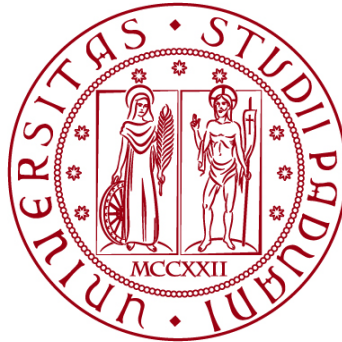


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Validazione di protocolli di immunoistochimica in
patologia veterinaria comparata**

**Tutor: Prof.ssa Laura Cavicchioli
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

Laureanda: Aurora Franceschi

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

1 **1. Abstract**

2

3 Nel presente progetto di tesi vengono descritte e messe a confronto la tecnica di
4 immunoistochimica tramite procedura manuale e la tecnica di immunoistochimica
5 ottenuta tramite l'utilizzo di un immunocoloratore semiautomatico. Verranno
6 quindi illustrati i protocolli eseguiti con differenti anticorpi e il loro scopo per
7 ciascuna delle due tecniche utilizzate.

8 Le procedure applicate ad ogni campione per la marcatura anticorpale sono
9 differenti sia con la tecnica manuale che tramite immunocoloratore. Al termine
10 delle procedure si valutano i risultati al microscopio ottico ed eventualmente
11 verranno apportate le modifiche necessarie al miglioramento della marcatura.

12 Nella tecnica di immunoistochimica manuale sono stati utilizzati tessuti
13 provenienti da criceti, di polmone e cervello, sperimentalmente infettati con il
14 virus di SARS-CoV-2. L'obbiettivo è quello di riuscire, con il protocollo utilizzato, ad
15 individuare la positività al virus delle cellule infettate. In seguito alla messa a punto
16 del protocollo, questo sarà utilizzato sia come strumento di ricerca che
17 eventualmente nella diagnostica di routine.

18 Nella tecnica di immunoistochimica tramite immunocoloratore sono stati utilizzati
19 tessuti di cane, tra cui ghiandola mammaria e intestino tenue. Vengono utilizzati
20 sei diversi anticorpi: CD20, CD3, panCK, SMA, Ki67, P63. Questi anticorpi si
21 dividono in marker membranari, marker citoplasmatici e marker nucleari. Lo scopo
22 è quello di validare i protocolli a scopo diagnostico per valutare la positività delle
23 diverse sottopopolazioni cellulari presenti.

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

2. Stato dell'arte

2.1. SARS-CoV-2: Organizzazione genomica e struttura del virus

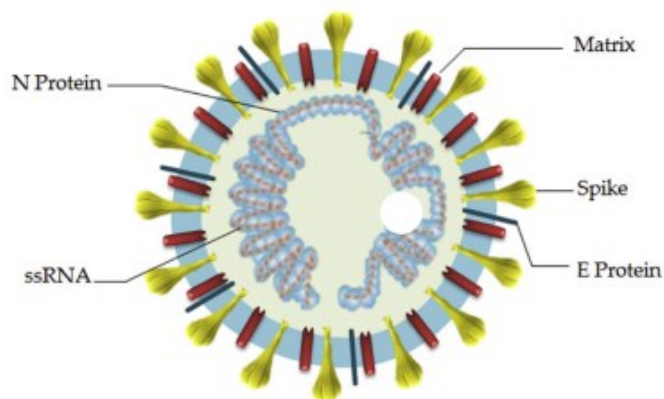
Sars-CoV-2 è un β -coronavirus che appartiene al genere Betacoronavirus, famiglia dei Coronaviridae. È l'agente eziologico della malattia COVID-19. È un virus con un genoma a RNA positivo a filamento singolo di circa 30 kb. È rivestito di envelope con una forma sferica. Le proteine del virus sono classificate in proteine non strutturali, strutturali e accessorie. Le proteine non strutturali agiscono come enzimi, coenzimi e proteine leganti per facilitare la replicazione, la trascrizione e la traduzione del virus. SARS-CoV-2 contiene sei proteine accessorie che partecipano alla replicazione virale, all'assemblaggio e alle interazioni virus-ospite. Il virus codifica per quattro proteine strutturali: N, M, S ed E.

La proteina N (46 kDa), in associazione con l'RNA virale forma il nucleocapside, le altre tre proteine strutturali si trovano all'interno dell'involucro virale.

La proteina S (spike) è una glicoproteina transmembrana di 180-200 kDa ed è presente sulla superficie della particella virale. La proteina S determina il tropismo cellulare e svolge un ruolo cruciale nell'ingresso del virus nelle cellule bersaglio in seguito all'interazione con il recettore ACE2, espresso nelle cellule del basso tratto delle vie respiratorie. Induce la fusione delle membrane virali alle membrane cellulari bersaglio. Forma omotrimeri che sporgono sulla superficie virale. È composta da tre regioni: una breve coda C-terminale situata all'interno del virione, un dominio transmembrana e la regione dell'ectodominio. La regione dell'ectodominio contiene due sottodomini S1 e S2. Il dominio S1 è globulare e funge da antigene di superficie. Contiene due subunità, il dominio N-terminale (NTD) e il dominio C-terminale (CTD). Il CTD è un dominio di legame al recettore e interagisce con ACE2. Il dominio S2 è responsabile del processo di fusione (Synowiec et al. 2021).

La proteina M, 25-30kDa è coinvolta nell'assemblaggio virale ed è la principale proteina dell'envelope. L'interazione della proteina M con la proteina S ed E consente la formazione della forma caratteristica dell'involucro del virione.

La proteina dell'involucro E è un polipeptide di 8,4-12 kDa, è una piccola proteina integrale di membrana. Contiene tre domini principali che includono il dominio N-terminale, un dominio idrofobico transmembrana (TMD) e il dominio C-terminale (Schoeman & Fielding, 2019). È localizzata nel Golgi e nell'ERGIC (compartimenti intermedi ER/Golgi) delle cellule infette e sembra svolgere un ruolo importante nell'assemblaggio del virus. L'importante ruolo della proteina E la rende un potenziale bersaglio per lo sviluppo di molecole di farmaci antivirali e vaccini candidati.



1
2 **Figura 1:** struttura schematica del virus SARS-CoV-2 e localizzazione delle proteine
3 strutturali (Synowiec et al. 2021).

4
5 **2.2. Anticorpi e antigeni**

6 Il principio che sta alla base della tecnica di IHC è il legame di un anticorpo ad un
7 antigene specifico presente nella sezione di tessuto da analizzare.

8
9 • **Struttura dell'anticorpo**

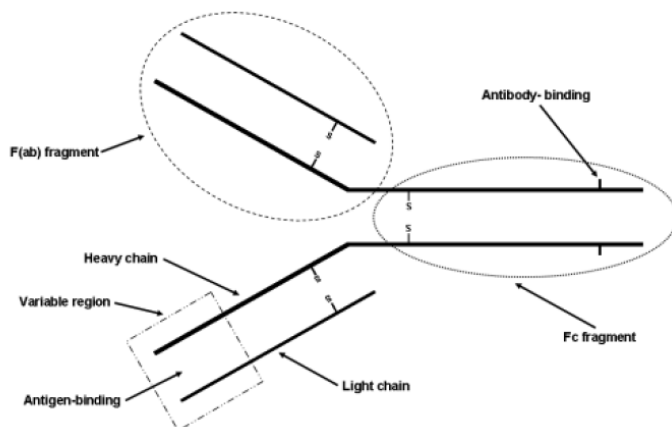
10 Un anticorpo è una proteina, ad elevato peso molecolare dalla struttura
11 simmetrica a forma di "Y". Consiste in due catene leggere e due catene pesanti
12 identiche. Dei ponti disolfuro uniscono la catena pesante e quella leggera e le due
13 catene pesanti tra loro.

14 Le catene pesanti determinano la classe dell'anticorpo. Sono costituite da un
15 dominio VH (variable heavy) e da tre o quattro domini CH (constant heavy) a
16 seconda della classe di Ig a cui appartengono. La regione C delle due catene
17 pesanti forma la porzione dello stelo della Y, che prende il nome di Fc. La regione
18 costante dello stelo non partecipa al riconoscimento dell'antigene ma interviene
19 nelle funzioni effettrici che stimolano l'intervento di altre cellule del sistema
20 immunitario (Ramos-Vara 2005).

21 In IHC la porzione Fc è responsabile della colorazione di fondo risultante
22 dall'adesione dell'Abs a molecole diverse dall'antigene specifico nella sezione di
23 tessuto in esame.

24 Le due catene leggere sono formate da una regione C-terminale, regione C_L
25 (constant: light chain) e da una regione N-terminale che contiene un'abbondante
26 variabilità di sequenza e prende il nome di regione V_L (variable: light chain). Le
27 catene leggere possono avere due forme differenti: k e λ, in base alla sequenza
28 amminoacidica della porzione C-terminale. Ogni anticorpo può avere due catene
29 k o due catene λ, non è possibile che nello stesso anticorpo ci siano due catene di
30 due tipi diversi (Ramos-Vara 2005).

31 Il dominio variabile delle due catene pesanti forma con la regione variabile delle
32 due catene leggere la regione Fab (Fragment, antigen binding) attraverso la quale
33 avviene il legame specifico dell'anticorpo all'antigene. Il sito di legame è chiamato
34 paratopo.



1
2 **Figura 2:** struttura di un anticorpo (Ramos-Vara e Miller 2014).
3

4 • **Antigene**

5 Gli antigeni possono essere proteine, glicoproteine o lipoproteine e hanno diverse
6 isoforme generate da due meccanismi principali: lo splicing alternativo e le
7 modifiche post-traduzionali, come la glicosilazione e la fosforilazione (Ramos-Vara
8 2005). La regione dell'antigene che lega l'anticorpo prende il nome di epitopo, la
9 sua lunghezza varia da 5 a 21 aminoacidi. Un antigene può contenere più epitopi
10 che si legano ad anticorpi diversi. Il paratopo si lega all'epitopo interagendo con la
11 sua struttura terziaria attraverso legami non covalenti come forze di Van der
12 Waals e interazioni elettrostatiche.
13

14 **2.3. Tecnica di immunoistochimica**

15 L'immunoistochimica è una tecnica analitica impiegata in molti aspetti della
16 patologia, anche veterinaria, in quanto viene eseguita senza l'alterazione
17 dell'architettura istologica del tessuto. È utilizzata ad esempio
18 nell'immunofenotipizzazione dei tumori in diagnostica, per fornire informazioni
19 prognostiche basate sull'espressione proteica o sulla proliferazione cellulare, e
20 nell'identificazione di agenti infettivi. È utilizzata inoltre in studi investigativi e
21 tossicologici per caratterizzare gli aspetti dinamici dei processi patologici. Nel
22 nostro caso, il protocollo di immunoistochimica manuale messo a punto viene
23 utilizzato allo scopo di ricerca ed eventualmente come protocollo con scopi
24 diagnostici per l'identificazione di agenti infettivi, in particolare SARS-CoV-2. Il
25 protocollo di immunoistochimica tramite immunocoloratore viene messo a punto
26 per la diagnosi delle diverse sottopopolazioni presenti in un tessuto neoplastico.
27

28 • **IHC manuale**

29 Nel presente lavoro, il tessuto di partenza utilizzato nel protocollo di IHC manuale
30 proviene da criceto, in particolare polmone e cervello, infettato sperimentalmente
31 con il virus SARS-CoV-2. L'antigene specifico è il pericapside di SARS-CoV-2.
32 Per la rilevazione dell'antigene è stato seguito il metodo indiretto. Questo metodo
33 prevede l'utilizzo di un anticorpo primario non coniugato seguito da marcatura
34 con anticorpo secondario coniugato con un enzima che rende possibile la
35 rilevazione.

1 L'anticorpo primario è un anticorpo policlonale di coniglio, ovvero una
2 popolazione eterogenea di immunoglobuline dirette contro gli epitopi di una
3 proteina, in questo caso contro il pericapside di SARS-CoV-2. L'anticorpo è
4 ottenuto dall'immunizzazione dell'animale con l'antigene di interesse.

5 L'anticorpo secondario è un anticorpo goat anti-rabbit, diretto contro le Ig dell'Ab
6 primario. È coniugato con l'enzima perossidasi di rafano che consente la reazione
7 con il substrato dell'enzima rivelando la localizzazione dell'antigene visibile al
8 microscopio ottico in seguito a controcolorazione con ematossilina.

9

10 • IHC tramite immunocoloratore

11 Un protocollo di IHC eseguito con l'utilizzo di un immunocoloratore consente
12 l'ottenimento di risultati che sono più rapidi, coerenti e riproducibili; infatti, i
13 vantaggi dell'IHC automatizzata rispetto a quella manuale sono la riduzione dei
14 tempi e la semplificazione di processi complicati (*Prichard 2014*).

15 All'interno di un immunocoloratore semiautomatico ciascun vetrino è
16 riconosciuto da un codice a barre, recante informazioni relative al protocollo da
17 eseguire, così come ciascun reagente utilizzato. I singoli reagenti reagiscono con i
18 campioni di tessuto durante un periodo di incubazione secondo una modalità
19 prestabilita, tutto il processo viene programmato attraverso un computer.
20 (*Prichard 2014*) I vetrini sono caricati in vassoi orizzontali e i reagenti vengono
21 applicati dall'alto e sparsi sulla superficie del vetrino per azione dell'aria.

22

23 3. Approccio sperimentale

24

25 3.1. Protocollo di immunoistochimica manuale

26 Un protocollo di immunoistochimica è composto di tre fasi. La prima fase, o fase
27 preanalitica prevede, in seguito al prelievo del campione, la fissazione del tessuto
28 e il sezionamento del tessuto tramite un microtomo.

29 La parte sperimentale svolta all'interno del laboratorio del Dipartimento di
30 Biomedicina Comparata e Alimentazione dell'Università di Padova ha inizio dalla
31 seconda fase, la fase analitica, alla quale è seguita la terza fase, post analitica.
32 Siamo partiti da sezioni di tessuto di cervello e polmone di criceto dello spessore
33 di 4 micron poste su vetrini TOMO per colorazione immunoistochimica di sezioni
34 di tessuto fissate con formalina e incluse in paraffina. Questa particolare tipologia
35 di vetrino permette una maggiore aderenza del tessuto al vetrino stesso e riduce
36 il rischio di eventuali danni al tessuto durante l'intero protocollo, come ad
37 esempio il suo distacco per azione del calore.

38 La fase analitica inizia con la deparaffinizzazione delle sezioni di tessuto. I vetrini
39 sono posti in stufa a 37 ° per ammorbidire la paraffina. Al fine della messa a punto
40 del protocollo i tempi di messa in stufa variano da mezz'ora ad un'ora in modo da
41 poter valutare quale sia il migliore.

42 Una volta che il campione viene rimosso dalla stufa si trova ancora in condizioni di
43 disidratazione. È fondamentale re-idratare il tessuto per consentire all'anticorpo
44 il corretto legame con l'antigene. Per la reidratazione si eseguono dei lavaggi in
45 successione con xylene, alcol assoluto, alcool 90% e alcool 70%.

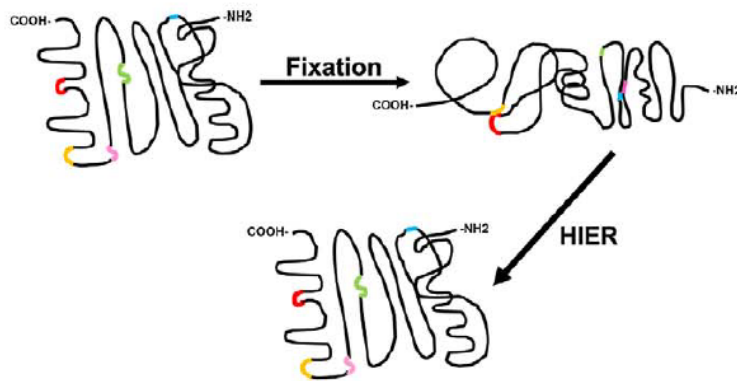
46

1 • **Smascheramento dell'antigene**

2 La fissazione in paraffina e la procedura di preparazione del tessuto per esame
3 istologico provocano la modificazione della struttura tridimensionale degli
4 antigeni, che possono creare legami con la paraffina. Di conseguenza l'anticorpo
5 non rileva l'antigene e non si lega ad esso. La reazione immunologica, infatti,
6 dipende dalla conformazione dell'antigene. Lo scopo dello smascheramento
7 antigenico è quello di rendere reversibili le modifiche prodotte durante la
8 fissazione e ripristinare la conformazione tridimensionale originaria, questo è
9 possibile solo se la struttura primaria dell'antigene non è stata alterata ed è ancora
10 intatta (*Ramos-Vara e Miller 2014*).

11 Lo smascheramento antigenico nel protocollo qui descritto viene indotto da
12 calore. Questo metodo si basa sul concetto che le reazioni chimiche tra proteine e
13 formalina potrebbero essere rese almeno in parte reversibili in seguito a
14 riscaldamento ad alte temperature o idrolisi fortemente alcalina.

15 La relazione tra la temperatura e tempo di esposizione è inversa, più elevata è la
16 temperatura, minore è il tempo richiesto. Il riscaldamento ad alte temperature,
17 intorno ai 100°C, per una breve durata è preferibile rispetto ad un riscaldamento
18 a temperature più basse per periodi di tempo più lunghi. Nella messa a punto del
19 nostro protocollo i campioni vengono posti in stufa a 97°C per 20 minuti immersi
20 nella soluzione di smascheramento. La soluzione di smascheramento antigenico
21 non è universale ma sono utilizzate diverse soluzioni a diversi pH. È importante
22 valutare la soluzione migliore per ciascun antigene. Ciascuna copia di campione è
23 posta in soluzione con pH acido e in una soluzione a pH più elevato per valutare
24 quale produce risultati migliori.



25
26 **Figura 3:** Cambiamenti conformazionali della proteina in seguito a fissazione, resi
27 reversibili dallo smascheramento dell'antigene indotto da calore. (*Ramos-Vara e*
28 *Miller 2014*).

30 • **Blocco delle attività aspecifiche**

31 Viene eseguito il blocco dei siti di legame aspecifici, ai quali l'anticorpo potrebbe
32 legarsi e causare una colorazione di fondo aspecifica, provocando una positività
33 che non deriva dal legame Ag-Ab ma dal legame dell'anticorpo con proteine

1 aspecifiche. Il blocco delle attività specifiche avviene tramite l'applicazione di
2 proteine inerti, in questo caso BSA 5%.

3
4 • **Sistema di detection**

5 La scelta del sistema di detection è importante per aumentare la sensibilità del
6 test IHC. Deve essere riproducibile, accurato e produrre un elevato rapporto
7 segnale-rumore (*Kim, Roh, e Park 2016*).

8 Nel presente protocollo il sistema di detection è indiretto. Questo tipo di sistema
9 è più sensibile di un metodo diretto in quanto l'anticorpo primario non coniugato
10 ha un legame più forte con l'antigene. Inoltre, il numero di perossidasi per
11 molecola di anticorpo primario aumenta, di conseguenza l'intensità del segnale
12 sarà maggiore. Viene utilizzato un anticorpo primario non coniugato diretto contro
13 l'antigene. L'anticorpo secondario è legato all'enzima perossidasi e si lega
14 all'anticorpo primario. Il legame dell'anticorpo secondario all'enzima è
15 fondamentale affinché, in presenza del suo substrato e di un cromogeno, l'enzima
16 produca un precipitato colorato nel sito nel quale è avvenuto il legame antigene-
17 anticorpo.

18
19 • **Incubazione con l'anticorpo primario**

20 Questo passaggio prevede l'incubazione della sezione del tessuto con l'anticorpo
21 primario in seguito alla diluizione di quest'ultimo.

22 L'anticorpo primario utilizzato in questo protocollo è un anticorpo policlonale di
23 coniglio. Gli anticorpi policlonali sono ricavati immunizzando l'animale, nel caso
24 particolare il coniglio, con antigeni purificati. Viene scelto l'utilizzo di un anticorpo
25 policlonale in quanto è più sensibile rispetto ad un anticorpo monoclonale perché
26 lega diversi epitopi in uno stesso antigene. Rispetto ad un anticorpo monoclonale
27 è tuttavia meno specifico.

28 Vengono testate diverse concentrazioni di anticorpo nella messa a punto del
29 protocollo per determinare quale sia la più bassa concentrazione di anticorpo che
30 fornisca la colorazione più forte dell'antigene e contemporaneamente la più lieve
31 colorazione di fondo.

32 Non esiste una diluizione standard dell'anticorpo, ma ciascun tipo di tessuto
33 richiede una diluizione specifica valutata sperimentalmente.

34 Partendo dalla diluizione consigliata dal produttore, si testa una diluizione più
35 concentrata e una meno concentrata su una serie di tessuti, utilizzando sempre
36 un controllo positivo.

37 La concentrazione di lavoro ottimale degli anticorpi utilizzati va da 1mg/ml a 3
38 mg/ml.

39 Una volta stabilita la concentrazione di anticorpo ideale è necessario valutare il
40 tempo di incubazione. Ciascuna copia di campione viene sottoposta a diversi
41 tempi di incubazione: 30 minuti, 90 minuti a temperatura ambiente e overnight a
42 4°C.

43 La migliore concentrazione e tempo di incubazione vengono valutati in seguito alla
44 visualizzazione dei risultati al microscopio ottico.

45 Vengono applicati 200 µl di anticorpo primario sul vetrino. L'incubazione avviene
46 in una cameretta umida. Il vetrino deve essere completamente ricoperto dalla

1 soluzione dell'anticorpo affinché quest'ultimo si possa legare efficacemente
2 all'antigene target e per evitare che la sezione di tessuto si disidrati. In seguito
3 all'incubazione si effettuano tre lavaggi per rimuovere l'anticorpo primario che
4 non è stato legato all'antigene. Il vetrino viene lasciato in soluzione per 3 minuti
5 per un totale di 9 minuti di lavaggio. I lavaggi sono molto importanti in quanto
6 residui di anticorpo primario non legato causano il legame con l'anticorpo
7 secondario provocando un segnale aspecifico.

8

9 • **Incubazione con l'anticorpo secondario**

10 Prima dell'incubazione è necessario eseguire il blocco delle perossidasi endogene
11 che porterebbero ad un elevato segnale di fondo causando falsi positivi. Viene
12 utilizzato un reagente di blocco delle perossidasi, lasciato incubare per tre minuti.
13 I vetrini successivamente sono lavati per tre volte con PBS per rimuovere il
14 reagente. È importante che il lavaggio sia effettuato correttamente, facendo
15 scorrere il PBS delicatamente sul vetrino affinché il tessuto non venga danneggiato
16 o non si abbia perdita di campione.

17 L'anticorpo secondario è un anticorpo goat anti-rabbit. È coniugato con l'enzima
18 perossidasi di rafano. Si lega all'anticorpo primario e consente l'amplificazione del
19 segnale aumentando la sensibilità rispetto ad un metodo diretto. Vengono
20 applicati 200 µl di anticorpo secondario e i vetrini sono posti in cameretta umida
21 per 20 minuti. In seguito, vengono effettuati altri 3 lavaggi per eliminare l'eccesso
22 di anticorpo secondario.

23

24 • **Controlli**

25 Nella validazione del protocollo di IHC sono stati utilizzati dei controlli positivi e
26 dei controlli negativi fondamentali per il controllo della qualità di ogni esecuzione.
27 Un controllo positivo è un tessuto che contiene con certezza l'antigene noto. Il
28 controllo positivo deve subire le stesse condizioni di reazione del campione di
29 tessuto.

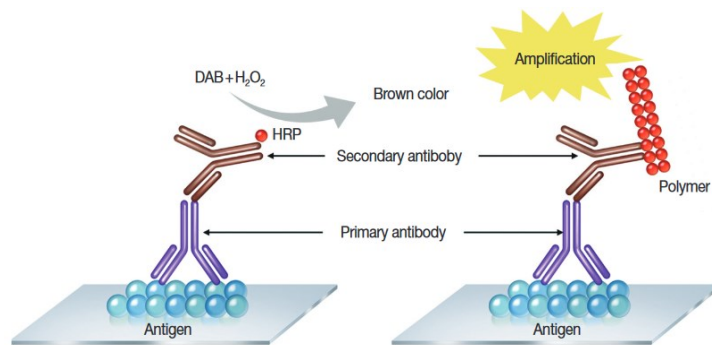
30 Un controllo negativo consiste in un tessuto che subisce le stesse condizioni di
31 reazione del campione a meno di una variabile.

32 Utilizzando i controlli si ridurrà il rischio di falsi positivi e falsi negativi.

33

34 • **Aggiunta del substrato cromogeno**

35 In seguito ad incubazione con anticorpo secondario, si ha l'aggiunta del substrato
36 cromogeno DAB (3,3' diaminobenzidina), è importante che questo passaggio
37 venga eseguito in condizioni di buio perché il substrato è fotolabile. L'incubazione
38 avviene a temperatura ambiente per 8 minuti. La DAB reagisce con l'enzima
39 perossidasi di rafano (HRP) legato all'anticorpo secondario in un prodotto di colore
40 marrone nel punto esatto in cui l'anticorpo secondario coniugato si è legato al
41 campione. Il precipitato risulta insolubile in solventi organici, per questo motivo
42 può essere utilizzato come substrato per la colorazione immunoistochimica.



1
2 **Figura 4:** reazione del substrato cromogeno con l'anticorpo secondario (Kim, Roh,
3 e Park 2016).

4
5 • **Controcolorazione con ematossilina**

6 La controcolorazione con ematossilina rende visibile al microscopio ottico il
7 segnale target attraverso un contrasto con il cromogeno. Si localizza nel nucleo
8 delle cellule ed ha un ruolo importante perché consente di identificare il tipo
9 cellulare.

10 I vetrini vengono messi in ematossilina per 30 secondi, vengono effettuati dei
11 risciacqui in acqua distillata fino a quando l'acqua non risulterà limpida. Vengono
12 fatti riposare in acqua distillata per due minuti.

13
14 • **Disidratazione**

15 Si procede con la disidratazione dei vetrini immergendoli in successione in alcol
16 90%, alcol assoluto e xylene.

17
18 • **Coprioggettatura**

19 In seguito alla disidratazione del vetrino è necessario montare il coprioggettato con
20 l'utilizzo di una colla a base di xylene. I vetrini sono lasciati asciugare a temperatura
21 ambiente per 24 ore circa.

22
23 • **Microscopio ottico**

24 In seguito all'applicazione del protocollo i vetrini vengono visualizzati al
25 microscopio ottico per interpretare i risultati e validare il protocollo.

26
27

<i>Fase</i>	<i>Steps</i>
<i>Fase preanalitica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Prelievo del campione • Fissazione del tessuto • Sezionamento del tessuto
<i>Fase analitica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Deparaffinizzazione • Re-idratazione • Smascheramento dell'antigene • Blocco delle attività aspecifiche • Incubazione con anticorpo primario

	<ul style="list-style-type: none"> • Incubazione con anticorpo secondario • Aggiunta del substrato cromogeno • Controcolorazione con ematossilina • Disidratazione • Coprioggettatura
Fase post analitica	<ul style="list-style-type: none"> • Visualizzazione al microscopio ottico

1 **Tabella 1: Steps del protocollo di IHC manuale**

2

3 **3.2. Protocollo di IHC tramite immunocoloratore**

4 L'IHC tramite immunocoloratore segue le stesse procedure
5 dell'immunoistochimica manuale, ma la procedura è programmata tramite un
6 computer che controlla i passaggi che si eseguirebbero durante un'IHC manuale.
7 In genere l'IHC automatizzata produce risultati più affidabili.

8 Per validare il protocollo è stato usato un immunocoloratore semiautomatico
9 "BenchMark semiautomatic immunostainer VENTANA".

10 Nel protocollo di IHC tramite immunocoloratore semiautomatico sono stati
11 utilizzati sei diversi anticorpi, ciascuno specifico per una componente cellulare.

12

13

- **Anticorpo CD20**

14 È diretto contro gli antigeni CD20 espressi sulla superficie dei linfociti B, ed è un
15 marker membranario. Come controllo positivo è stata utilizzata una sezione di
16 timo.

17

18

- **Anticorpo CD3**

19 È un marker membranario che lega l'antigene CD3 sulla superficie dei linfociti T
20 (figura 5). Nella messa a punto del protocollo, come controllo positivo è stata
21 utilizzata una sezione di timo proveniente da un animale sano. Nell'osservazione
22 dei risultati al microscopio ottico si è notata la differenza nell'intensità della
23 colorazione, e quindi nel numero di cellule positive rispetto al CD20. Le cellule T,
24 infatti, sono molto più abbondanti in timo rispetto alle cellule B che invece
25 maturano negli organi linfoidi secondari.

26

27

- **Anticorpo panCK**

28 È un marcatore specifico della differenziazione delle cellule epiteliali, viene
29 ampiamente utilizzato come strumento nell'identificazione e nella classificazione
30 dei tumori. È un marker citoplasmatico e si trova nel citoscheletrico. Come
31 controllo positivo è stata utilizzata una sezione di intestino di cane in cui viene
32 valutata la positività degli enterociti.

33

34

- **Anticorpo SMA**

1 È un anticorpo diretto verso componenti antigeniche specifiche del tessuto
2 muscolare liscio. È un marker citoplasmatico. Nel protocollo di IHC tramite
3 immunocoloratore è stato testato come controllo positivo l'intestino di cane.

4

5 • **Anticorpo p63**

6 È un marker nucleare. La proteina p63 è coinvolta nella differenziazione di diversi
7 tessuti. Regola il processo di riproduzione delle cellule staminali che una volta
8 differenziate sono bloccate tramite un meccanismo di autocontrollo. Nel caso di
9 cellule sane un malfunzionamento della proteina porta a morte cellulare. Nelle
10 cellule staminali tumorali (CSC) l'interruzione del funzionamento di p63 può
11 portare alla formazione di metastasi. In IHC viene utilizzata comunemente per
12 evidenziare i tipi di cellule con un impatto critico sulla diagnosi del cancro come le
13 cellule basali nelle ghiandole prostatiche e mammarie.

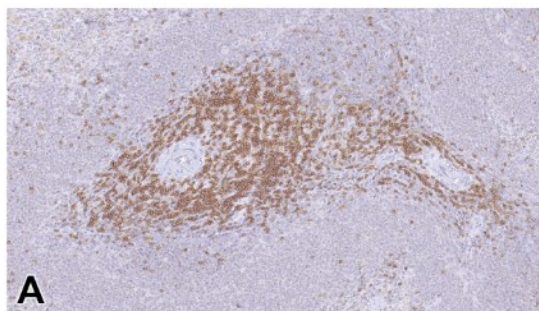
14 Nella messa a punto di questo protocollo viene visualizzata nelle cellule
15 mioepiteliali analizzando un tessuto di ghiandola mammaria di cane nel quale è
16 presente un tumore mammario con componente mioepiteliale (carcinoma
17 complesso o mioepitelioma maligno).

18

19 • **Anticorpo Ki67**

20 L'anticorpo Ki67 è un marker di proliferazione che porta ad una colorazione
21 nucleare di tutte le cellule proliferanti durante tutte le fasi del ciclo cellulare
22 esclusa la fase G0. Clinicamente viene utilizzato come fattore prognostico. Nella
23 neoplasia, la distribuzione delle cellule ki67+ è eterogenea all'interno di un'area
24 tumorale. Come controllo positivo è stata utilizzata una sezione di intestino tenue
25 di cane, con positività in particolare delle cellule delle cripte di Lieberkun, che sono
26 il comparto proliferante.

27



28

29 **Figura 5:** sezione di milza colorata con un anticorpo CD3 che mostra una
30 colorazione specifica nei linfociti T (Janardhan et al. 2018).

31

32 Nel caso dell'immunocoloratore semiautomatico utilizzato, la controcolorazione
33 con ematosillina è avvenuta manualmente seguendo gli stessi passaggi del
34 protocollo di IHC manuale, così come la coprioggettatura.

35

<i>Anticorpo</i>	<i>Pattern di colorazione</i>
CD20	Membranario
CD3	
panCK	Citoplasmatico

SMA	
p63	Nucleare
Ki67	

1 **Tabella 2: Riassunto dei pattern di colorazione degli anticorpi primari**

2

3 **4. Risultati e Discussione**

4

5 Al termine della procedura di IHC e l'osservazione al microscopio ottico dei
6 risultati, si può concludere che per ottenere dei risultati buoni è fondamentale che
7 vengano utilizzate alcune accortezze per evitare artefatti o impedimenti nello
8 svolgimento del protocollo. Ad esempio, il tessuto deve essere fissato in formalina
9 in modo ottimale evitando di tenerlo per troppi giorni o per troppo poco tempo,
10 inoltre fondamentale è garantire una buona aderenza della fetta al vetrino e da
11 qui la scelta di utilizzare dei vetrini TOMO. È necessario inoltre scegliere un
12 anticorpo di buona qualità, specifico per quella specie o con una buona cross
13 reattività, che si leghi in maniera specifica all'antigene di interesse in modo tale da
14 avere una lieve colorazione di fondo aspecifica.

15 Al fine della messa a punto del protocollo, in ciascuno step ogni campione è stato
16 sottoposto a delle variabili che possono influenzare il risultato e la riproducibilità
17 dell'esperimento. L'introduzione di numerose modifiche rende più solida la
18 convalida del protocollo aumentando di conseguenza l'affidabilità dei risultati. Le
19 modifiche apportate, tuttavia, sono differenti a seconda dell'utilizzo di metodica
20 manuale (MM) o procedura con immunocoloratore automatico (IA).

21 Le varie modifiche apportate al protocollo includono:

- 22 • Il tempo di messa in stufa del vetrino per la deparaffinizzazione. Varia da
23 30 minuti ad un'ora (MM e IA).
- 24 • La variazione della durata dello smascheramento antigenico. I campioni
25 sono messi in stufa a 97° per 20 minuti o per 90 minuti (MM).
- 26 • Nello step di smascheramento antigenico varia anche il pH. Il campione è
27 sottoposto ad una soluzione a pH acido e ad una soluzione a pH basico. In
28 seguito a valutazione al microscopio ottico si è valutato che con alcuni
29 anticorpi, ad esempio, un pH acido consente l'ottenimento di risultati
30 migliori (MM).
- 31 • La variazione di concentrazione di anticorpo primario. A partire dalla
32 concentrazione indicata dal produttore, è stata testata una concentrazione
33 maggiore e una concentrazione minore. È opportuno individuare una
34 concentrazione di Ab che marchi in modo ottimale l'antigene di interesse,
35 quindi né troppo debolmente né troppo intensamente (MM e IA).
- 36 • L'incubazione con l'anticorpo primario varia da un tempo di 30 minuti a 90
37 minuti a temperatura ambiente, a un'incubazione overnight a 4°C (MM).

38

39 In seguito all'esecuzione di tutti gli steps del protocollo con l'introduzione delle
40 varie modifiche, tutti i vetrini sono sottoposti a visualizzazione al microscopio
41 ottico. In questo modo è possibile valutare quale sia la variabile che mi permette
42 di ottenere dei risultati, che saranno tanto più affidabili quanto più solido è stato
43 il processo di validazione, per poter eseguite la successiva analisi dei campioni.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Al microscopio ottico è stato possibile notare un risultato ottimale, con una positività di segnale e colorazione di fondo minima nei vetrini nei quali lo smascheramento antigenico è avvenuto con un tempo di messa in stufa di 90 minuti a pH acido e con un tempo di incubazione con l'anticorpo primario di 90 minuti in modo tale che quest'ultimo possa legarsi efficacemente all'antigene target.

È possibile riassumere il processo di validazione del protocollo di IHC tenendo in considerazione le variabili da valutare in ogni step.

<i>Steps di validazione</i>	<i>Variabili</i>
Validazione del tessuto	<ul style="list-style-type: none">• Campionamento corretto• Linee cellulari adatte
Deparaffinizzazione del tessuto	<ul style="list-style-type: none">• Tempo di messa in stufa
Smascheramento antigenico	<ul style="list-style-type: none">• Tempo di incubazione• pH di incubazione
Anticorpo primario	<ul style="list-style-type: none">• Selezione dell'anticorpo specifico per l'antigene di interesse• Tempo di incubazione• Temperatura di incubazione• Diluizione dell'anticorpo

11 **Tabella 3:** steps di validazione del protocollo di IHC

12

13 **4.1. Considerazioni finali**

14

15 La validazione del protocollo di IHC manuale e del protocollo di IHC tramite
16 immunocoloratore è fondamentale per ottenere una colorazione ottimale del
17 tessuto, quindi limitare i risultati falsi positivi o falsi negativi. È importante affinché
18 l'anticorpo primario risulti legato in modo specifico all'antigene di interesse e ci
19 sia un minimo numero di legami aspecifici, quindi una lieve colorazione di fondo.

20

21 In seguito all'analisi al microscopio ottico dei campioni ottenuti con entrambe le
22 tecniche e alla valutazione critica delle variabili che portano alla migliore
23 colorazione del tessuto, è emerso che la metodica manuale porta ad una maggiore
24 flessibilità nell'utilizzo delle possibili variabili. Questo elemento è utile in particolar
25 modo nel caso in cui il protocollo sia utilizzato con scopi di ricerca. In questo caso
26 infatti, è necessario, partendo da un protocollo iniziale, apportare delle modifiche
27 e valutare quali consentono l'ottenimento dei risultati ottimali. Non è escluso che
28 la metodica possa essere utilizzata anche per altri scopi, come ad esempio la
29 diagnostica. Un ulteriore vantaggio della metodica manuale è il costo più
30 contenuto confrontato con il costo dello strumento e dei reagenti nella procedura
31 tramite immunocoloratore.

32

Gli svantaggi dell'immunoistochimica manuale sono i tempi di esecuzione molto
33 lunghi e il fatto che la tecnica sia operatore dipendente.

1 Nel caso in cui lo scopo sia la diagnostica, quindi, è preferibile utilizzare la tecnica
2 di IHC tramite immunocoloratore che consente una maggiore rapidità
3 nell'ottenimento dei risultati che sono standardizzati e meno dipendenti
4 dall'operatore.

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

5. Bibliografia

1. Janardhan, Kyathanahalli S., Heather Jensen, Natasha P. Clayton, e Ronald A. Herbert. 2018. «Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology». *Toxicologic Pathology* 46(5): 488–510.
2. Khoury, Joseph D. et al. 2018. «Validation of Immunohistochemical Assays for Integral Biomarkers in the NCI-MATCH EAY131 Clinical Trial». *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 24(3): 521–31.
3. Kim, So-Woon, Jin Roh, e Chan-Sik Park. 2016. «Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips». *Journal of Pathology and Translational Medicine* 50(6): 411–18.
4. Magaki, Shino et al. 2019. «An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1897: 289–98.
5. Planès, Rémi et al. 2022. «SARS-CoV-2 Envelope (E) Protein Binds and Activates TLR2 Pathway: A Novel Molecular Target for COVID-19 Interventions». *Viruses* 14(5): 999.
6. Prichard, Jeffrey W. 2014. «Overview of Automated Immunohistochemistry». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 138(12): 1578–82.
7. Ramos-Vara, J. A. 2005. «Technical Aspects of Immunohistochemistry». *Veterinary Pathology* 42(4): 405–26.
8. Ramos-Vara, J. A., e M. A. Miller. 2014. «When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique». *Veterinary Pathology* 51(1): 42–87.
9. Synowiec, Aleksandra et al. 2021. «Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a Systemic Infection». *Clinical Microbiology Reviews* 34(2): e00133-20
10. Webster, Joshua D., Margaret Solon, e Katherine N. Gibson-Corley. 2021. «Validating Immunohistochemistry Assay Specificity in Investigative Studies: Considerations for a Weight of Evidence Approach». *Veterinary Pathology* 58(5): 829–40.