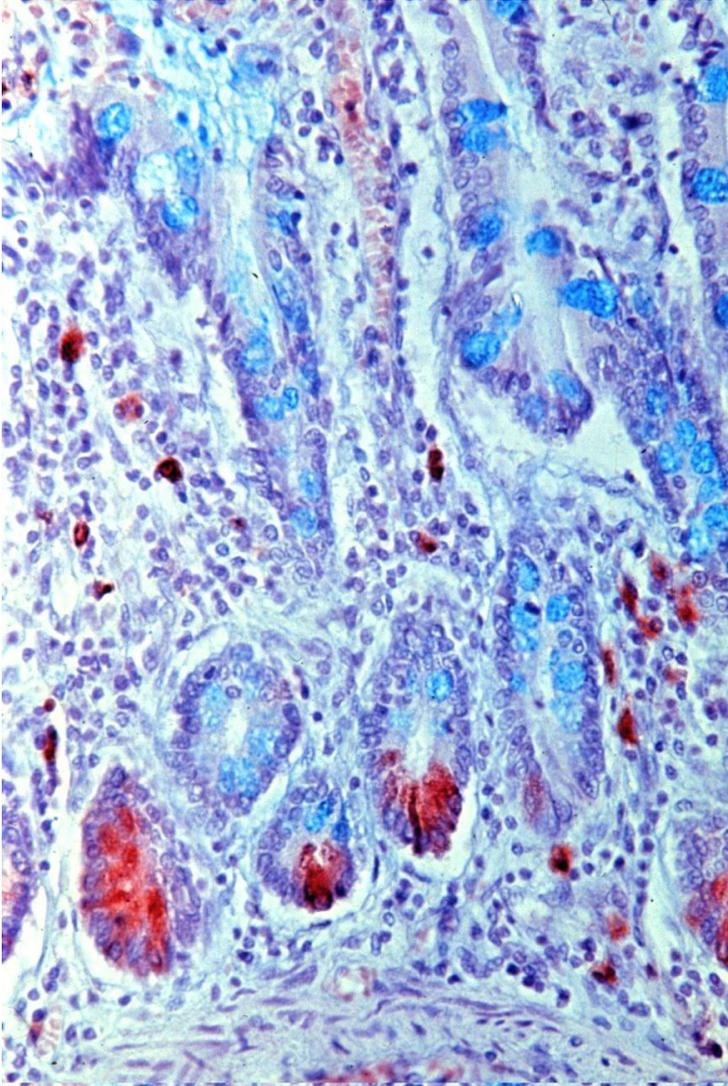
AMIGDALA: CD3/CD20/CD68/CD34



Loos C M v d J Histochem Cytochem 2008;56:313-328

COMBINACIÓN DE IHQ SIMPLE CON HQ

Lisozima-Azul alciano



Lisozima-PAS



COMBINACIÓN DE DOBLE IHQ CON HQ

Mucosa gástrica: **ki67/DAB** + **MGH/FR** + **ConA/DAB-Co**

