

Biología Molecular y Celular. Volumen I

Técnicas y fundamentos

Biología Molecular y Celular.
Volumen I

Técnicas y fundamentos

Juan Peragón Sánchez y M.^a Ángeles Peinado Herreros (eds.)



Biología Molecular y Celular. Volumen 1, Técnicas y fundamentos / Juan Peragón Sánchez y M^a Ángeles Peinado Herreros (eds.) -- Jaén : Editorial Universidad de Jaén, 2019. -- (Ciencias Experimentales. Avances recientes ; 1)

208 p. ; 17 x 24 cm

ISBN 978-84-9159-208-2

I. Ciencias de la Salud I. Peragón Sánchez, Juan , ed.lit. II. Peinado Herreros, María de los Ángeles, ed.lit. III. Jaén. Editorial Universidad de Jaén, ed. 577.2

Esta obra ha superado la fase previa de evaluación externa realizada por pares mediante el sistema de doble ciego

COLECCIÓN: Ciencias Experimentales

Directora: M.^a Ángeles Peinado Herreros

SERIE: *Avances recientes, 1*

© Autores

© Universidad de Jaén

Primera edición, marzo 2019

ISBN: 978-84-9159-208-2

Depósito Legal: J-134-2019

EDITA

Editorial de la Universidad de Jaén
Vicerrectorado de Proyección de la Cultura y Deportes
Campus Las Lagunillas, Edificio Biblioteca
23071 Jaén (España)
Teléfono 953 212 355
web: editorial.ujaen.es



editorial@ujaen.es

DISEÑO Y MAQUETACIÓN
Yerro Servicios Editoriales

IMPRESO

Gráficas «La Paz» de Torredonjimeno, S. L.

Impreso en España/*Printed in Spain*

«Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, www.cedro.org) si necesita fotocopiar, escanear o hacer copias digitales de algún fragmento de esta obra».

Contenido

Prólogo	9
Localización y análisis de moléculas o estructuras celulares mediante distintos tipos de microscopía	11
Introducción	13
Técnicas inmunohistoquímicas	13
<i>Estructura de un anticuerpo</i>	15
Métodos inmunohistoquímicos para microscopía óptica	16
<i>Métodos directos</i>	17
<i>Métodos indirectos</i>	18
<i>Tipos de marcaje utilizado</i>	20
<i>Inmunotinción múltiple</i>	22
Inmunohistoquímica para microscopía electrónica	24
<i>Marcaje con oro coloidal</i>	25
<i>Inmunotinción múltiple</i>	25
<i>Métodos inmunohistoquímicos de uso general en microscopía electrónica</i>	26
<i>Técnicas autorradiográficas</i>	31
Histoquímica de lectinas	32
Cuantificación de la expresión de las moléculas localizadas al microscopio	33
<i>Realización de medidas morfométricas</i>	35
<i>Realización de medidas densitométricas</i>	37
<i>Cuantificación de la colocalización</i>	38
<i>Puntos más importantes del capítulo</i>	39
Bibliografía	40
Integración y análisis de datos mediante biología de sistemas	43
Introducción	44
<i>Biología de sistemas, un enfoque interdisciplinar</i>	44
Microarrays	46
Análisis de datos de expresión bajo un enfoque de biología de sistemas	48

<i>Bases de datos analizadas</i>	48
<i>Herramientas para el tratamiento de los datos</i>	49
<i>Preprocesamiento y normalización</i>	50
<i>Análisis exploratorio</i>	52
<i>Análisis estadístico para la detección de genes diferencialmente expresados</i>	56
<i>Análisis funcional y construcción de redes</i>	58
Ejemplo de aplicación	60
<i>Análisis de datos de microarrays</i>	60
<i>Construcción de redes</i>	64
Limitaciones del uso de microarrays	65
Perspectivas futuras	67
Conclusiones	68
Referencias	68
Subunidades comunes de las RNA polimerasas eucariotas	73
Introducción	74
Rpb5	77
Rpb6	79
Rpb8	82
Rpb10	82
Rpb12	84
Bibliografía	85
Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular	93
Introducción	94
Papel funcional de los microRNAs en la especificación y determinación cardiogénica	99
Expresión diferencial de microRNAs en la maduración ventricular	101
Papel señalizador de los microRNAs en la valvulogénesis cardiaca y en la diferenciación del epicardio	102
MicroRNAs en cardiopatías arritmogénicas	103
Conclusiones y perspectivas	105
Bibliografía	106

El óxido nítrico como modulador del estrés celular en sistemas animales.....	123
La molécula de óxido nítrico	124
Fuentes enzimáticas de NO en sistemas animales: óxido nítrico sintasa	124
Especies de nitrógeno reactivo	126
Generación enzimática y papel fisiológico del NO en sistemas animales	128
<i>Óxido nítrico sintasa neuronal</i>	128
<i>Óxido nítrico sintasa inducible</i>	128
<i>Óxido nítrico sintasa endotelial</i>	129
Señalización por NO	130
<i>Modificaciones post-traduccionales en proteínas: nitración y S-nitrosilación</i>	130
<i>Modificaciones por NO en lípidos: ácidos grasos nitrados</i>	130
RNS y estrés celular	133
<i>Relación entre nitración y daño celular</i>	135
<i>NO y enfermedades neurodegenerativas</i>	135
<i>NO y cáncer</i>	136
<i>NO y enfermedades cardiovasculares</i>	139
Conclusiones y perspectivas.....	140
Summary points.....	147
Lista de abreviaturas.....	148
Bibliografía.....	150
 Biología y métodos de detección de la verticilosis del olivo	 163
Introducción	164
Relevancia y sintomatología de la verticilosis del olivo	166
Biología de <i>Verticillium dahliae</i>	168
<i>El agente causal: taxonomía, características generales y huéspedes</i>	168
<i>Ciclo de vida de Verticillium dahliae</i>	169
<i>Morfológica y fisiológica de aislados de Verticillium dahliae que infectan olivo</i>	170
<i>Diversidad genética y patogénica en Verticillium dahliae</i>	171
<i>Diversidad genética y molecular: correlación con especificidad de huésped, virulencia y distribución geográfica</i>	173

Interacción planta-patógeno durante la infección	178
Tolerancia/susceptibilidad a la infección	182
Métodos diagnósticos	188
<i>Basados en cultivos celulares</i>	189
<i>Basados en la PCR</i>	189
Bibliografía.....	190
Relación de autores.....	207

Prólogo

Juan Peragón Sánchez, M.^a Ángeles Peinado Herreros

Editores

La investigación que se realiza actualmente en las áreas de Biología Molecular y Celular está orientada a la resolución de los principales problemas sanitarios de nuestra sociedad y a la obtención de nuevas herramientas tecnológicas con proyección en el ámbito farmacéutico-sanitario, agrícola, ganadero, industrial y ambiental.

El objetivo de esta obra es doble. En primer lugar, difundir la investigación que se realiza en estos campos en nuestra universidad y entidades colaboradoras y, en segundo, escribir un texto que pueda servir como obra de referencia para los alumnos del Máster Universitario en Biotecnología y Biomedicina por la Universidad de Jaén.

Concretamente, este volumen está dedicado a describir técnicas y fundamentos de biología molecular y celular en los que la contribución particular de los integrantes de los grupos de investigación implicados en dicho máster es muy destacada.

En el primer capítulo se describen las técnicas de microscopía más actuales y su uso como herramientas para localizar y analizar moléculas o estructuras celulares. El Dr. Juan Ángel Pedrosa Raya y sus colaboradores describen las técnicas inmunocitoquímicas a microscopía óptica, de fluorescencia, confocal y a microscopía electrónica y sus aplicaciones.

En el segundo capítulo se describen las herramientas de bioinformática que se utilizan para el análisis de datos procedentes de tecnologías de análisis masivo de proteínas o ácidos nucleicos. El Dr. Francisco Esteban Ruiz y sus colaboradores describen los principales programas informáticos utilizados, con ejemplos concretos que permiten entender la Biología de Sistemas como herramienta de integración y diagnóstico.

En el tercer capítulo, el Dr. Francisco Navarro Gómez y sus colaboradores explican la estructura y función de las subunidades comunes, presentes en las ARN polimerasas de células eucariotas. Estas enzimas son las responsables de la transcripción de la información genética, y en la regulación de su actividad descansa, en gran medida, la regulación de la expresión génica.

En el cuarto capítulo, el Dr. Diego Franco Jaime y sus colaboradores se centran en la descripción de los microARNs y su función durante la cardiogénesis. Son ARNs pequeños no codificantes que regulan la expresión génica de múltiples procesos biológicos en diferentes órganos y tejidos. En este trabajo se describen los microARNs implicados en las diferentes etapas del desarrollo cardiaco y en patologías asociadas.

A continuación, en el quinto capítulo, el Dr. Juan Bautista Barroso Albaracín y colaboradores describen la función del óxido nítrico como modulador del estrés celular y su contribución a la generación y regulación de procesos de carácter patológico en sistemas animales. El óxido nítrico, además de estar implicado en sistemas de señalización celular, puede originar modificaciones funcionales de proteínas y de otras moléculas implicadas en múltiples procesos celulares.

Por último, en el sexto capítulo, el Dr. Francisco Luque Vázquez y colaboradores describen la biología y métodos de detección temprana de la verticilosis del olivo, una de las principales enfermedades que actualmente afecta a este cultivo. Se describe el agente que la produce, la interacción entre el hongo y la planta, aquellos factores asociados a la tolerancia o susceptibilidad varietal a esta enfermedad, así como los métodos de diagnóstico más novedosos.

Como editores de esta obra esperamos que sea útil a los objetivos propuestos, subrayando muy especialmente la contribución de los grupos de investigación de la universidad de Jaén al conocimiento y difusión de la ciencia, en un campo de tanto interés y actualidad como es el de la biología molecular y celular.

Localización y análisis de moléculas o estructuras celulares mediante distintos tipos de microscopía

*Juan Ángel Pedrosa Raya**, *Raquel Hernández Cobo**, *Eva Siles Rivas**, *Esther Martínez-Lara**, *Santos Blanco Ruíz**, *María Luisa del Moral Leal**, *Alma Rus Martínez****, *Francisco Javier Molina Ortega***, *María Ángeles Peinado Herreros**

* Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén; ** Departamento de Fisioterapia, Universidad de Jaén; *** Departamento de Biología Celular, Universidad de Granada

jpgedrosa@ujaen.es

Resumen

Desde mediados del siglo pasado y hasta la actualidad, los investigadores en diferentes campos de las ciencias de la vida han llegado a disponer de un amplio abanico de técnicas, mediante las cuales han podido conocer detalladamente la estructura celular, así como identificar la ubicación exacta en un determinado compartimento celular de prácticamente cualquier molécula de interés biológico. Tal tecnología carecería de utilidad si no se acompañara con el empleo de instrumentos de visualización adecuados, como son los microscopios. La observación de las muestras con cada uno de sus variados tipos aporta una información siempre diferente, pero a la vez complementaria, de las estructuras biológicas. Por otra parte, no solo es importante conocer la localización concreta de las estructuras y moléculas que las componen, sino también cuantificar su expresión, tanto en condiciones normales como experimentales, mediante el uso de aplicaciones informáticas al efecto (programas de análisis de imagen).

En cuanto a las técnicas descritas, destacan las inmunocitoquímicas, de aplicación para microscopía óptica convencional, de fluorescencia, con-

focal y las más actuales de superresolución (STORM y STED), además de la microscopía electrónica. Un interesante aspecto de estas técnicas, que permite estudiar las interrelaciones entre dos o más moléculas en el contexto celular y tisular, es el de su colocalización en la misma muestra, a través de los distintos tipos de microscopios. Por otro lado, la transferencia óptico-electrónica permite la observación del mismo campo de una muestra, primero con el microscopio óptico y luego con el electrónico, sirviendo así de eficaz enlace en el estudio con ambos instrumentos.

Palabras clave: inmunocitoquímica, análisis de imagen, microscopios

Abstract

Since the middle of the last century to the present day, researchers in different fields of life sciences have at their disposal a wide range of techniques that have allowed to know in detail the cell structure and to identify the exact location in a particular cell compartment of practically any molecule of biological interest. For this technology to be useful, it must be accompanied by suitable visualization instruments, such as microscopes. The observation of the samples with each type of microscope provides a different but complementary information of the biological structures. It is not only important to know the specific location of structures and molecules inside cells or tissues, but also to quantify their expression, both in normal and experimental conditions, through the use of image analysis software.

Concerning the previously mentioned techniques, we will focus on the immunocytochemistry, which can be used for conventional light microscopy, fluorescence microscopy, confocal microscopy and the most current superresolution microscopy (STORM and STED), as well as for electron microscopy. Interestingly, the immunocytochemistry allow to study the interrelations between two or more molecules inside a cell or a tissue, using the different types of microscopes, through their colocalization in the same sample. On the other hand, the optical-electronic transfer allows to observe the same field of a sample, first with the optical microscope and then with the electronic microscope, thus serving as an effective link for the study of a sample with both instruments.

Keywords: *immunocytochemistry, image analysis, microscopes*

Introducción

Desde mediados del siglo pasado y hasta la actualidad, los investigadores en diferentes campos de las ciencias de la vida han llegado a disponer de un amplio abanico de técnicas, mediante las cuales han podido conocer detalladamente la estructura celular, así como identificar la ubicación exacta en un determinado compartimento celular de prácticamente cualquier molécula de interés biológico. Tal tecnología carecería de utilidad si no se acompañara con el empleo de instrumentos de visualización adecuados, como son los microscopios. La observación de las muestras con cada uno de sus variados tipos aporta una información siempre, diferente pero a la vez complementaria, de las estructuras biológicas. En el presente capítulo se estudiarán algunas de las mencionadas técnicas, concretamente aquellas que tienen su base en las reacciones inmunohistoquímicas, dada su extremada especificidad en la detección de múltiples moléculas presentes en los diferentes compartimentos celulares y tisulares. Los productos de tales reacciones pueden visualizarse a través de cualquier modelo de microscopio, con las consiguientes ventajas en cuanto al tipo de información suministrada en cada caso. Por ello se tratarán por separado las técnicas referidas a la microscopía de luz, por un lado, y a la electrónica, por otro. Igualmente, y dado que no solo es importante conocer la localización concreta de las estructuras y moléculas que las componen, sino también cuantificar su expresión, se tratará además del uso de aplicaciones informáticas (*programas de análisis de imagen*) capaces de llevar a cabo este cometido.

Técnicas inmunohistoquímicas

Se basan en la existencia de dos tipos de moléculas presentes habitualmente en los seres vivos (*anticuerpos* y *antígenos*) y su capacidad para unirse específicamente entre sí, dando un *complejo antígeno-anticuerpo*. Tal complejo puede visualizarse, bien directamente o tras su unión a determinados marcadores que lo ponen en evidencia a través de los diferentes microscopios. Concretamente, estas técnicas tratan de conocer la ubicación a nivel celular de cualquier compuesto biológico con carácter antigénico, por su capacidad de unirse a un anticuerpo específico que se pone en contacto con una muestra obtenida del individuo, durante el tiempo y a la concentración necesaria para que se produzca el citado complejo de unión. Cuando posteriormente sea observada al microscopio la muestra, según el tipo de marcaje empleado, se hará perfectamente visible la localización exacta de la molécula problema, pudiendo incluso cuantificarse su expresión. En

el caso de la microscopía de luz y dada la alta especificidad de la reacción, solamente se observarán las estructuras marcadas, permaneciendo el fondo transparente, siendo necesaria la aplicación de colorantes convencionales (*tinción de contraste*) para la oportuna orientación topográfica con el resto de componentes tisulares. En la **Figura 1** se presentan varios ejemplos de los resultados obteni-

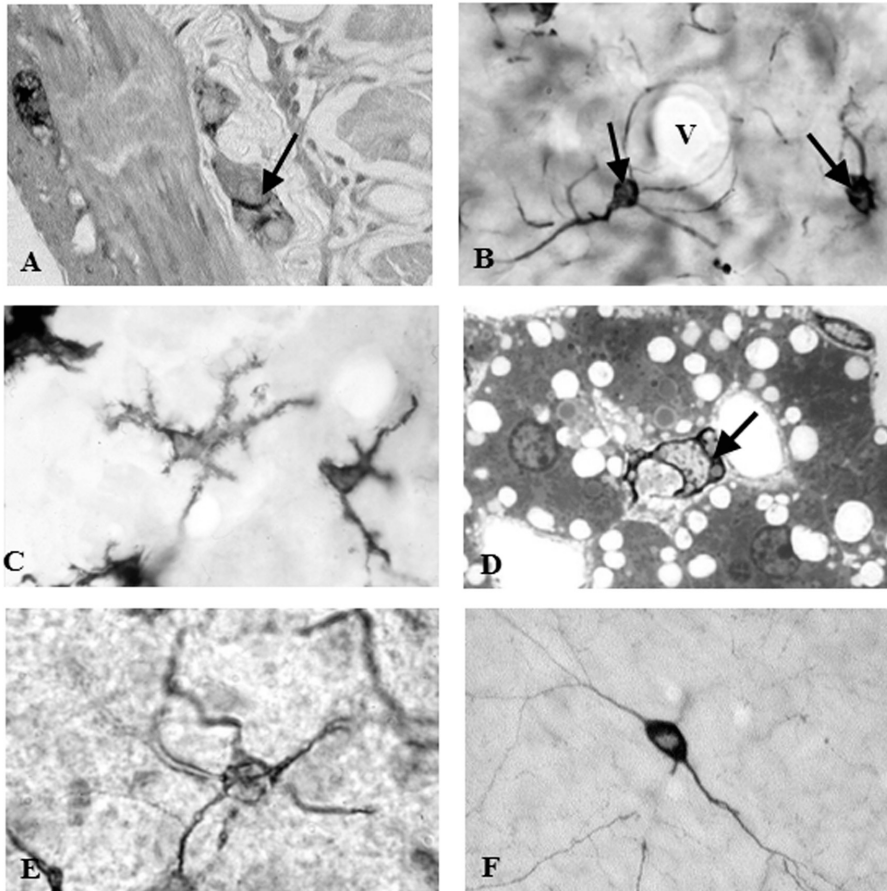


Figura 1. Composición fotográfica mostrando el resultado de varias inmunotinciones, en las que se han utilizado diferentes anticuerpos. A: Proteína S100 en intestino (neuronas en ganglio mientérico, flecha). B: Proteína glial fibrilar ácida (GFAP) sobre hígado, marcaje de células estrelladas (flechas) en torno a un vaso sanguíneo (V). C: Receptor de hormona concentradora de melanina (MCH-II) sobre hígado, marcaje de células de Kupffer. D: glutation S transferasa (GST7) sobre corte semifino de hígado, contrateñido con azul de toluidina, marcaje en negro de célula estrellada (flecha) (preparación procedente de transferencia óptico electrónico; explicación en el texto). E: vimentina sobre hígado, contrateñido con hematoxilina, marcaje de célula estrellada. F: isoforma neuronal de óxido nítrico sintetasa, sobre cerebro, marcaje de neurona.

dos con este tipo de técnicas a nivel de microscopía de campo claro. Existe una abundante literatura, a la cual se remite al lector, donde se recogen los detalles de estas metodologías (Peinado *et al.*, 1996; Polak y Van Noorden, 1997; Martín-Lacave, García-Caballero, 2012; Burry, 2010; Polak y Priestley, 1992), exponiéndose a continuación solo algunos aspectos generales de los protocolos, no sin antes dar una breve idea de qué es un anticuerpo y cuáles son sus tipos.

Estructura de un anticuerpo

Se trata de macromoléculas del tipo de las inmunoglobulinas G (IgG), formadas por dos cadenas ligeras y otras dos pesadas, ambas idénticas entre sí y unidas por puentes disulfuro, adoptando una forma de Y (**Figura 2**). Cada cadena presenta una *región variable*, con una secuencia de aminoácidos típica del anticuerpo en cuestión, a través de la cual se establece la unión con los *epítomos* o determinantes antigénicos en el tejido, y una *región constante*, característica de la especie que corresponda. Cuando la molécula de anticuerpo se degrada enzimáticamente, se descompone en dos fragmentos: *Fab*, conteniendo las regiones variables, y *Fc*, incluyendo las fijas.

En la puesta a punto de cualquier técnica inmunohistoquímica, una vez elegida la molécula con poder antigénico cuya ubicación se quiere determinar, es necesario ante todo disponer de un anticuerpo que se una específicamente a los epítomos existentes en el tejido. Para ello se utiliza un animal de experimentación,

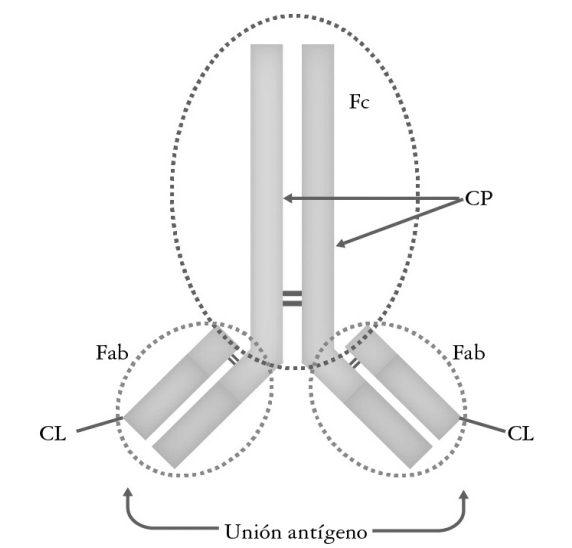


Figura 2. Representación esquemática de una molécula de anticuerpo, donde aparecen las cadenas pesadas (CP) y las ligeras (CL), de menor tamaño, unidas por puentes disulfuro (pequeños segmentos). Se indican también las zonas de unión con el antígeno complementario, así como las regiones Fc y Fab (en líneas de puntos). Las regiones constantes de cada cadena aparecen en azul (gris claro) y las variables, en gris oscuro.

al cual se inyecta la molécula con poder antigénico, con la finalidad de que su sistema inmunológico produzca el anticuerpo esperado. No obstante, existen dos tipos posibles de anticuerpos a obtener: *policlonales* y *monoclonales*.

Anticuerpos policlonales

Su obtención es básicamente como se ha comentado antes: inyección del antígeno a un animal (conejo, cabra, oveja, ratón son los más utilizados), con lo que éste queda inmunizado. Posteriormente se hacen otras dos inmunizaciones a intervalos de tiempo determinados, con lo que se consigue finalmente una alta concentración en plasma sanguíneo del anticuerpo deseado, el cual habrá de ser separado y purificado de la sangre extraída al animal. Se trata de un anticuerpo policlonal, puesto que realmente es una mezcla de distintos anticuerpos frente a diferentes epítomos del mismo antígeno, cada uno derivado de un clon de linfocitos B, las células responsables de su producción.

Anticuerpos monoclonales

El procedimiento de extracción, más complejo que en el caso anterior, fue puesto a punto por Köhler y Milstein (Premios Nobel de Medicina y Fisiología en 1985). Se inicia con la inyección al animal de experimentación del antígeno complementario al anticuerpo que se quiere obtener. Seguidamente, se extrae el bazo del animal y una suspensión de los linfocitos B que contiene, capaces de producir anticuerpos específicos frente diferentes epítomos del antígeno utilizado en la inmunización. A continuación, mediante técnicas de ingeniería genética, se fusionan dichos linfocitos con una suspensión de células de un tumor (mieloma) procedentes de un cultivo. De esta forma, aislados en un medio de selección, se obtienen *hibridomas*, células capaces de crecer de forma indefinida, produciendo un único tipo de anticuerpo, ya que proceden de un solo clon de linfocitos B (monoclonal). Estos anticuerpos gozan de una mayor especificidad que los policlonales, puesto que reconocen un solo epítomo, y no varios como aquellos.

Métodos inmunohistoquímicos para microscopía óptica

Según su mayor o menor complejidad, estas técnicas pueden ser de dos tipos: directas o indirectas, según que se utilice una sola molécula de anticuerpo (primario) o dos o más que luego se unirán entre sí (secundario, terciario).

Métodos directos

Consisten en una reacción de un único paso, en el que un anticuerpo que ha sido marcado tras su obtención (*primario*) se une, a través de la zona de unión de su molécula, con el correspondiente determinante antigénico presente en las células o tejidos. El marcaje se hace uniendo el anticuerpo a sustancias que hagan visible al microscopio el complejo de unión epítipo-anticuerpo, tales como fluorocromos, materiales radioactivos, enzimas, etc. (Figura 3).

En estos métodos, al igual que en los indirectos, que se expondrán a continuación, es imprescindible la realización de *controles* para tener la seguridad de que el resultado observado obedece a la reacción esperada y no a uniones inespecíficas que den falsos positivos. Dichos controles consisten en la omisión de alguno de los pasos de la reacción (*negativos*) o en el procesado de muestras donde se sabe con seguridad que existe el antígeno buscado (*positivos*). Es habitual llevar a cabo de forma previa a la reacción inmunohistoquímica el tratamiento con un detergente que abra poros en las membranas celulares para facilitar el paso de los anticuerpos. También es importante el cálculo previo de la dilución más idónea en tampón del anticuerpo marcado para obtener una señal óptima. Si esta dilución no es la

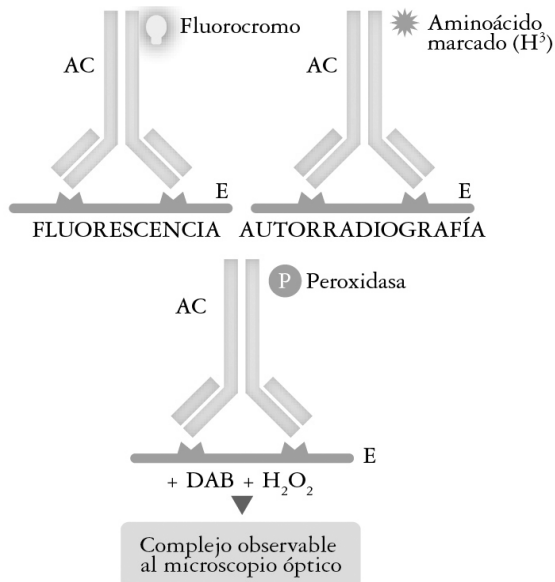


Figura 3. Esquema de un método inmunocitoquímico directo, utilizando un anticuerpo primario (AC), unido a diferentes marcajes (fluorocromo, compuesto marcado radiactivamente o peroxidasa), el cual se une específicamente al epítipo situado en el tejido (E), dando una señal visible al microscopio de fluorescencia u óptico, según cada caso.

adecuada, no se obtendrá la intensidad necesaria en la reacción de inmunotinción o esta será demasiado intensa, ocasionando un fondo inespecífico en la preparación histológica obtenida. En el procedimiento general de preparación de las muestras, antes de ponerlas en contacto con el anticuerpo, es necesario tener en cuenta factores que intervienen en el proceso, tales como el tipo de fijador utilizado (algunos pueden afectar a la antigenicidad del tejido, disminuyendo o eliminando la señal) o el uso de determinados medios habituales de inclusión como la parafina, que necesita altas temperaturas que podrían afectar también a la antigenicidad.

Métodos indirectos

Además del anticuerpo primario, se utilizan uno o dos más (*secundario, terciario*), marcado el último de ellos, que se van uniendo entre sí, hasta dar un complejo final de elevado tamaño que incrementa la señal inmunohistoquímica. El anticuerpo secundario se habrá producido en un animal diferente al del primario, mientras que, si se usa un terciario, este volverá a estar desarrollado en la misma especie que el primario. En caso de utilizarse tres anticuerpos, el secundario estará a una dilución baja con respecto al primario para evitar que sus dos regiones Fab se unan al primario y quede una libre que lo haga con el terciario. Frente a los métodos directos, tienen la ventaja de amplificar la señal inicial, como ya se ha comentado, pues a cada anticuerpo primario se unen varios secundarios, con lo que al final se origina mayor cantidad de producto de reacción, siendo por esta razón los procedimientos más utilizados.

Como ejemplo de un método indirecto con tres anticuerpos se describe a continuación el que utiliza la enzima peroxidasa, procedente del rábano picante, la cual se utiliza luego para poner en evidencia (*revelar*) la señal visible del complejo de unión, mediante una reacción de tipo histoquímico. Los pasos a seguir son los siguientes (**Figura 4**):

1. Bloqueo previo de la peroxidasa endógena existente de forma natural en el tejido, añadiendo el sustrato de la enzima (agua oxigenada).
2. Incubar con el anticuerpo primario contra el antígeno que se quiere demostrar, obtenido por ejemplo en conejo, durante el tiempo y a la dilución previamente establecidos.
3. Incubar con el anticuerpo secundario, complementario al primario, obtenido en diferente especie que este (oveja).
4. Incubar en el anticuerpo terciario, obtenido en conejo, contra el secundario y marcado con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa, *PAP*.
5. Revelado mediante una reacción histoquímica de oxidación-reducción, añadiendo agua oxigenada que se reduce, en presencia de un donador de

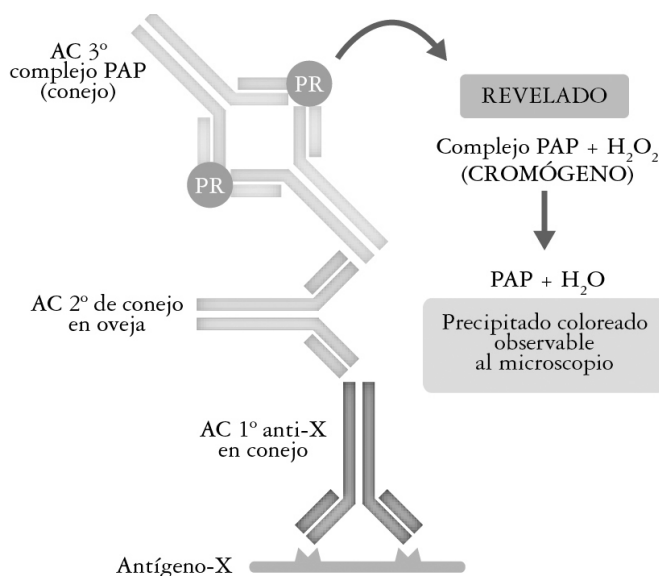


Figura 4. Esquema simplificado del método indirecto con peroxidasa-antiperoxidasa. Se utilizan sucesivamente tres anticuerpos. El revelado del complejo final PAP se lleva a cabo con agua oxigenada en presencia de un cromógeno (DAB), lo cual da un precipitado de color marrón, visible al microscopio, quedando libre el complejo PAP para poder intervenir en otra reacción, amplificándose así la señal.

electrones (*cromógeno*), que se oxida, dando un producto coloreado y agua. Uno de los cromógenos más utilizados es la diaminobencidina (*DAB*), que al oxidarse pasa de incoloro a un marrón característico, visible al microscopio. Este paso permite amplificar la reacción, ya que el producto final se recupera de nuevo tras la formación del complejo coloreado y puede reaccionar de nuevo con más cromógeno y agua oxigenada.

6. En caso de que la señal obtenida no sea muy intensa, puede recurrirse a una intensificación de la misma mediante un tratamiento posterior al revelado a base de sulfato de níquel, cloruro de amonio, D-glucosa y DAB. Seguidamente, se añade glucosa oxidasa, la cual provoca un viraje del color marrón al azul intenso.

Otro procedimiento indirecto utilizado también frecuentemente es el que se basa en el empleo de un complejo avidina-biotina (ambas sustancias presentes, respectivamente, en la clara y la yema de huevo). También se utiliza un anticuerpo primario contra el antígeno a determinar, con el que se incubaba la muestra. Luego se vuelve a incubarla con un secundario desarrollado contra el primario, unido a biotina, y finalmente se pone la muestra en contacto con una mezcla de avidina y biotina (complejo) unida a peroxidasa. El revelado se lleva a cabo

como en el caso anterior, utilizando DAB u otro cromógeno. La eficacia de este método reside en su gran poder de amplificación de la señal en el tejido, dado el gran número de complejos de avidina conjugada a peroxidasa que se forman.

Tipos de marcaje utilizado

Tanto en los métodos inmunocitoquímicos directos como en los indirectos, se pueden utilizar diferentes tipos de marcador (molécula que se une al último anticuerpo para suministrar una señal visible en según qué tipo de microscopio). Los más utilizados son diferentes enzimas, fluorocromos o sustancias radiactivas.

Marcaje enzimático: se emplea una enzima unida a uno de los anticuerpos, la cual reaccionará después con su sustrato específico, en presencia de un cromógeno, para dar un precipitado coloreado, observable al microscopio. Suele utilizarse en métodos indirectos y se ha descrito en el apartado anterior (técnicas de peroxidasa, glucosa oxidasa o fosfatasa alcalina).

Marcaje con fluorocromos: en este caso, el último anticuerpo de la reacción se une con una molécula (*fluorocromo*) capaz de emitir fluorescencia visible cuando se excita con una radiación luminosa de una determinada longitud de onda. Existe en el mercado un amplio abanico de estas sustancias, las cuales se diferencian por sus espectros de absorción y emisión y los variados colores de la fluorescencia emitida, tales como *FITC* (isotiocianato de fluoresceína, verde), *TRITC* (isotiocianato de rodamina, rojo), *DAPI* (diaminofenil indol, azul), *GFP* (proteína verde fluorescente), *RODAMINA* (rojo), etc. Para este tipo de marcaje es necesario contar con un microscopio de fluorescencia o de tipo confocal, los cuales disponen de una fuente de iluminación de longitud de onda controlada (un láser en el confocal) y los correspondientes filtros de excitación y barrera adecuados al tipo de fluorocromo empleado. Hay que tener en cuenta, por un lado, la elevada sensibilidad de este procedimiento y, por otro, la atenuación de la señal fluorescente con el tiempo, por lo que las preparaciones no son en modo alguno permanentes y no deben exponerse a la luz. (Figura 5).

En la última década se han desarrollado nuevos tipos de microscopios de fluorescencia que permiten la localización y perfecta visualización de estructuras marcadas con una resolución mucho mayor que la convencional para microscopía óptica (*superresolución, MSR*). Estas técnicas fueron desarrolladas principalmente por E. Betzig, S. Hell y W.E. Moerner (Lippincott-Schwartz, 2015), por lo que obtuvieron el Nobel de Química en 2014, suponiendo una auténtica revolución en el concepto de resolución en microscopía óptica. Has-