

# ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA Y APTAHISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE HAT1

Bargiela Cuevas, Sandra; Gabaldón Ojeda, María; Palacios Gómez, Esther; Granada Cano, Paula; Esteban Lasso, Alfonso; Martínez Toledo, Cristina; Klett Mingo, José Ignacio; Ortega Núñez, Miguel Ángel; García Tuñón, Ignacio

Universidad de Alcalá; Dpto. Biomedicina y Biotecnol.; Dpto. Medicina y Espec. Médicas; Hosp. Ramón y Cajal (Madrid); INARI Biotech, S.L.

## INTRODUCCIÓN

Los métodos de inmunohistoquímica (IHC) se basan en el uso de anticuerpos frente a una molécula de interés. La aptahistoquímica (AHC) es una técnica relativamente nueva que se basa en el uso de aptámeros, ADN o ARN de cadena sencilla de 20-80 nucleótidos de longitud que forman estructuras tridimensionales únicas, lo que les permite unirse a una amplia gama de dianas químicas y biológicas con alta afinidad y especificidad. Para comparar los resultados con ambas técnicas, analizamos la expresión de la proteína HAT1 en tumores cerebrales. HAT1 es una histona acetiltransferasa de tipo B, de la que, por *splicing* alternativo, existen dos isoformas: a (nuclear y mitocondrial) y b (nuclear y citosólica). Su función más conocida es la acetilación de las lisinas 5 y 12 de la histona H4 en el citoplasma previo a su transporte al núcleo, pero se han descubierto más de 100 sustratos no histónicos. Se ha relacionado con infecciones virales, inflamatorias, alteraciones metabólicas y con la progresión resistencia a la terapia en muchos tipos de cáncer. Recientemente se ha implicado en la progresión de tumores cerebrales, especialmente en glioblastomas, donde se ha planteado su utilidad como nueva diana terapéutica (Wang y cols., 2023). Para la detección de HAT1, hemos empleado un anticuerpo comercial de uso habitual en nuestro laboratorio, y dos aptámeros descubiertos por el Grupo de Aptámeros del IRYCIS, Hospital Ramón y Cajal, Madrid (Klett Mingo y cols., 2023).

**Material biológico:** muestras parafinadas de neoplasias intracraniales (años 1983- 2006).  
**Detección:** anticuerpo policlonal anti-HAT1 (AbHAT1; GeneTex), dilución 1:800; aptámeros apHAT610 y apHAT63 marcados con digoxigenina (Kd=28,11nM y 38,01nM resp. Grupo de Aptámeros, IRYCIS).  
**Procedimiento:** técnicas habituales de IHC, con recuperación antigénica (RA) mediante olla express (4 min., a 45-55 KPa de presión y 100°C de temperatura; rutina para AbHAT1: tampón Tris-EDTA pH9 (TE); primeras pruebas con aptámeros: el mismo tampón; pruebas con AbHAT1 y aptámeros para utilidad con diferentes tampones: TE y tampón citrato pH5). Detección del anticuerpo: sistema de amplificación basado en polímeros *Master Polymer Plus Detection System Peroxidase* (Master Diagnóstica, España). Detección de los aptámeros: anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa (Sigma-aldrich, Ref.11207733910) a una concentración 1:200.  
**Análisis:** mediante ImageJ sobre micrografías a 400x. Se emplearon dos extensiones: "IHC profiler" para la deconvolución óptica de la imagen RGB, y, en segundo lugar, la extensión "InmunoRatio" para el cálculo de la superficie nuclear marcada con respecto a la superficie nuclear total. El análisis estadístico se realizó mediante el software Prisma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### 1.-AbHAT1 vs AptHAT610, tampones de RA

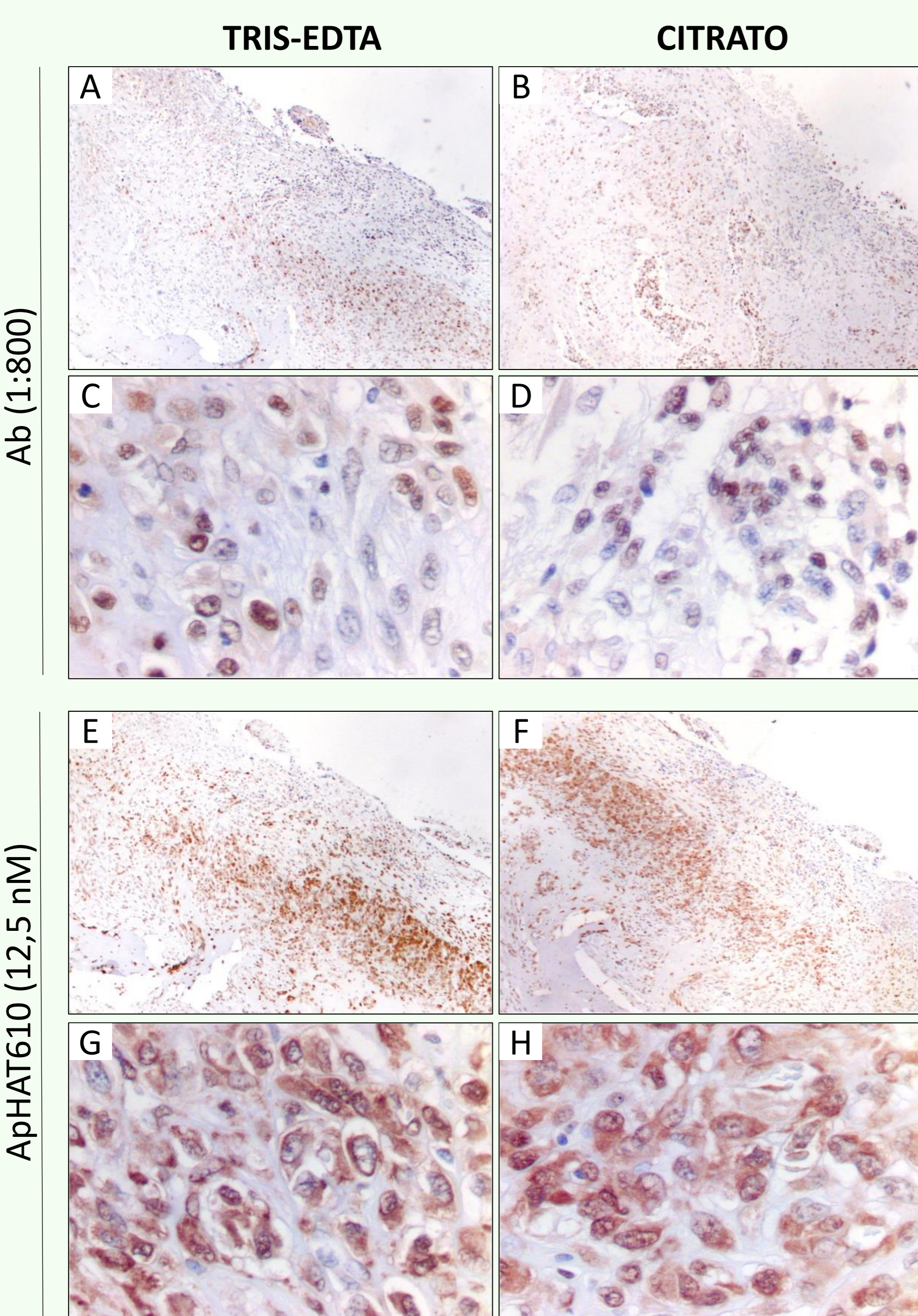


Figura 1. Selección del tampón de RA. Se empleó el AptHAT610 por su menor Kd para esta prueba. Los mejores resultados se obtuvieron con el tampón TE a pH9, aunque el aptámero ofrece buenos resultados con tampón citrato. Aumentos: 40x y 400x.

### 4.-AptHAT610, R.A. e incubación

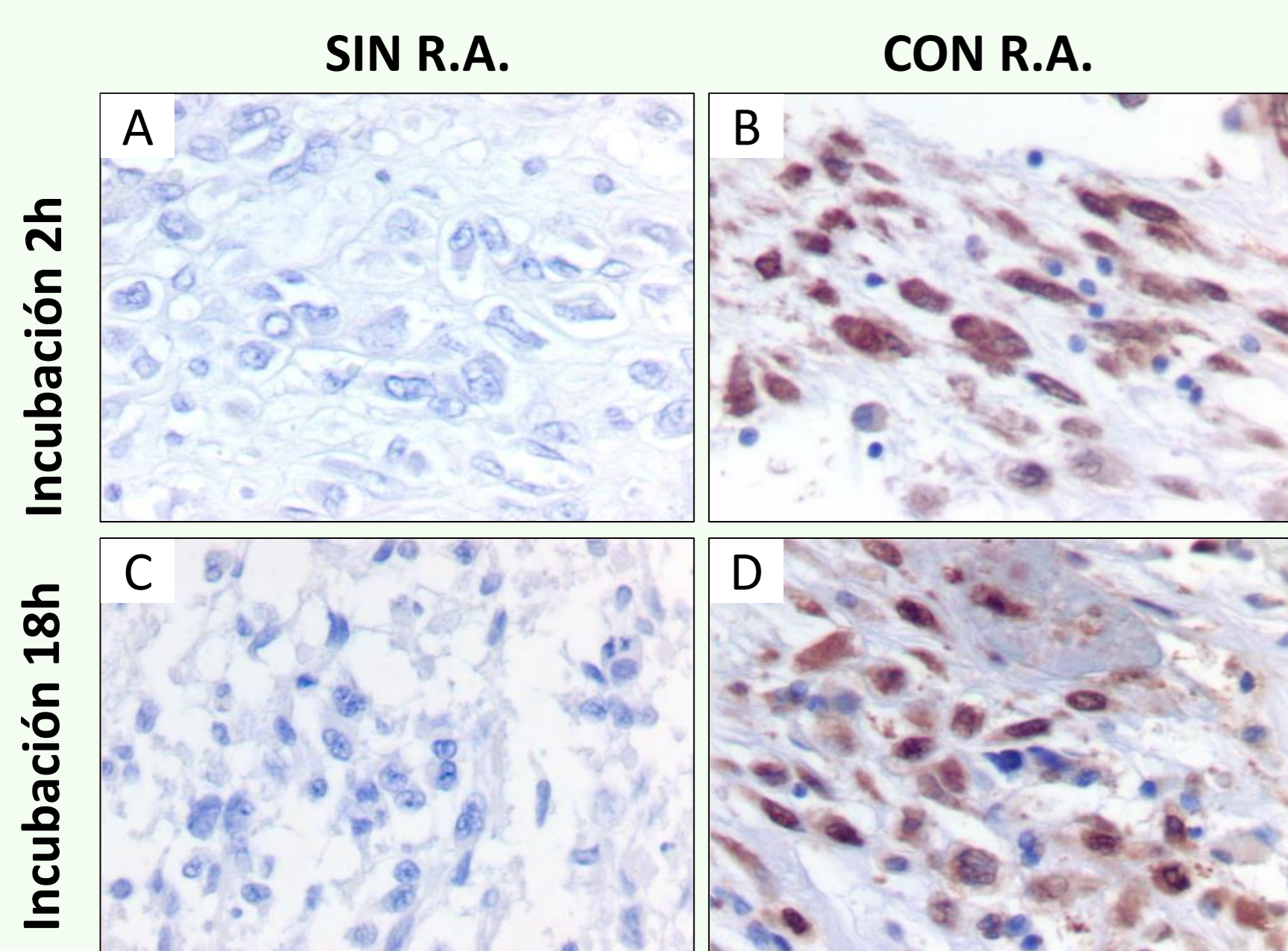


Figura 4. Resultados con tiempos de incubación de 2 horas (A, B) y toda la noche (C, D); resultados con recuperación antigénica (B, D) o sin recuperación antigénica (A, C). Al igual que con el Ab, para el empleo de los Aptámeros en aptahistoquímica es necesaria la recuperación antigénica. Excelente señal con 2h de incubación vs 18h. Aumento: 400X.

- Aptámero** → buena señal con Tris-EDTA y Citrato  
**Anticuerpo** → buena señal con Tris-EDTA

**Aptahistoquímica: ventaja para dobles marcajes con marcadores que requieran diferentes tampones de recuperación antigénica. Se seleccionó el tampón TE**

- AptHAT610** → señal similar entre 6,25 y 12,5 nM  
**AptHAT63** → señal similar entre 18 y 25 nM, menor: 12,5 nM

**Aptámeros anti HAT1: amplio rango de concentraciones ofrecen señales similares, sin ruido de fondo. Se seleccionó el AptHAT610 para el resto del estudio (mejor señal a menor concentración)**

- AptHAT610:** señal similar al anticuerpo (1:800, ver panel 1) a 3nM; señal intensa entre 6,25 y 12,5nM

**Aptámero**, concentraciones bajas → señal similar al anticuerpo  
**Aptámero**, concentraciones altas → saturación SIN señal inespecífica  
**Anticuerpo**, concentraciones altas (datos del lab.) → ruido de fondo

**Aptámeros más sensibles y específicos que el anticuerpo empleado**

- Aptámero:** buena señal a 2 horas de incubación  
**Anticuerpo:** requiere incubación 18 horas (datos previos)  
 Ambos requieren recuperación antigénica.

Señal nuclear obtenida con el aptámero >> señal nuclear obtenida con anticuerpo

**Aptahistoquímica: más sensible**

- HAT1 citosólico: señal obtenida con el aptámero >> señal obtenida con el anticuerpo

**Aptámero: más útil para detectar la localización citosólica de HAT1**

### 2.-AptHAT63 vs AptHAT610

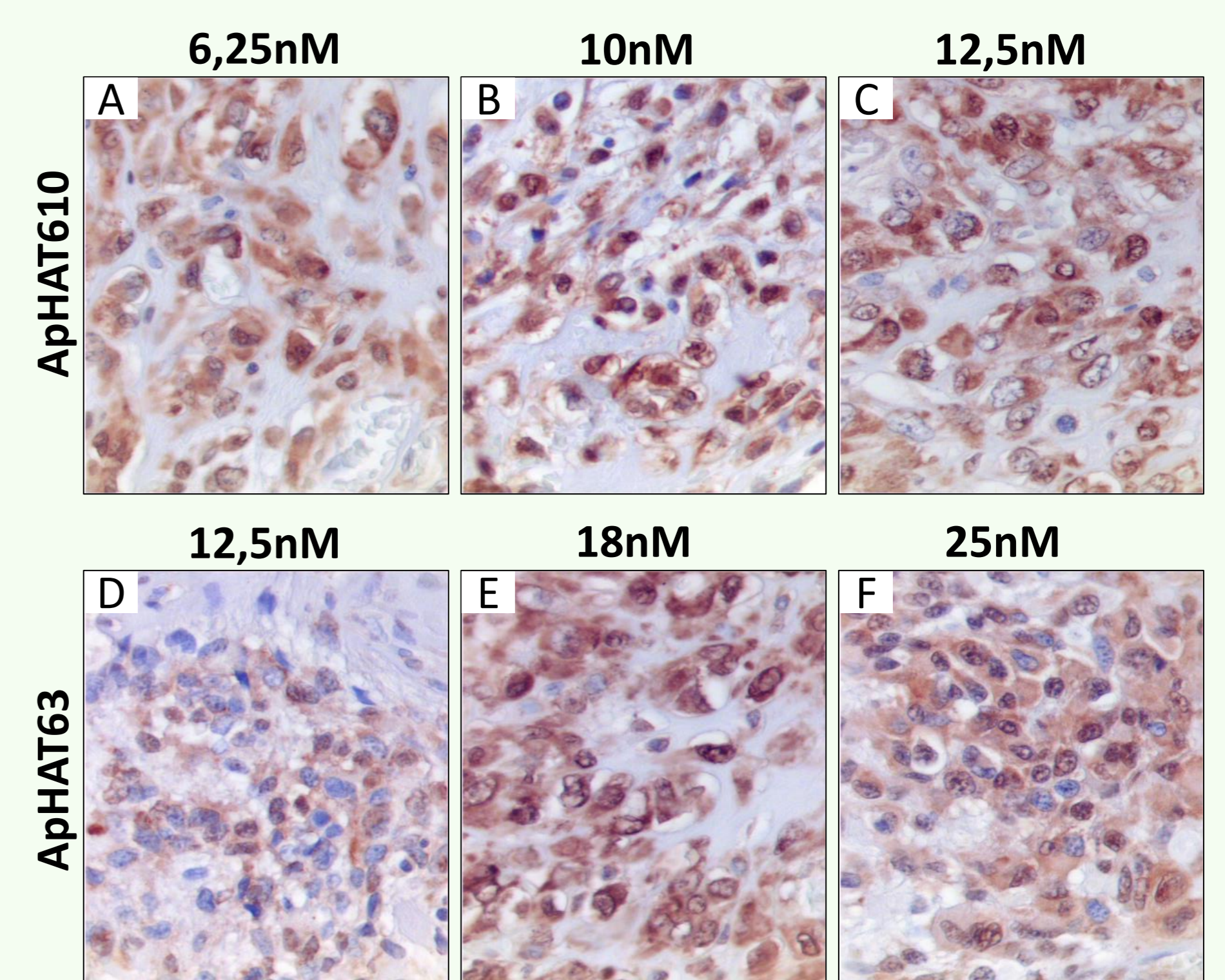


Figura 2. Comparación de los resultados obtenidos con los aptámeros apHAT610 (A-C) y apHAT63 (D-F) a diferentes diluciones (400X).

### 3.-AptHAT610, selección de dilución óptima

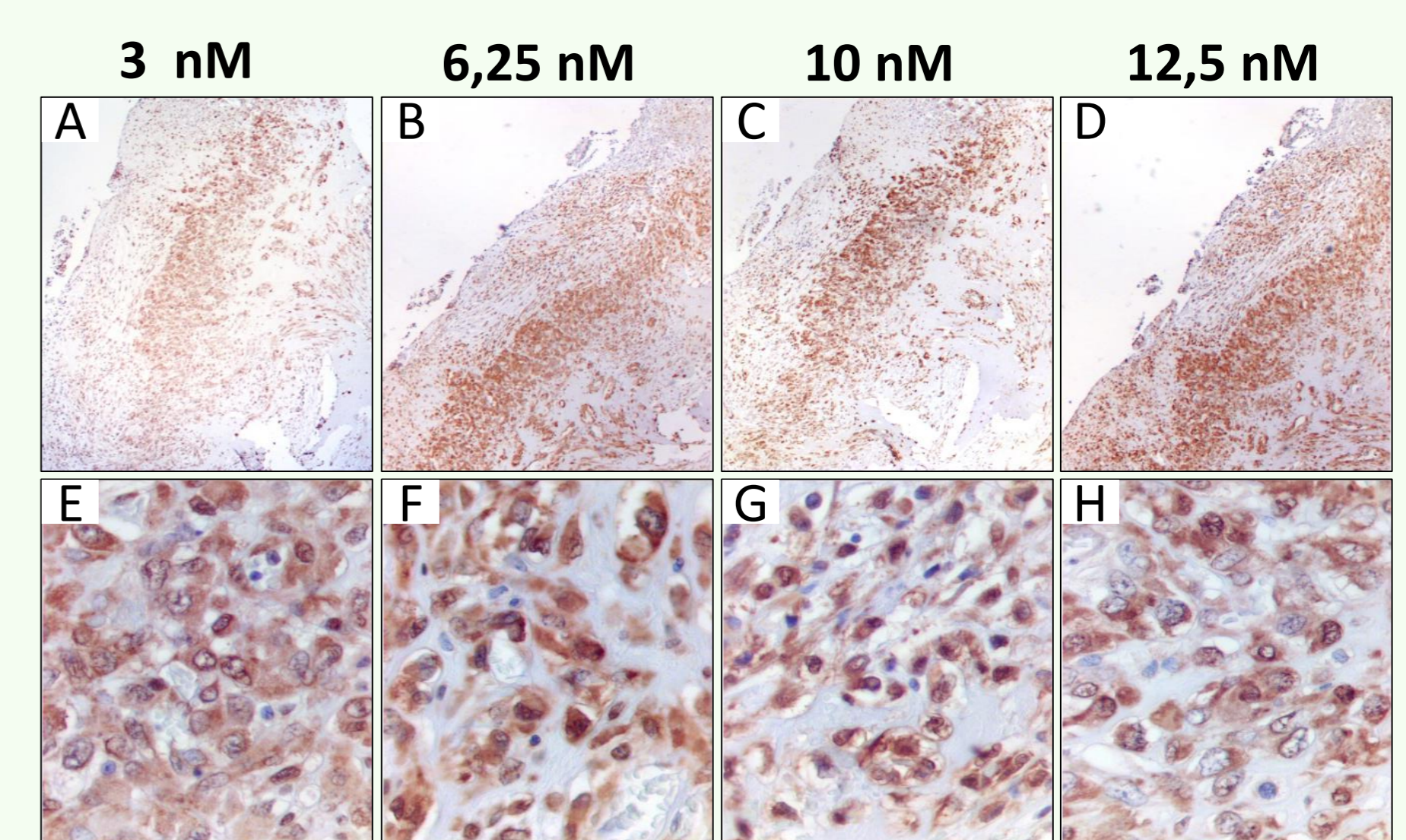


Figura 3. Comparación de los resultados obtenidos con diferentes diluciones del aptámero apHAT610. Aumentos: 40X (A-D) y 400X (E-H).

### 5.- HAT1 Citosolico, Ab vs AptHAT610

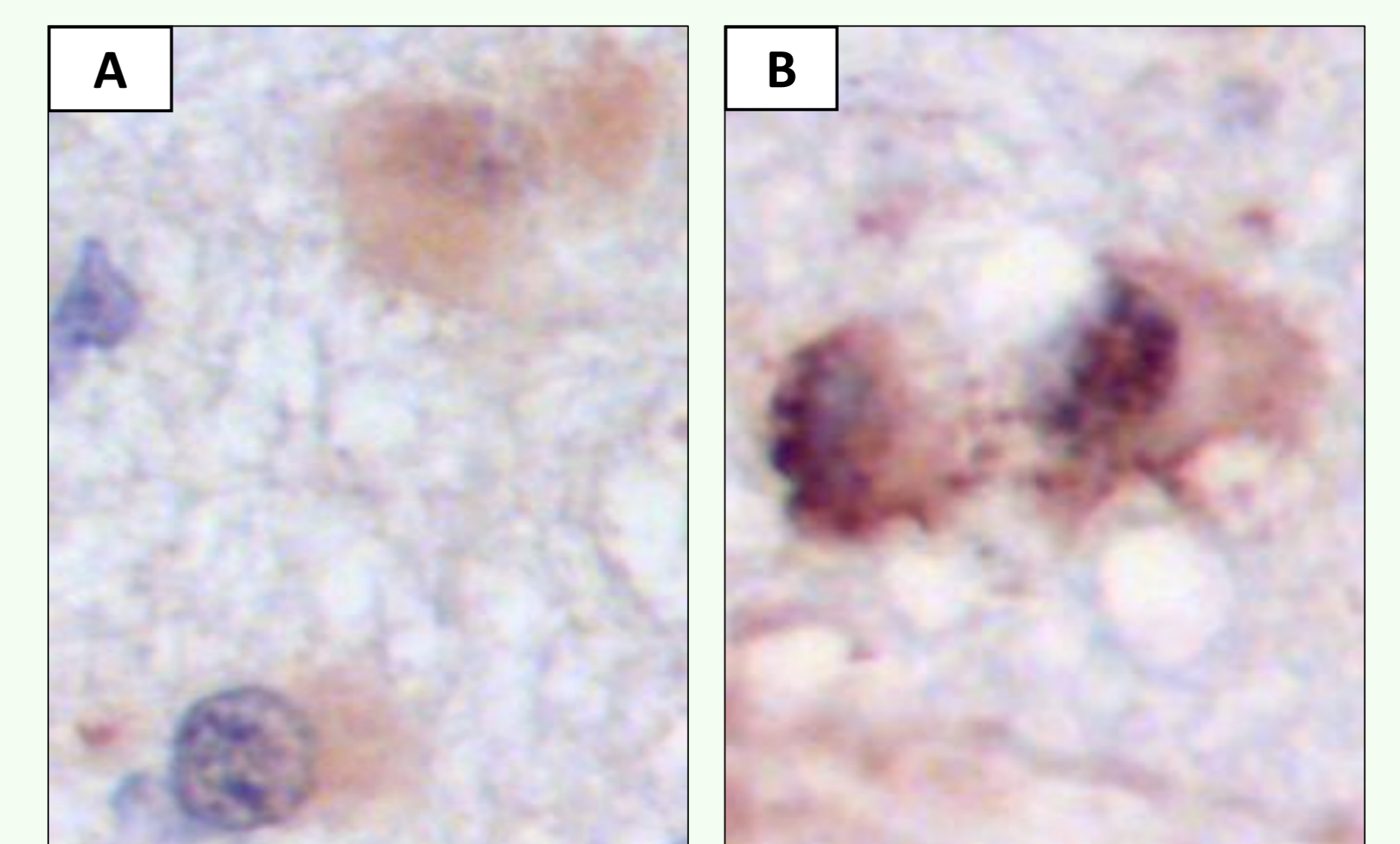


Figura 5. Detección de HAT1 citosólico. A, anticuerpo; B, aptámero. Se observa un patrón de localización de HAT1 difuso y en puntos concretos del citoplasma, más evidente con el aptámero.

## BIBLIOGRAFÍA

- Klett-Mingo JI, et al. (2023). *Cancers*; 15(1):227
- Wang Q, et al. (2023). *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2394039/v1>