



Università degli Studi di Ferrara

Facoltà di Scienze MM.FF.NN.

Laurea Triennale in
Scienze Biologiche

IMMUNOISTOCHIMICA ASPETTI BIOCHIMICI

Guastella Giuseppe

email giuseppe.guastella@unife.it
telefono 0532 974421

REAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO

Vedi apposita lezione

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni biotici da sottoporre ad indagini di IIC vengono trattati secondo le normali procedure per l'allestimento delle sezioni e cioè

- Fissazione
- Inclusione in paraffina
- Taglio al microtomo

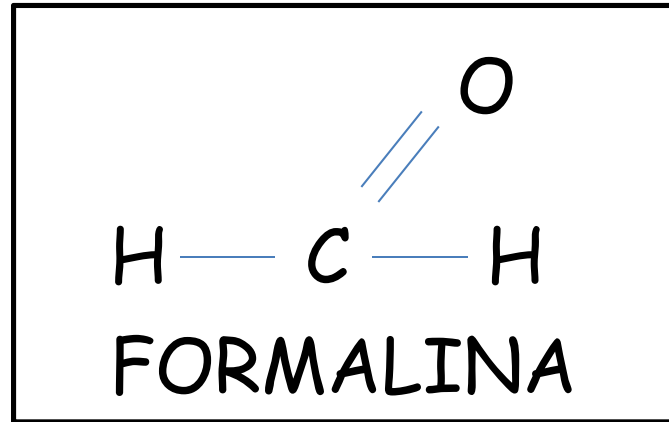
FISSAZIONE

Gli scopi principali della fissazione sono:

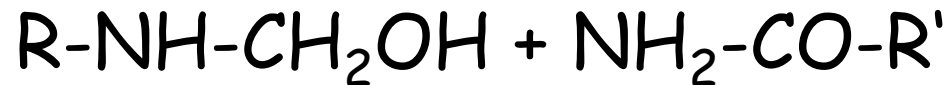
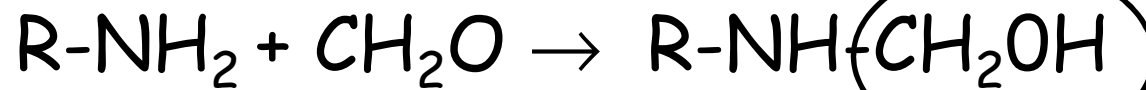
- Preservare la morfologia cellulare e l'architettura tissutale
- Preservare l'integrità antigenica
- **Mantenere le molecole antigeniche nella loro posizione originale**
- **Vengono mantenute le strutture secondarie delle proteine**

AZIONE DELLA FORMALINA

La fissazione con formalina determina legami crociati tra il liquido fissativo e gruppi attivi delle proteine, con mascheramento di molti siti antigenici.



Gruppo metilolo



Per condensazione viene persa una molecola di H_2O

Trattamento del materiale istologico

Azione della formalina sulle proteine
del tessuto



Prima della fissazione



Dopo fissazione

La proteina cambia conformazione e diventa non riconoscibile da parte dell'anticorpo

PREPARAZIONE DEL TESSUTO

- Fissazione:
 - **Formalina**
 - Paraformaldeide
- Inclusione del tessuto
 - **Paraffina**
- Taglio
 - **Microtomo: blocchi di paraffina**
- Montaggio



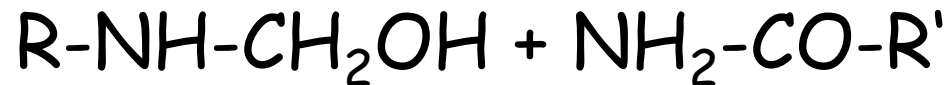
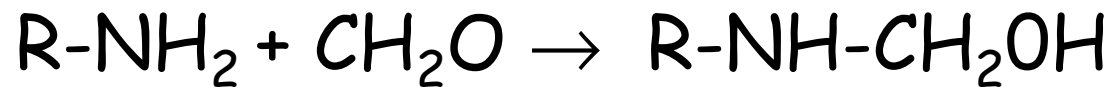
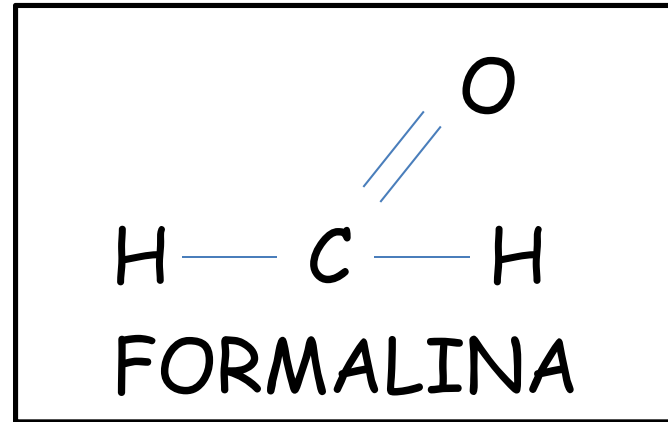
RIPRISTINO DELL'ANTIGENICITÀ

La reattività immunologica può
essere ripristinata rompendo
questi legami crociati
con un trattamento:
Enzimatico
Alte temperature

TRATTAMENTO ENZIMATICO

Gli enzimi proteolitici rompono una parte dei legami peptidici rendendo i siti antigenici disponibili per il relativo Anticorpo. Quelli maggiormente utilizzati sono:

- Pepsina
- Tripsina
- Proteinasi K



Pepsina **Ile, Leu, Val**

Tripsina **Arg e Lys**

Proteinasi K **Alifatico o aromatico**

RIPRISTINO DELL'ANTIGENICITÀ

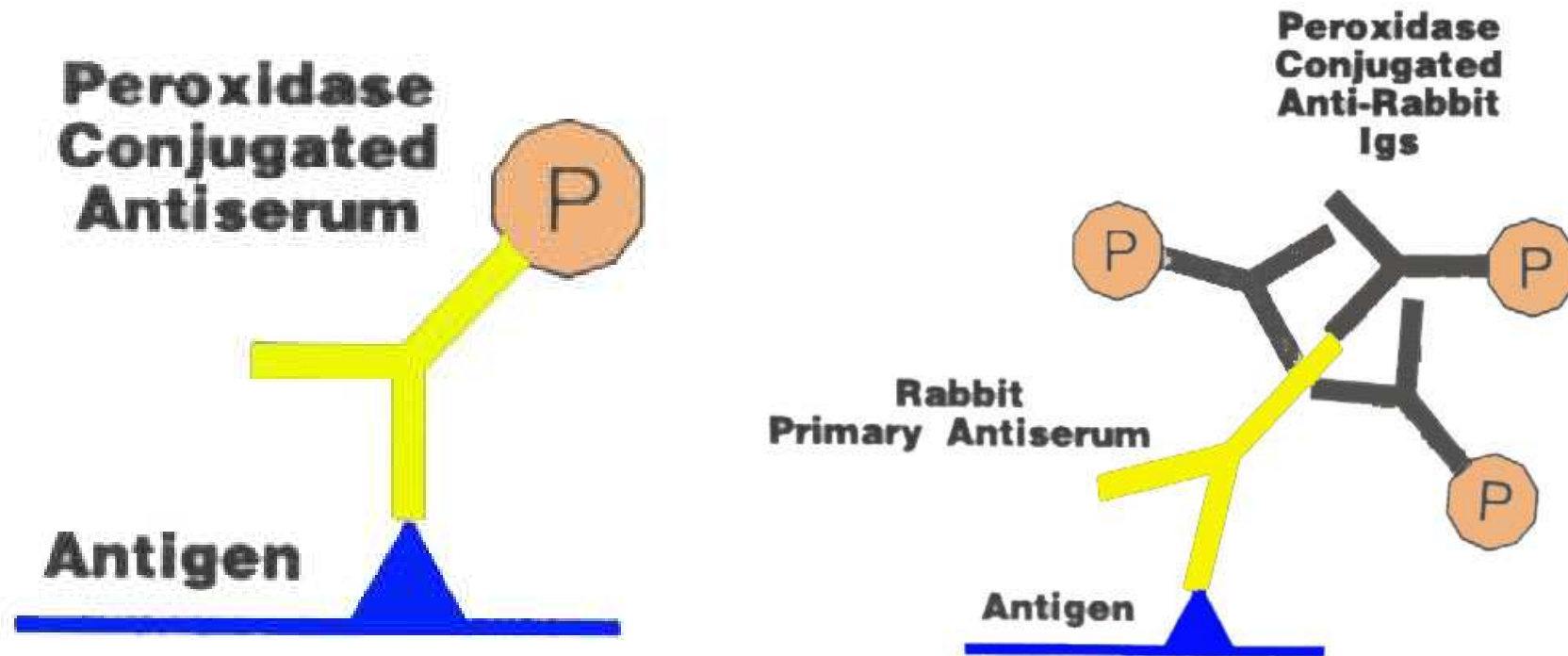
Le alte temperature sono in grado di ristabilire l'originale riconoscimento della proteina da parte dell'anticorpo dopo che questa è stata modificata dalla fissazione in formalina.

- Il calore rompe le strutture secondarie andando a denaturare le proteine.
- L'anticorpo che si sceglie di utilizzare dovrà prevedere il riconoscimento della proteina nella sua forma denaturata e non in quella nativa.
- La proteina non è più funzionale, quindi non potrò andare a fare un saggio funzionale ma questa metodica mi permette SOLO l'individuazione di essa nel tessuto.

REAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO

Il complesso tra l'antigene e l'anticorpo che si forma nella reazione immune non è di per sé visibile. E' necessario quindi servirsi di marcatori che direttamente o indirettamente possano evidenziarne la formazione

METODI DI INDAGINE



Metodi diretti

Metodi indiretti

Il legame antigene anticorpo non è visibile, per tale motivo utilizziamo marcatori che mi permettano la corretta individuazione

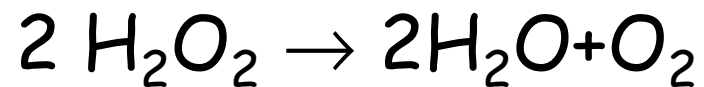
IMMUNOISTOCHIMICA TECNICHE E METODI

La tecnica Immunoenzimatica (detta così perché sfrutta l'attività di un enzima) prevede l'uso di enzimi legati direttamente o indirettamente all'Anticorpo I° per evidenziare la formazione del complesso immune.

L'enzima catalizza la formazione di un precipitato colorato e insolubile visibile al microscopio, nel sito in cui è avvenuta la reazione Antigene-Anticorpo

PEROSSIDASI

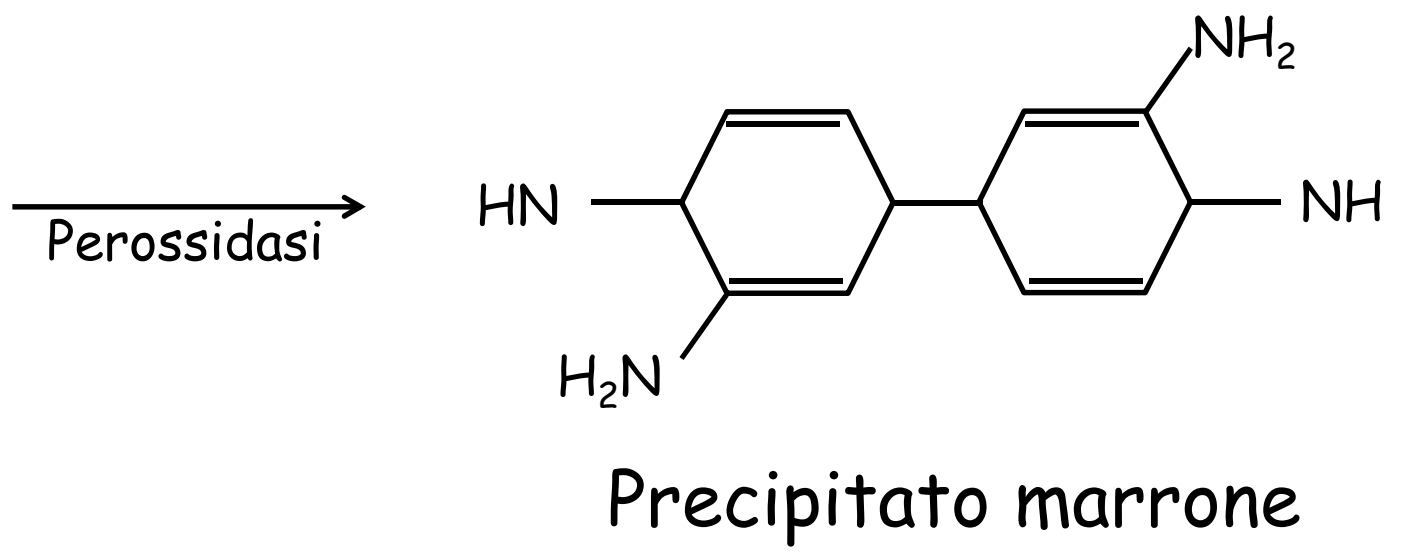
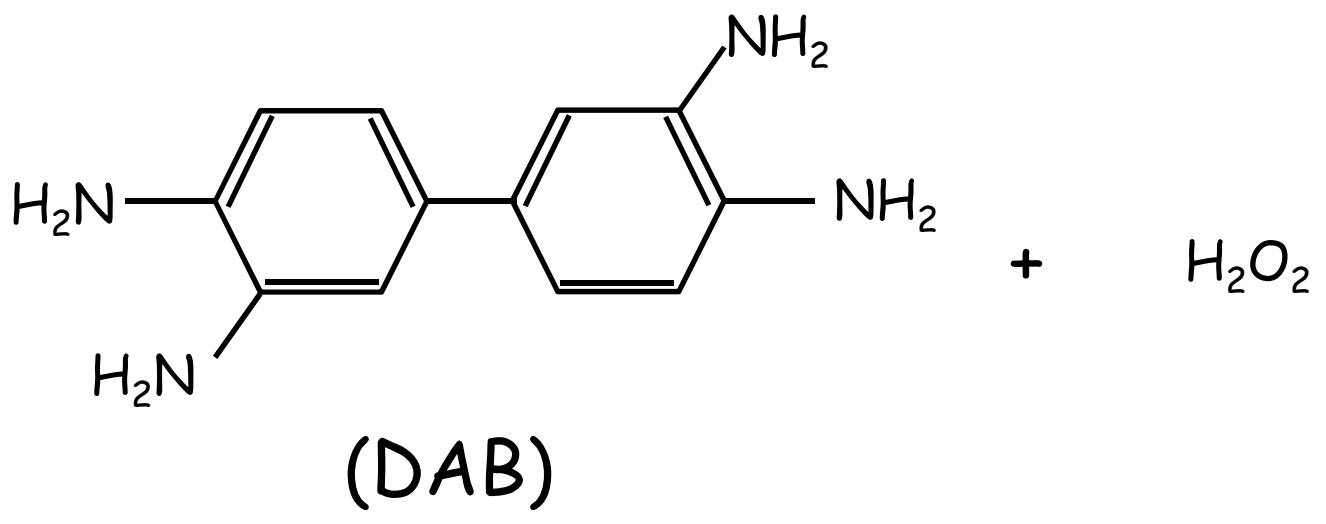
- E' ottenuta dal rafano(horse radish) ma è presente anche nei tessuti umani
- Può formare legami covalenti con le immunoglobuline
- Suo substrato è il perossido di idrogeno



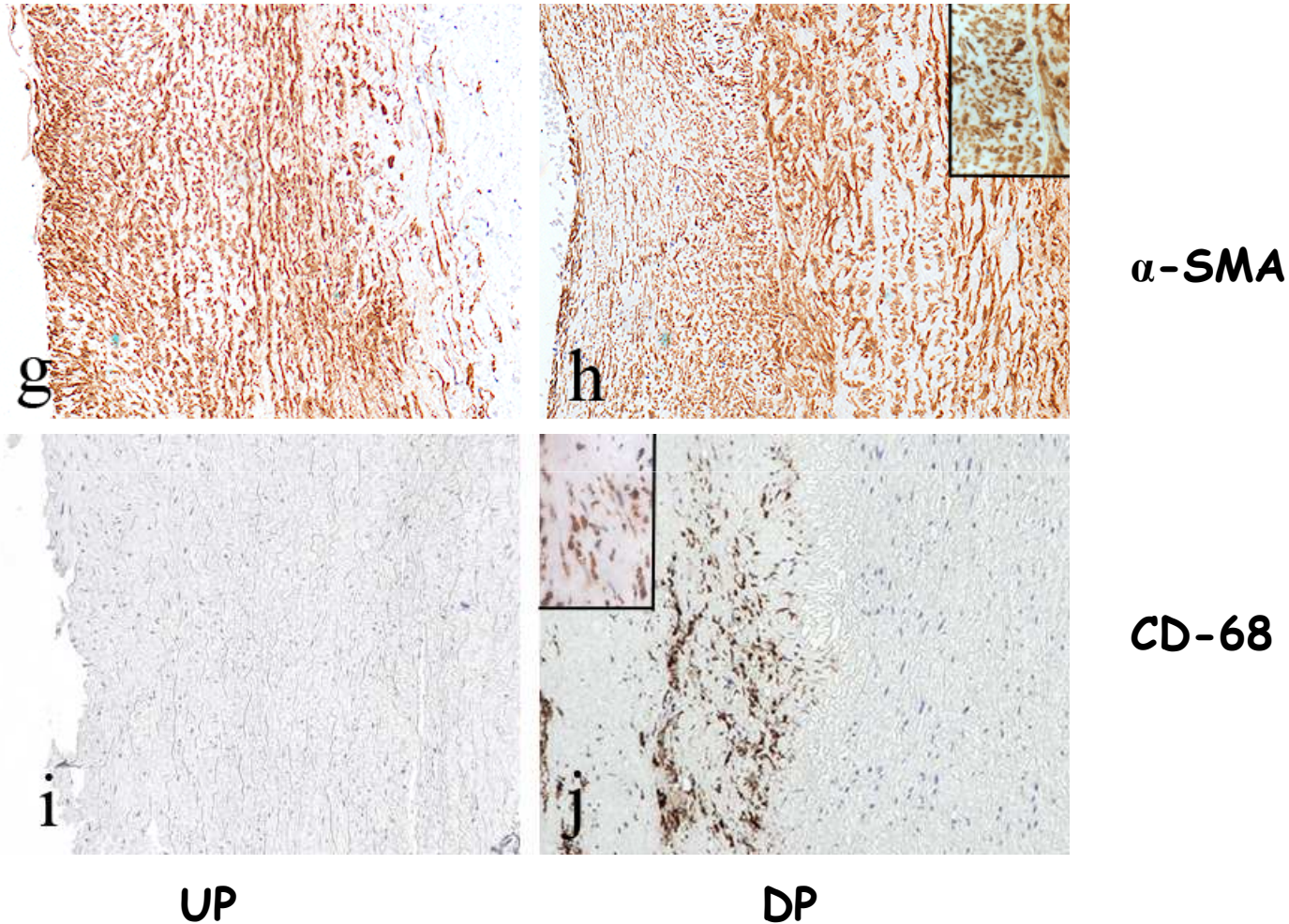
DIAMMINOBENZIDINA

Il cromogeno più utilizzato è la Diamminobenzidina (DAB) che da un prodotto di ossidazione insolubile e colorato in bruno.

L'insolubilità e la stabilità del prodotto di ossidazione della DAB consentono il montaggio e l'archiviazione dei preparati secondo le tecniche di routine.



RISULTATO FINALE



α -SMA = α -smooth muscle actin, proteina del citoscheletro utilizzata come marcatore per le cellule muscolari lisce
CD-68 = marcatore dei macrofagi, presenti nel luogo dell'infiammazione

CAMPI DI APPLICAZIONE:

- Diagnosi di malattie autoimmuni mediante riconoscimento antigenico nel tessuto
- Diagnosi di ormoni proteici in istopatologia
- Diagnosi di tumori endocrini
- Marcatori tumorali
- Tipizzazione tumorale
- Ecc.

FINE