

Técnicas para la determinación de proteínas: inmunofluorescencia y ELISA

Techniques for protein determination: immunofluorescence and ELISA

Karina Martínez-Flores,* Yessica Zamudio-Cuevas,*
Javier Fernández-Torres,* Ambar López-Macay*

Palabras clave:

ELISA, inmunofluorescencia, confocal, anticuerpo, antígeno.

Keywords:

ELISA, immunofluorescence, confocal, antibody, antigen.

Resumen

Las técnicas inmunológicas que utilizan anticuerpos han sido muy empleadas desde su aparición, actualmente son herramientas elementales no sólo para la investigación básica y clínica, sino para el diagnóstico de muchas enfermedades. Esto se debe a su especificidad y reproducibilidad hacia antígenos por parte de anticuerpos específicos obtenidos de diversas moléculas pequeñas y grandes, muchas de ellas proteínas. Las técnicas de tinción por inmunofluorescencia (IF) y de ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) son parte de estas técnicas importantes, por lo que entender sus tipos o variantes que existen y las diferencias entre estas técnicas es básico para utilizarlas adecuadamente y obtener el máximo provecho de cada una de ellas. Estas técnicas junto a la electroforesis de proteínas nos permiten identificar proteínas diferentes en una sola muestra, su localización en un tejido, su presencia o ausencia, también poca o mucha abundancia de la proteína en ese tejido o células. Aquí revisaremos los pasos generales de estas técnicas, sus aplicaciones y los detalles técnicos a considerar si vamos a empezar a trabajar con alguna de ellas.

Abstract

Immunological techniques that use antibodies have been widely used since their appearance a few decades ago. Currently, these are elementary tools not only for basic and clinical research, but also for the diagnosis of many diseases. This is due to its specificity and reproducibility given by the antigen-antibody interaction, which allows the identification of various small and large molecules, many of them proteins. Immunofluorescence staining (IF) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques are part of these important techniques, so understanding their types or variants that exist and the differences between these techniques is essential to use them properly and get the most out of each of them. These techniques, together with protein electrophoresis, allow us to identify different proteins in a single sample, their location in a tissue, their presence or absence and also their low or high abundance in a tissue or group of cells. Here we will review general steps of these techniques, their applications and the technical details to consider if we are going to start working with them.

* Laboratorio de Líquido Sinovial,
Instituto Nacional de Rehabilitación
«Luis Guillermo Ibarra Ibarra». México

Correspondencia:

Dr. Ambar López-Macay

E-mail: lopez_macay@yahoo.
com.mx

Recibido: 11 de diciembre de 2023

Aceptado: 26 de febrero de 2024



INTRODUCCIÓN

Hoy en día las investigaciones experimentales emplean diversas técnicas moleculares que utilizan anticuerpos, todas ellas son similares en su fundamento molecular para agilizar su uso y brindar una mayor facilidad y comprensión de

Citar como: Martínez-Flores K, Zamudio-Cuevas Y, Fernández-Torres J, López-Macay A. Técnicas para la determinación de proteínas: inmunofluorescencia y ELISA. Invest Discapacidad. 2024; 10 (2): 135-144. <https://dx.doi.org/10.35366/116874>



la técnica a la hora de utilizarlas. En esta revisión hablaremos primero de dos de ellas, la inmunofluorescencia (IF) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), existen también otras como la electroforesis de proteínas mejor conocida por Western blot, manchas de punto (Dot blot) y electroforesis bidimensional. Tanto la inmunofluorescencia como la ELISA tienen un fundamento similar, basado en el uso de anticuerpos específicos para la detección de proteínas, aquí se explicarán las pequeñas variantes de su uso y aplicaciones. En esta revisión daremos sugerencias de los pasos generales a seguir de todas estas técnicas y detalles técnicos importantes para un resultado exitoso. Hoy en las técnicas de IF y ELISA se emplean para evaluar biomarcadores predictivos y pronósticos en diversas neoplasias malignas. Por lo que el objetivo de esta revisión no sólo es describir en qué consisten y su importancia para la determinación de proteínas, sino brindar un panorama general de lo que implica el uso correcto y diferenciación de cada una para elegir la mejor para nuestro experimento.

INMUNOFLUORESCENCIA

La IF comprende un conjunto de técnicas que utilizan sustancias fluorescentes (fluorocromos) unidos a anticuerpos, que permiten detectar la presencia de una proteína o péptido en células sembradas o en cortes de tejidos. La diferencia con la inmunohistoquímica (IHC) es que en esta última la detección se hace por una reacción enzimática colorida acoplada a los anticuerpos y no por fluorocromos. La IF tiene como finalidad visualizar proteínas por interacción con sus antígenos y la unión a anticuerpos comerciales que

pueden estar acoplados a fluorocromos permitiendo su identificación por microscopia de fluorescencia; otras moléculas que no son ni proteínas ni péptidos también pueden identificarse por microscopia de fluorescencia a través de autofluorescencia o pueden marcarse con algún colorante, desde células, componentes celulares, moléculas inorgánicas u orgánicas, nanotubos entre otras.^{1,2}

En la presente revisión sólo nos enfocaremos a la IF de proteínas y péptidos que puedan ser reconocidas por anticuerpos. La identificación de componentes celulares por inmunofluorescencia incluye por lo menos a: núcleo, nucléolos, citoplasma, membrana citoplasmática y nuclear, cromosomas, centriolos, centrómeros y vesículas.^{3,4}

TIPOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

IF directa

La técnica implica la formación de un complejo simple antígeno-anticuerpo que está marcado con un anticuerpo acoplado a un fluorocromo. Esta técnica se aplica para células fijadas o cortes de tejido usando anticuerpos específicos hacia la proteína blanco que queremos analizar (*Figura 1A*). La *Tabla 1* muestra algunos de los fluorocromos más utilizados con su rango de emisión, el de excitación muchas veces se coloca al lado del nombre.

Un fluorocromo se caracteriza por ser una molécula que absorbe la energía de la luz de una cierta longitud de onda y emiten esa luz a una longitud de onda más amplia. La «longitud de onda» se define como la distancia entre dos picos o valles sucesivos

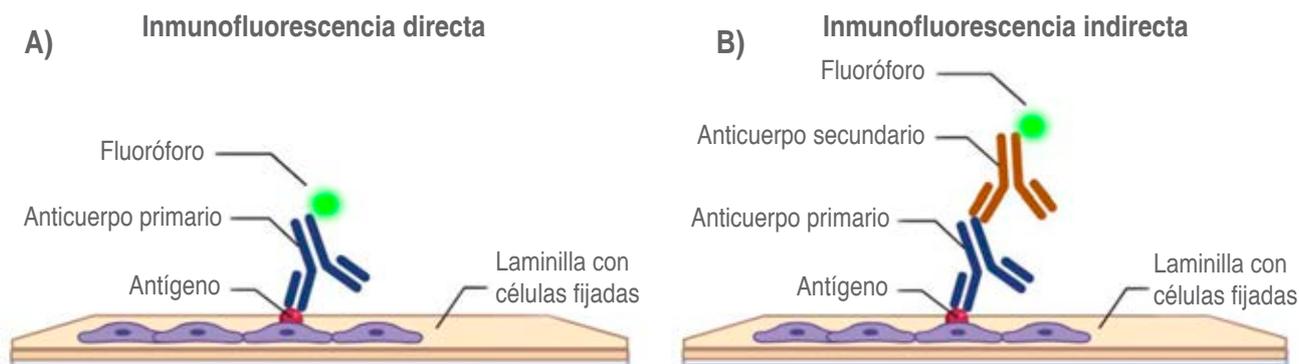


Figura 1: Esquema de los tipos de inmunofluorescencia. **A)** Directa. **B)** Indirecta, se coloca como ejemplo la tinción de células fijadas en laminillas pero puede aplicarse a cajas Petri, pozos o botellas de cultivo o cortes de tejido. El recuadro verde indica las regiones Fab y Fc de un anticuerpo.

Tabla 1: Fluorocromos comúnmente usados y su longitud de emisión.

| Fluorocromo | Filtro de emisión (nm) |
|----------------------|------------------------|
| Alexa Fluor® 488 | 525 |
| Alexa Fluor® 546 | 573 |
| Alexa Fluor® 594 | 617 |
| Alexa Fluor® 647 | 665 |
| Alexa Fluor® 680 | 702 |
| Alexa Fluor® 790 | 814 |
| FITC (fluoresceína) | 525 |
| PE (ficoeritrina) | 578 |
| PerCP | 695 |
| APC (aloficocianina) | 660 |
| Pacific Blue® | 440 |

FITC =5-isotiocianato de fluoresceína.

de una onda de luz. Las longitudes de onda que se usan en microscopia están dentro del espectro visible entre 400 y 700 nm, el espectro UV debajo de 400 nm y el espectro IR que comienza a 700 nm. Por lo tanto hablamos de espectro de absorción y emisión de un fluorocromo. Para que funcionen como marcador los fluorocromos, deben contener grupos químicos capaces de formar enlaces covalentes con moléculas de proteínas, emitiendo alta fluorescencia en el espectro visible con una coloración diferente a la emitida por los tejidos. Uno de los fluorocromos más empleados es la isotiocianato de fluoresceína (FITC), de color verde, con longitudes de onda máximas de absorción y emisión de 490 y 520 nm, respectivamente. La rodamina, otro agente utilizado en inmunofluorescencia directa, de color rojo cuyas longitudes de onda máximas de absorción y emisión son 520 y 610 nm.

IF indirecta

Esta técnica está basada en el reconocimiento de antígenos nativos de la proteína que queremos estudiar o evaluar por parte de un anticuerpo.⁵ Se utiliza un anticuerpo antiinmunoglobulina humana, que llamamos anticuerpo secundario producido en ratón, conejo, cabra o cobayo, dirigido contra las fracciones constantes (Fc) de las inmunoglobulinas IgG, IgA o IgM. El anticuerpo secundario está acoplado a un fluoróforo y se puede utilizar en concentraciones que van desde 1:100 (uno en cien) a 1:400 (*Figura 1B*). La IF directa e indirecta tienen los mismos pasos, la diferencia será que en

la indirecta agregaremos después de incubar y lavar el primario un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo, por lo tanto, también se incubará y se lavará. Los pasos más importantes se mencionan a continuación y se pueden observar en la *Figura 2*.

1. Fijación: se preserva la localización, composición y estructura del material biológico y la inmovilización de los antígenos.
2. Permeabilización: se producen poros en las membranas celulares permitiendo el ingreso de los anticuerpos a la célula.
3. Bloqueo: el objetivo es impedir interacciones inespecíficas de los anticuerpos con el material biológico a analizar. De esta manera se reduce la marcación inespecífica.
4. Tinción: este paso es crucial ya que aquí se colocan los anticuerpos previamente preparados a una dilución específica. Posteriormente a la tinción del blanco que le interesa se pueden teñir los núcleos con un colorante como DAPI o Hoescht.
5. Montaje: este paso es importante para la preservación de la muestra, ya que debe conservar y aislar la muestra de factores que aceleren su degradación, contaminación y estabilidad para su adecuada observación y análisis posterior.
6. Análisis al microscopio: implica el uso de un sistema de microscopia adecuado para visualizar la marca en nuestra muestra.

Detalles del protocolo de marcaje

El protocolo de marcaje en el caso de cultivos celulares incluye sembrar la densidad de células adecuada para el tipo de análisis u observación que queremos hacer, normalmente una densidad cercana a 70% de células en pozos, cajas o laminillas es adecuada, ya que esto permite que las células estén bien distribuidas en el campo visual del microscopio, extendidas sobre la superficie y que tengamos una cantidad representativa de las mismas. En el caso de tejidos congelados, estos se cortan en micrótopo o criostato cortando el tejido a un grosor adecuado que se desee y en el caso de la inclusión en parafina, la fijación se puede realizar después de desparafinar las muestras.⁶

En los cultivos celulares y tejidos, la fijación es un paso crucial y se pueden utilizar diversos compuestos químicos, que pueden ser: 1. Agentes entrecruzantes, siendo el más utilizado el paraformaldehído ya que permite una fijación poco agresiva y adecuada para los cultivos *in vitro* en porcentajes que van de 2 a 4%

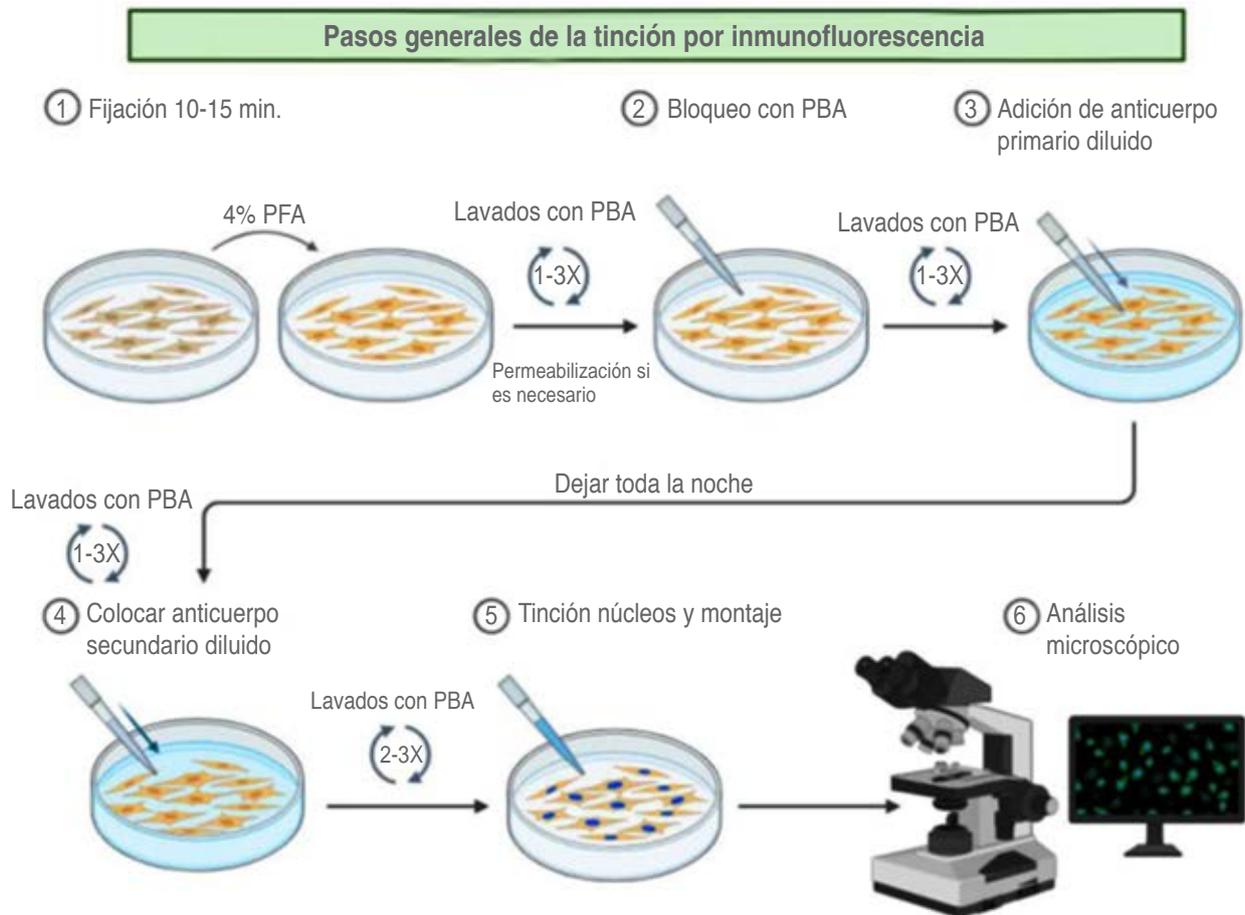


Figura 2: Esquema de los pasos de una tinción por inmunofluorescencia indirecta.

por no más de 20 min. El glutaraldehído, formaldehído y formalina también pueden ser usados en concentraciones abajo de 4%. 2. Solventes orgánicos, el isopentano y metanol absolutos se usan para la fijación de muestras congeladas previamente enfriados debajo de -70°C o en nitrógeno líquido.⁷ Después de la fijación las muestras se lavan con una mezcla de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) y albúmina de suero bovino (PBS/albúmina 1%) por 1 min cada lavado en promedio.⁸

La permeabilización de las muestras permite la entrada de los anticuerpos para marcar componentes intracelulares por lo que habrá que probar la concentración y el tiempo de fijación adecuados para cada tipo de muestra. El tritón X100, de 0.1 a 1% por 10 min es el más común pero también pueden usarse otros como la saponina (0.5%) o digitonina $100\ \mu\text{M}$ o algún otro producto comercial. Posteriormente de la permeabilización las muestras se lavan con

PBS/albúmina nuevamente un par de veces para el siguiente paso.⁹

El bloqueo se realiza para bloquear uniones inespecíficas de los anticuerpos con proteínas que no son de interés. Este bloqueo se realiza con el uso de una solución de albúmina a 1% con PBS de 20-40 por min aproximadamente (también se pueden utilizar sueros comerciales de cabra, rata, burro entre otros), posteriormente se retira la solución para colocar el anticuerpo primario.

Recuperación antigénica. En el caso de muestras de inmunohistoquímica existe un paso frecuente que es la recuperación antigénica, que se puede utilizar en muestras de células fijadas en algunos casos que sea necesario. Esta consiste en la restauración de la estructura del antígeno recuperando la inmunoreactividad y permitiendo obtener resultados óptimos. Existen tres métodos: calor, digestión enzimática y calor + digestión enzimática. El más utilizado es el

de calor, ésta se puede realizar en promedio a 92 °C por 20 min, se recomienda posteriormente colocar el anticuerpo ya que al disminuir la temperatura se pierde la exposición y forma del antígeno.

La colocación del anticuerpo primario es crucial ya que éste es quien reconocerá de manera específica a la proteína de interés. Por lo tanto, elegir un anticuerpo adecuado es muy importante, además de probar diluciones del mismo para ver cuál funciona mejor dependiendo de nuestra muestra. La selección de un anticuerpo debe considerar algunas cosas, por ejemplo; debemos preguntarnos si el anticuerpo elegido es el adecuado para la aplicación ya que las empresas nos ofrecen distintos con diferentes aplicaciones, por lo que también hay que verificar si es el adecuado para IF o IHQ ya que se manejan diferentes diluciones dependiendo de las aplicaciones o a veces no garantiza el vendedor que funcionen adecuadamente para alguna de estas aplicaciones.^{10,11}

La selección de la especie huésped donde se originó el anticuerpo también es importante a la hora de seleccionarlo, ya que algunos pueden ser de ratón, humano o rata. Si el anticuerpo es monoclonal o policlonal puede afectar la afinidad a la proteína de interés, especialmente si es poco abundante o no está en la superficie de la célula. El anticuerpo monoclonal se fabrica utilizando células inmunes idénticas que son todos clones de una célula parental específica, mientras que el policlonal reconoce múltiples epítomos en un antígeno ya que se forman por múltiples células, son robustos, pero tienen una alta variabilidad. El precio del anticuerpo puede ser más alto si es monoclonal o si es una proteína poco usada en el mercado. El anticuerpo primario por lo general se usa en diluciones de 1:100 o 1:200 dependiendo de la calidad y la marca, se puede dejar toda la noche (*overnight*) o por lo menos unas cuatro horas dependiendo de la muestra, dilución y afinidad del anticuerpo.

El uso del anticuerpo secundario apropiado implica el adecuado reconocimiento del primario que usaremos, es decir que reconozca el isotipo de inmunoglobulina o fracciones Fc (fracción cristalizante) o FAB (fragmento de unión al antígeno) (Figura 1), también aquí consideramos si el anticuerpo es monoclonal o policlonal. Por ejemplo, si el anticuerpo primario es de ratón debemos elegir un secundario anti-ratón; pero si es el primario es anti-cabra debemos elegir entonces un secundario anti-cabra.

La inmunotinción con dos anticuerpos, ya sea en cultivos celulares o en cortes de tejidos requiere que los anticuerpos primarios se generen en diferentes es-

pecies y que los anticuerpos secundarios reconozcan una de las especies exclusivamente. La revisión de artículos o las hojas técnicas del protocolo con ejemplos de usos de anticuerpos puede ayudar con pasos extra o tips para que tengamos un correcto marcaje y visualización de nuestra marca de interés.¹²

En el uso de anticuerpos secundarios los fluoróforos o fluorocromos son muy importantes ya que estos son los que nos permiten visualizar a nuestra proteína por microscopia de fluorescencia. Estas moléculas se acoplan a los anticuerpos secundarios y al excitarlas con un sistema de emisión de luz (UV, LED), a través de un filtro de excitación estas moléculas son capaces de absorber fotones de alta energía y emitir fotones de menor energía (mayor longitud de onda). Esta luz podemos detectarla con filtros específicos de emisión en un color específico. Por lo anterior, debemos elegir un fluorocromo cuya emisión de luz esté en el rango de detección del microscopio que vamos a utilizar, ya que de otra manera podemos tener muy poca fluorescencia o nula y pensar que nuestra tinción no fue adecuada o que el anticuerpo no funciona. Un ejemplo de esto sería que quisiéramos ver la emisión de un anticuerpo acoplado a un fluorocromo A que se excita en 790 nm y emite en 814 nm y que sólo tuviéramos un filtro de detección de la emisión que llegue a 600 nm, por lo que no alcanzaríamos a detectar esta emisión (Figura 3). También es común utilizar anticuerpos cuyo pico de emisión puede sobrelaparse con otros como utilizar un color verde y un naranja, normalmente estos colores se asocian a rango de excitación y emisión entre 488-525 y 546-573 nm respectivamente (Figura 3).¹³

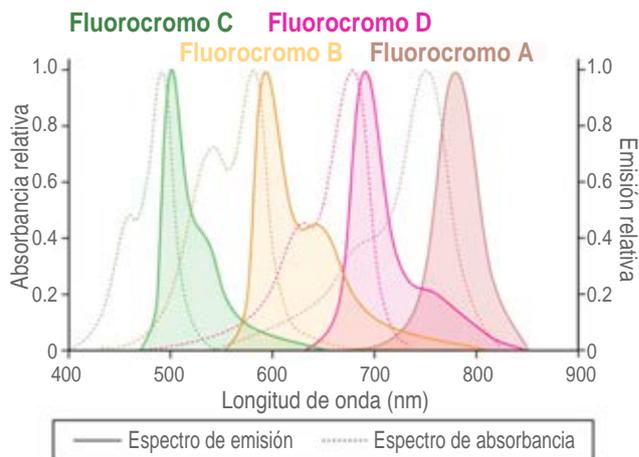


Figura 3: Diagrama del espectro de absorción de fluorocromos que absorben y emiten luz a diferentes longitudes de onda.

La epiluminiscencia y microscopia confocal pueden emplearse para detectar estos fluorocromos en la inmunofluorescencia directa, la cual se emplea en células fijadas o en cortes de tejido empleando los anticuerpos específicos de la proteína de interés.

En el montaje de la muestra previo a su observación podemos usar un producto comercial (gelatina de glicerol, 3'3'tiodietanol (TDE), Aquatex®) o utilizar una mezcla de una solución amortiguadora como el PBS con glicerol 1:1 a pH 8 y con azida de sodio para evitar la contaminación de la muestra. Estas soluciones se colocan en las laminillas cubriendo la superficie de la muestra y después de teñirla con los anticuerpos (estas soluciones pueden traer colorantes para el núcleo). Después se puede colocar alguna solución comercial para fijar el portaobjetos con un cubreobjetos o también se puede colocar barniz transparente hasta que se seque. Finalmente, al seleccionar el microscopio debemos revisar qué tipo de sistema necesitamos, es decir un microscopio convencional o invertido, dependiendo del tipo de cajas de cultivo, laminillas, placas de cultivo o soportes donde vayamos a realizar la tinción y verificar que no necesitemos adaptadores adicionales para su observación.^{14,15}

La configuración del microscopio y la selección de controles internos son pasos críticos para la obtención de imágenes de IF:

1. Utilizar muestras incubadas sólo con el anticuerpo secundario para evaluar el ruido de fondo y el potencial marcaje no específico (control negativo).
2. Utilizar muestras de expresión muy baja de la proteína de interés y muestras que sobreexpresen la proteína de interés (control negativo y positivo respectivamente).
3. Si más de un anticuerpo se utiliza, se deben utilizar algunas muestras que estén incubadas con un único anticuerpo.
4. Es imprescindible utilizar fluoróforos que tengan longitud de onda de emisión/excitación compatibles con el microscopio que estamos utilizando.
5. Además la optimización del protocolo (condiciones de bloqueo, tiempos de incubación, dilución del anticuerpo, permeabilización, etc.) es fundamental para reducir la señal de fondo (*background*) y mejorar las imágenes.

APLICACIONES

La técnica de IF junto a la IHQ son herramientas utilizadas con fines de investigación básica y clí-

nica desde hace mucho tiempo, sin embargo en el diagnóstico clínico se ha consolidado como una herramienta muy importante para muchas enfermedades que incluyen cáncer, enfermedades autoinmunes, genéticas, musculares, degenerativas, infecciosas.¹⁶⁻¹⁸ La identificación de antígenos de bacterias en tejidos animales infectados fue el origen de la inmunofluorescencia, por lo que igual que la IHQ tiene la ventaja de marcar microorganismos o moléculas pequeñas en las células haciendo más fácil su identificación y localización, desde bacterias, anticuerpos, virus, complejos inmunes en biopsias entre otros;¹⁹ sin embargo, la IF puede marcar más de dos moléculas en la misma célula y si bien un análisis microscópico por IHQ puede ser rápido, el de IF puede dar datos cuantificables, por ejemplo un ensayo de IF que detecte anticuerpos en tejido humano proporcionará información valiosa sobre el potencial de un anticuerpo como tratamiento terapéutico. En investigación básica y clínica se aplica para estudiar procesos celulares, su disfunción o cambios de morfología en organélos, desregulación de la expresión génica y proteica, alteraciones cromosómicas, vías de activación inmunológicas, entre muchas otras.²⁰⁻²²

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Las técnicas y métodos de análisis que emplean enzimas para mostrar reacciones de anticuerpos contra antígenos se denominan inmunoensayos enzimáticos o EIA por sus siglas en inglés. Estos ensayos se caracterizan por emplear las propiedades catalíticas de las enzimas para detectar y cuantificar reacciones de tipo antígeno-anticuerpo. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay* o ELISA) es una técnica heterogénea que se utiliza en análisis clínicos y en investigación.^{23,24}

La técnica es un método analítico cuantitativo que muestra reacciones antígeno-anticuerpo a través de cambios de color, mediante el uso de enzimas y un sustrato enzimático. Sirven para identificar la presencia y concentración de moléculas en diversos fluidos biológicos (suero, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, entre otros), tales como: péptidos/proteínas, hormonas, vitaminas y fármacos con un alto nivel de especificidad frente a los anticuerpos o antígenos desarrollados para ellas.^{25,26} Se emplea una curva patrón de la molécula de interés, para comparar entre la muestra problema y una concentración conocida de esa molécula de referencia. Este

método también se puede utilizar para medir incluso sustancias en concentraciones muy bajas sin riesgo de interferencias.^{23,27}

El principio básico del ELISA se remonta a 1944 con el radioinmunoensayo, entre 1966 y 1969, Villejuif y colaboradores acoplaron antígenos o anticuerpos con enzimas como la fosfatasa alcalina y la glucosa oxidasa.²⁸ Avrameas y sus colegas describieron el acoplamiento óptimo de estas moléculas mediante glutaraldehído para utilizar antígenos y anticuerpos marcados con enzimas en lugar de elementos radiactivos como el yodo, mediante IF, y aplicaron sus herramientas a la histopatología.²⁹ En 1980, Siegle y su grupo de investigación incorporaron las microplacas como soportes sólidos para identificar las concentraciones de las proteínas, siendo el que actualmente se emplea.³⁰ El antígeno se une a la fase sólida en la microplaca, éstas pueden ser de poliestireno rígido, polivinilo y polipropileno. Las microplacas utilizadas deben poder adsorber adecuadamente el antígeno y el anticuerpo.³¹ Es importante que el coeficiente de variación de la unión a proteínas sea bajo (<5%) para que haya una desviación limitada en los valores que deberían ser idénticos en los resultados del ensayo entre pozos y placas.²³

Componentes del ensayo de ELISA:

1. Placas de titulación
2. Enzimas
3. Sustratos
4. Anticuerpos (primario y secundario acoplado)
5. Detección

Las placas de fondo transparente se utilizan para señales colorimétricas, mientras que las placas negras o blancas se utilizan para señales fluorescentes y quimioluminiscentes. El recubrimiento de la placa se logra por adsorción pasiva de la proteína al plástico a través de interacciones hidrofóbicas, existen en el mercado placas recubiertas o pueden recubrirse con una solución de proteína de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$ en amortiguador de fosfatos (PBS) a pH de 7.4, la microplaca se deja incubar durante varias horas a 37 °C o toda la noche a 4 °C o también a temperatura ambiente, depende del proveedor. Las placas recubiertas pueden usarse inmediatamente o secarse y almacenarse a 4 °C; después de retirar la solución de recubrimiento se agrega una solución de bloqueo (albúmina a 1%) para garantizar que se cubran todas las superficies de unión disponibles. Las enzimas que se utilizan

son: β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina. Los sustratos enzimáticos comúnmente utilizados son: peróxido de hidrógeno y el fosfato de o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido, los cuales están disponibles en forma de tabletas y producen un color amarillo en las reacciones positivas. Al usar la peroxidasa, se usan como sustratos al ácido-5-aminosalicílico y orto fenilendiamina, formándose un color marrón que se considera como una reacción positiva.²³

Los efectos catabólicos de las enzimas determinan la aceleración y la especificidad de la reacción enzima-sustrato, la cual, suele completarse de 30 a 60 min y se puede detener con hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4). Los resultados se cuantifican en un espectrofotómetro de 400-600 nm según las características del conjugado utilizado.³²

TIPOS DE ELISA

ELISA directo e indirecto

Se conocen cuatro tipos de ELISA, el directo, indirecto, competitivo y el tipo sándwich o emparedado. El ELISA directo es el descrito originalmente por Perlmann y Engvall y Van Weemen y Schuur en 1971,²⁷ en éste la superficie de la placa se recubre directamente con el antígeno, posteriormente un anticuerpo marcado con una enzima se une y permite la medición, posterior a este paso se agrega el sustrato apropiado para producir una señal colorida. El ELISA directo puede usar tanto antígeno como anticuerpo unido al fondo de la microplaca, al que se unirá un antígeno o anticuerpo específico (*Figura 4*).^{33,34}

El ELISA directo es adecuado para determinar la cantidad de antígenos de alto peso molecular y se considera el tipo de ELISA más simple. Se requieren menos pasos y es considerablemente más rápido que otros tipos de ELISA. Otra ventaja es que se elimina la posibilidad de reactividad cruzada del anticuerpo secundario, que puede ocurrir en un ELISA indirecto.

En el ELISA indirecto, es un ensayo parecido al ELISA directo, pero en dos pasos, lo que permite amplificar la señal obtenida. En este caso, se utilizan dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, y es este último el que irá conjugado a una enzima. Los pasos son los siguientes: a) el antígeno se inmoviliza sobre una placa; b) se añade un anticuerpo primario sin marcar que se une al antígeno de interés (este anticuerpo es el que proviene del suero o muestra a

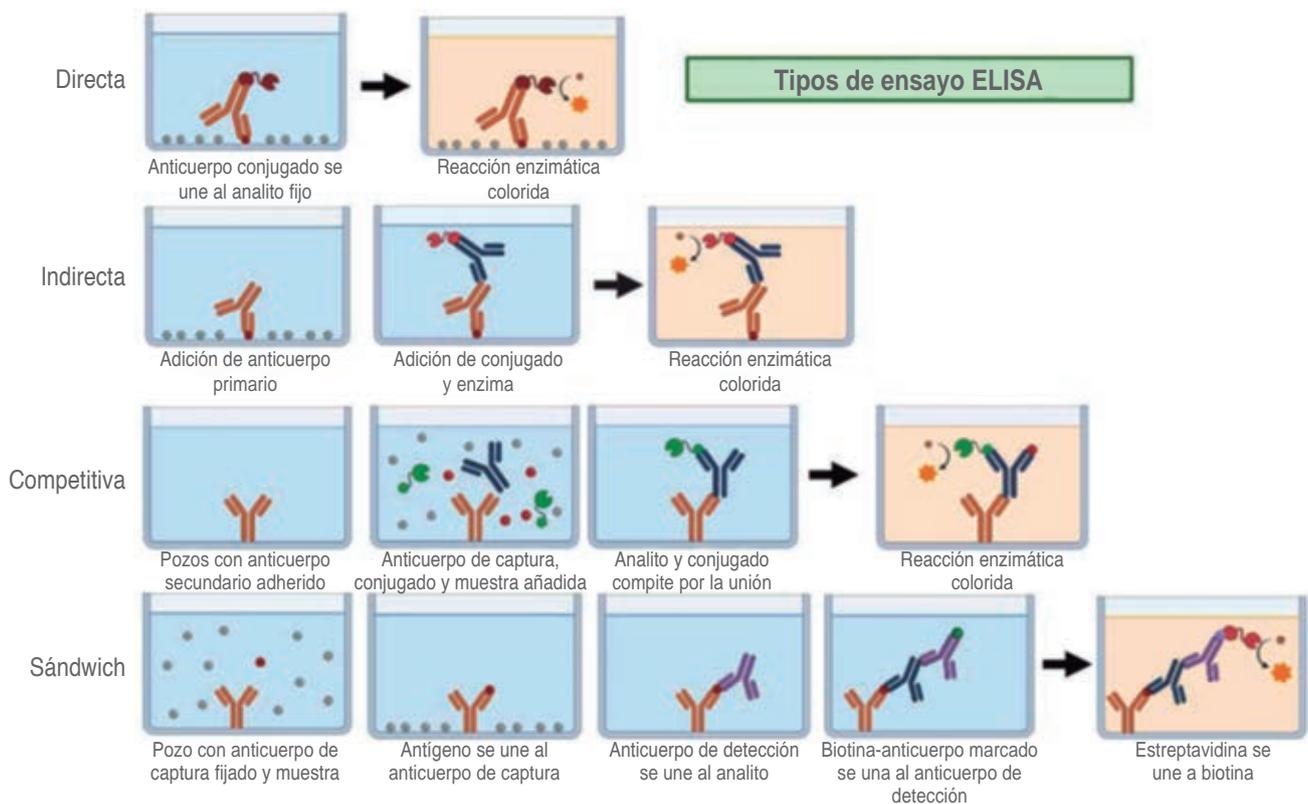


Figura 4: Esquema de los diferentes tipos de ELISA más utilizados.

analizar); c) luego se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario; d) finalmente, se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.^{23,33}

Pasos generales de un ensayo de ELISA indirecto:

1. Se adicionan los antígenos. En algunos casos, los antígenos pueden unirse covalentemente al plástico usando luz UV.
2. Los pozos son lavados para eliminar los antígenos no unidos. Los lugares no ocupados de las paredes de los pozos son bloqueados con proteínas como gelatina, albúmina, o suero bovino rico en albúmina.
3. Adición del anticuerpo primario con posteriores lavados.
4. Adición del anticuerpo secundario.
5. Lavado del anticuerpo secundario no unido.
6. Adición del sustrato (reacción colorida).

ELISA competitivo

Los sistemas de ELISA competitivo se utilizan para determinar antígenos, haptenos o anticuerpos. Aquí el ligando no marcado compite con un ligando conjugado con enzima por un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo inmovilizado, y posteriormente se retira el ligando no reactante, una vez realizada la reacción enzimática se puede relacionar el cambio de color inversamente con la cantidad de producto que se forma con la concentración del ligando no marcado en la muestra problema.³⁵ En este caso hay una proporción inversa entre la concentración del analito y la intensidad de la coloración resultante, es decir, cuando la cantidad del antígeno o del anticuerpo analizado en la muestra problema es baja, se obtendrá una absorbancia alta, mientras que concentraciones mayores producirán una absorbancia baja.^{23,33,36}

ELISA tipo sándwich

En el ELISA tipo «sándwich» el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y

otro de detección también conocidos como pares de anticuerpos, que se unirán a dos epítomos distintos de un mismo antígeno. Los pasos a seguir son los siguientes: a) el anticuerpo de captura se inmoviliza sobre la placa; b) se añade la muestra que contiene el antígeno de interés que se unirá al anticuerpo de captura; c) se añade el anticuerpo de detección (acoplado a una enzima) que se unirá al antígeno unido a su vez al anticuerpo de captura; d) se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima, proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.³⁷ Es importante mencionar que los lavados e incubaciones respectivas de cada uno de los pasos, son de gran relevancia, ya que de ello depende el éxito de los resultados.^{33,36}

Los ELISA tipo sándwich son de dos a cinco veces más sensibles que todos los demás ELISA se usan anticuerpos contra dos epítomos diferentes presentes en el antígeno diana. El anticuerpo de captura se une al fondo del pozo uniéndose a uno de los epítomos del antígeno presente en muestra. El anticuerpo de detección se une a un epítomo diferente del antígeno y está conjugado a una enzima, por ello tiene más sensibilidad.^{33,36}

APLICACIONES

Las aplicaciones del ELISA son infinitas, desde la agricultura, artes plásticas y medicina veterinaria. Se puede utilizar esta técnica para la identificación de biomarcadores para el diagnóstico en etapas tempranas de un cáncer. En hepatitis B por ejemplo, donde se detectan antígenos de superficie del virus, o anticuerpos IgG o IgM contra sus antígenos. En VIH también para la identificación de antígenos y anticuerpos o anticuerpos antiplaquetarios para púrpura trombocitopénica inmune (PTI) o el lupus sistémico eritematoso. En palabras de la Dra. Eva Engvall "¡Parece que no hay límite para los usos que se le pueden dar al ELISA!" He recibido muchos honores, pero el verdadero honor es saber que lo que hicimos hace 35 años sigue siendo útil en la medicina y otros campos.^{25,38-40}

Referencias

- Hussaini HM, Seo B, Rich AM. Immunohistochemistry and Immunofluorescence. *Methods Mol Biol.* 2023; 2588: 439-450.
- Wheatley SP, Wang YL. Indirect immunofluorescence microscopy in cultured cells. *Methods Cell Biol.* 1998; 57: 313-332.
- Uniacke J, Colón-Ramos D, Zerges W. FISH and immunofluorescence staining in *Chlamydomonas*. *Methods Mol Biol.* 2011; 714: 15-29.
- Huhn A, Nairn RC. A nuclear staining artefact in immunofluorescence. *Clin Exp Immunol.* 1967; 2 (6): 697-700.
- Aros CJ. Indirect immunofluorescence of tissue sections. *Methods Mol Biol.* 2022; 2386: 17-26.
- Mori H, Cardiff RD. Methods of Immunohistochemistry and immunofluorescence: converting invisible to visible. *Methods Mol Biol.* 2016; 1458: 1-12.
- Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An introduction to performing immunofluorescence staining. *Methods Mol Biol.* 2019; 1897: 299-311.
- Elsborg SH, Pedersen GA, Madsen MG, Keller AK, Norregaard R, Nejsum LN. Multiplex immunofluorescence staining of coverslip-mounted paraffin-embedded tissue sections. *APMIS.* 2023; 131 (8): 394-402.
- Piña R, Santos-Díaz AI, Orta-Salazar E, Aguilar-Vazquez AR, Mantellero CA, Acosta-Galeana I, et al. Ten approaches that improve immunostaining: a review of the latest advances for the optimization of immunofluorescence. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (3): 1426.
- Yao B, Liu F, Mo X, Liu Q, Ren Y. A filtration medium replacement method that increases the efficiency of immunofluorescence staining of oocytes. *Biotech Histochem.* 2023; 98 (7): 466-470.
- Wang H, Matise MP. Immunofluorescence staining with frozen mouse or chick embryonic tissue sections. *Methods Mol Biol.* 2013; 1018: 175-188.
- Sood A, Sui Y, McDonough E, Santamaría-Pang A, Al-Kofahi Y, Pang Z et al. Comparison of multiplexed immunofluorescence imaging to chromogenic immunohistochemistry of skin biomarkers in response to monkeypox virus infection. *Viruses.* 2020; 12 (8): 787.
- Zhang H, Tan C, Shi X, Xu J. Impacts of autofluorescence on fluorescence based techniques to study microglia. *BMC Neurosci.* 2022; 23 (1): 21.
- Donaldson JG. Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001; 4: 4.3.
- Webb DJ, Brown CM. Epi-fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol.* 2013; 931: 29-59.
- Duo-Quan W, Lin-Hua T, Zhen-Cheng G, Xiang Z, Man-Ni Y. Application of the indirect fluorescent antibody assay in the study of malaria infection in the Yangtze River Three Gorges Reservoir, China. *Malar J.* 2009; 8: 199.
- Hopp AK, Hottiger MO. Investigation of mitochondrial ADP-Ribosylation via immunofluorescence. *Methods Mol Biol.* 2021; 2276: 165-171.
- Riris S, Cawood S, Gui L, Serhal P, Homer HA. Immunofluorescence staining of spindles, chromosomes, and kinetochores in human oocytes. *Methods Mol Biol.* 2013; 957: 179-187.
- Schoenfeld L, Appl B, Pagerols-Raluy L, Heuer A, Reinshagen K, Boettcher M. Immunofluorescence

- imaging of neutrophil extracellular traps in human and mouse tissues. *J Vis Exp.* 2023; (198). doi: 10.3791/65272. Erratum in: *J Vis Exp.* 2023; (199).
20. Parra-Medina R, Morales SD. Diagnostic utility of epithelial and melanocytic markers with double sequential immunohistochemical staining in differentiating melanoma in situ from invasive melanoma. *Ann Diagn Pathol.* 2017; 26: 70-74.
 21. Cesare AJ, Heaphy CM, O'Sullivan RJ. Visualization of telomere integrity and function *in vitro* and *in vivo* using immunofluorescence techniques. *Curr Protoc Cytom.* 2015; 73: 12.40.1-12.40.31.
 22. Wong A, Cianciolo RE. Comparison of immunohistochemistry and immunofluorescence techniques using anti-lambda light chain antibodies for identification of immune complex deposits in canine renal biopsies. *J Vet Diagn Invest.* 2018; 30 (5): 721-727.
 23. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides.* 2015; 72: 4-15.
 24. Pang B, Zhao C, Li L, Song X, Xu K, Wang J et al. Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157:H7 detection. *Anal Biochem.* 2018; 542: 58-62.
 25. Knight AR, Taylor EL, Lukaszewski R, Jensen KT, Jones HE, Carré JE et al. A high-sensitivity electrochemiluminescence-based ELISA for the measurement of the oxidative stress biomarker, 3-nitrotyrosine, in human blood serum and cells. *Free Radic Biol Med.* 2018; 120: 246-254.
 26. Zhao Q, Lu D, Zhang G, Zhang D, Shi X. Recent improvements in enzyme-linked immunosorbent assays based on nanomaterials. *Talanta.* 2021; 223(Pt 1): 121722.
 27. Engvall E. Perspective on the historical note on EIA/ELISA by Dr. R.M. Lequin. *Clin Chem.* 2005; 51 (12): 2225.
 28. Alhadj M, Zubair M, Farhana A. Enzyme linked immunosorbent assay, in StatPearls. 2023: treasure island (FL) ineligible companies. Disclosure: muhammad zubair declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Aisha Farhana declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
 29. Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry.* 1969; 6 (1): 43-52.
 30. Voller A, Bidwell D, Hultdt G, Engvall E. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull World Health Organ.* 1974; 51 (2): 209-211.
 31. Voller A. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *Ric Clin Lab.* 1978; 8 (4): 289-298.
 32. Hornbeck PV. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol.* 2015; 110: 2.1.1-2.1.23.
 33. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju C. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. *Methods Mol Biol.* 2023; 2612: 1-17.
 34. Bayer PM, Fabian B, Hubl W. Immunofluorescence assays (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in autoimmune disease diagnostics--technique, benefits, limitations and applications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2001; 235: 68-76.
 35. Toh SY, Citartan M, Gopinath SC, Tang TH. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens Bioelectron.* 2015; 64: 392-403.
 36. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2022; 2508: 115-134.
 37. Jaschke PR. Simulated sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for a cost-effective investigation of natural and engineered cellular signaling pathways. *Biochem Mol Biol Educ.* 2020; 48 (1): 67-73.
 38. Sue MJ, Yeap SK, Omar AR, Tan SW. Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 653014.
 39. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med.* 2018; 72 (1): 32-42.
 40. Lombard M, Precausta P, Tixier G, Chomel B. The application of the ELISA technique to the serology of chlamydiosis in goats: statistical evaluation of a method. *J Biol Stand.* 1987; 15 (4): 293-304.