

ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>

Técnica de la Inmunoperoxidasa y su Aplicación en Anatomía Patológica

* Dr. Iván Roa E.

** Dr. Sergio González B.

** TM. Mireya Delgado A.

INTRODUCCION

La inmunohistoquímica se ha desarrollado en los últimos veinte años, pero los métodos se han aplicado sólo en los últimos 5 a 6 años al diagnóstico rutinario en anatomía patológica.

La técnica de inmunoperoxidasa (IP) se basa en el uso de la peroxidasa como marcador bioquímico. Esta se detecta mediante la oxidación de sustancias cromógenas, resultando compuestos insolubles en solventes orgánicos y visibles al microscopio de luz. Se une esta enzima a una inmunoglobulina que actúa como anticuerpo contra un antígeno específico. Se la ha utilizado en frotis, improntas, cultivos celulares, microscopía de luz y microscopía electrónica.

Los métodos de la IP han demostrado ser sensibles, específicos, rápidos y sencillos.

La necesidad creciente de este método complementario en el diagnóstico rutinario y los ensayos experimentales que estamos realizando en nuestro Departamento nos han motivado a revisar sucintamente sus aplicaciones, así como sus ventajas y desventajas.

METODOLOGIA

Con la IP es posible demostrar diferentes antígenos tisulares o celulares. La peroxidasa del rábano picante ofrece ciertas ventajas por su alto peso molecular y gran estabilidad. La oxidación se realiza con la diaminobenzidina, cuyos polímeros en presencia de la peroxidasa producen un complejo insoluble de color café, que se

deposita en el sitio de la reacción antígeno-anticuerpo. Hasta ahora se han empleado diversas enzimas como glucosa-oxidasa, fosfatasa alcalina y ácida, citocromos, etc., pero la peroxidasa ha demostrado ser más útil.

Los métodos empleados pueden ser directos (solamente antisuero primario) o indirectos (antisuero secundario), los que a su vez pueden ser conjugados o no conjugados, según si la unión es química o inmunológica (P-Ig), respectivamente.

- a) Método directo: el anticuerpo conjugado con peroxidasa se une directamente con el antígeno en estudio. Su inconveniente principal radica en que el antígeno debe ser conocido y hay una gran cantidad de tinción inespecífica.
- b) Método indirecto (sandwich): en éste se emplean dos anticuerpos, el primario contra el antígeno, y el secundario conjugado con peroxidasa contra el primero. Es de mayor sensibilidad y requiere bajas concentraciones del antisuero secundario.
- c) Método del puente enzimático (triple sandwich): se diferencia del indirecto en que el antisuero secundario debe unirse a la peroxidasa mediante la antigenicidad de ésta, que se agrega a saturación. Sus inconvenientes son su larga duración y el gran número de etapas.
- d) Método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (Figura 1): el antisuero primario (generalmente de conejo) se une al antígeno y contra éste un antisuero secundario antiinmunoglobulina de conejo (generalmente cabra o cerdo); finalmente se aplica un complejo inmune peroxidasa-antiperoxidasa, cuya inmunoglobulina ha de ser del mismo tipo del antisuero primario, en este caso conejo.

* Becario en Anatomía Patológica. U. Católica.

** Departamento de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

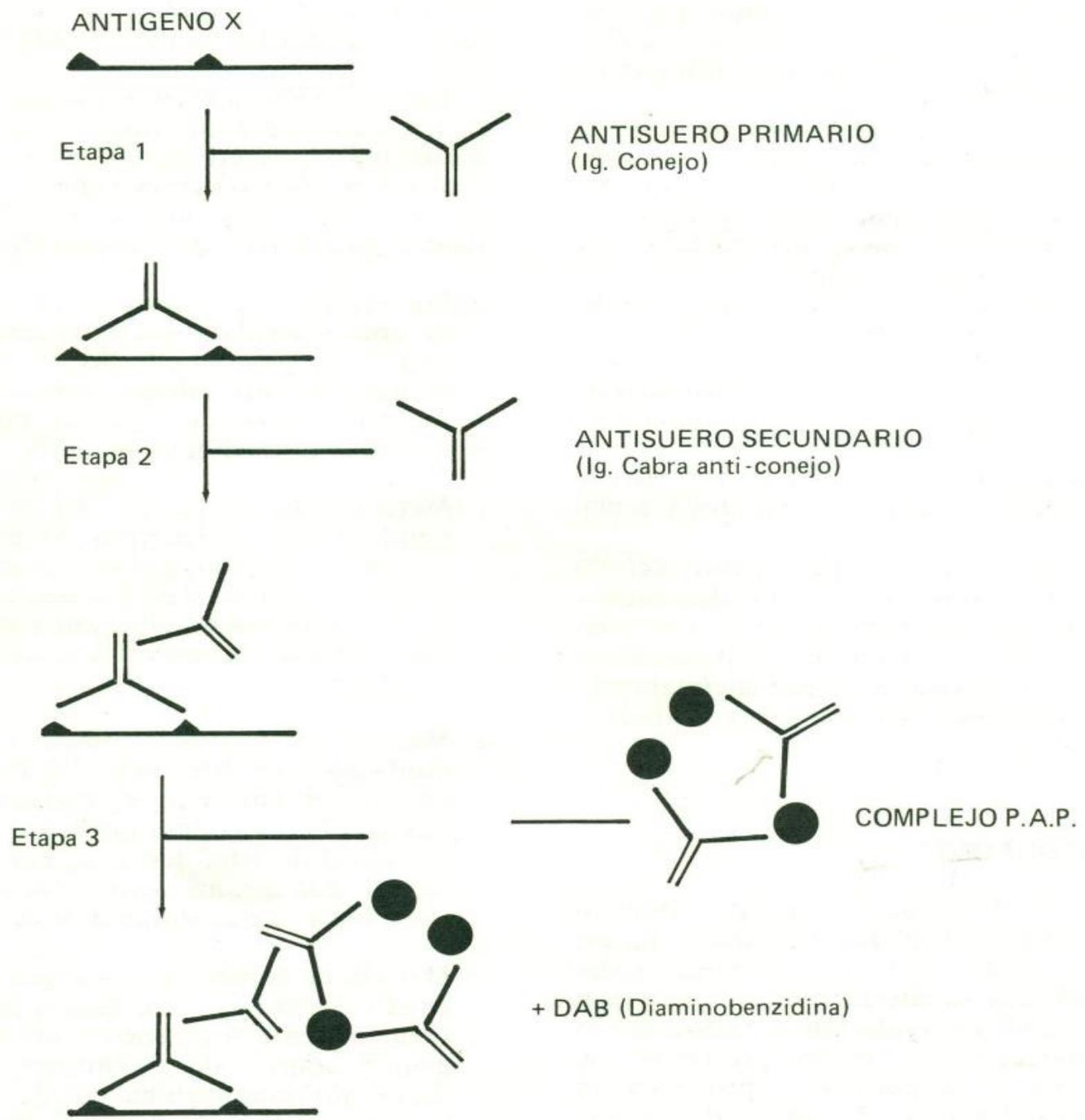


Fig. 1. Método Peroxidasa Anti-Peroxidasa.

La tinción de la peroxidasa se realiza con diaminobenzidina, que además de precipitar con ésta, también puede hacerlo con OsO₄ y usarse para microscopía electrónica.

Para una óptima tinción debe bloquearse la actividad peroxidasa endógena de los tejidos normales y neoplásicos; ello se logra con una incubación en agua oxigenada (0,030/o) con metanol, antes de la aplicación del antisuero primario.

Ventajas y desventajas de la técnica.

La necesidad de este método surgió por algunas desventajas de la inmunofluorescencia (IF). La IF requiere de microscopía especializada, la tinción no es permanente, su precisión morfológica es pobre, requiere tejido fresco y en algunos casos hay inmunofluorescencia inespecífica que interfiere.

La identificación celular y distribución de los antígenos, así como los buenos detalles morfológicos son sus mayores ventajas, además la tinción es permanente y permite el estudio de piezas fijadas en formalina y pueden durante años identificarse hasta 2 antígenos simultáneamente. Esta técnica tiene buena correlación con inmunofluorescencia y la misma sensibilidad que RIA e IF. Sus mayores desventajas son la difícil estandarización y control de los métodos, lo que muchas veces dificulta la interpretación por tinción inespecífica; además, requiere de antisueros de gran pureza y especificidad.

APLICACIONES

Esta técnica permite al patólogo examinar la presencia de productos celulares específicos o material extracelular, en cortes histológicos habituales. Sus principales aplicaciones son:

- a) identificación de las células de origen del antígeno (ej. neoplasias endocrinas),
- b) distribución anormal de células que pro-

- ducen el antígeno (ej. hipoplasia o hiperplasia de células endocrinas),
- c) pérdida de antígenos normales en una neoplasia (ej. antígenos de grupos sanguíneos en neoplasias de mama y vejiga)
- d) identificación de antígenos oncofetales en neoplasias (ej. alfafetoproteína, antígeno carcinoembrionario)
- e) histogénesis de una lesión (ej. tumores de partes blandas)
- f) detección de microorganismos (ej. virus papiloma)
- g) detección de autoanticuerpos (ej. test de banda lúpica, enfermedades cutáneas bulosas).

A continuación se enumerarán algunas de las aplicaciones de esta técnica comprobadas e informadas en la literatura.

Sistema linforreticular

Puede distinguirse un linfoma de células B de una proliferación reactiva por la determinación de un solo tipo de cadena liviana o Ig completa (monoclonal), en contraste con el carácter policlonal de la última. También, por detección de Ig citoplasmáticas se logra diferenciar un linfoma de células B de células grandes (centroblástico, inmunoblástico) de metástasis de carcinoma indiferenciado (melanoma).

Tracto gastrointestinal

Los linfomas pueden estudiarse de manera similar. En las enfermedades inflamatorias se observan alteraciones del patrón predominante de células linfoides de la lámina propia y que contienen IgA. En casos de alergia a la leche aumentan las células productoras de IgE; en la enfermedad celíaca aumentan las productoras de IgG. En la colitis ulcerosa, aumentan las células de la mucosa rectal productoras de IgG; las células que contienen IgA se reducen y se distribuyen sólo focalmente y se detec-

ta C3 en la membrana basal de epitelio. El epitelio rectal neoplásico contiene menos IgG y componente secretor de IgA (IgA-SC). Este disminuye en forma paralela con la mayor desdiferenciación (estudio en poliposis familiar).

Hormonas

La detección de hormonas en neoplasias nos informa acerca de su probable histogénesis. Actualmente hay evidencias de que la mayoría de las neoplasias endocrinas contiene múltiples hormonas. Permite el estudio de adenomas hipofisarios y la correlación de los síndromes clínicos correspondientes: adenomas productores de ACTH con síndrome de Cushing, secretores de gonadotropinas con infertilidad y panhipopituitarismo, productores de hormona del crecimiento con acromegalia o gigantismo. Se ha determinado que la mayoría de los adenomas clínicamente no funcionantes contienen hormonas y se ha confirmado la rareza de los verdaderos adenomas cromóforos. Las células con hialina de Crooke (en pacientes con hiper-cortisolismo endógeno o exógeno) contienen ACTH.

Han podido identificarse tiroglobulina, tiroxina y triyodotironina en tiroides normal y en carcinomas tiroideos, primitivos o metastásicos, así como tirocalcitonina en el carcinoma medular y en la hiperplasia de células parafoliculares.

En el páncreas se ha podido determinar la distribución de las hormonas de los islotes: insulina en células B, glucagón y polipéptido inhibidor gástrico en células A, somatostatina en células D y también en sus respectivas neoplasias; incluso se ha identificado polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) en pacientes con tumores de los islotes no-B con síndrome de Verner-Morrison.

Se han detectado varias hormonas peptídicas gastrointestinales en el encéfalo,

especialmente hipotálamo: VIP, somatostatina, leucoencefalina, neurotensina, bombesina, colecistoquinina y sustancia P. Se supone que cumplen un papel neurotransmisor.

Se han estudiado adenomas e hiperplasias de células secretoras de gastrina en el estómago y duodeno, que pueden producir un cuadro similar al síndrome de Zollinger-Ellison.

Gonadotropina coriónica humana (HCG), lactógeno placentario humano (HPL) y glicoproteína-l-beta específica del embarazo se han detectado en placenta normal y en tumores del trofoblasto. La más usada es HCG como marcador de diferenciación trofoblástica en tumores de células germinales. Se ha precisado que en tumores como el coriocarcinoma hay células productoras de HCG. Tanto el seminoma como el carcinoma embrionario pueden tener células de sinciciotrofoblasto sin citotrofoblasto asociado.

Puede confirmarse la producción ectópica de hormonas en tumores tales como el carcinoma de células pequeñas del pulmón, carcinoides, feocromocitoma, carcinoma medular del tiroides, neuroendocrino de la piel, carcinoma basocelular de la piel y varios otros mesenquimáticos.

Enzimas

La presencia de lisozima (muramidasa) puede usarse para confirmar el origen mielóide o monocítico de leucemias, histiocitosis maligna, linfoma histiocítico verdadero e histiocitoma fibroso de partes blandas (Fig. 2).

La presencia de fosfatasa ácida permite distinguir el carcinoma prostático metastático de otros adenocarcinomas.

Las alfa-fetoproteínas permiten distinguir el hepatoma y los tumores de saco vitelino.

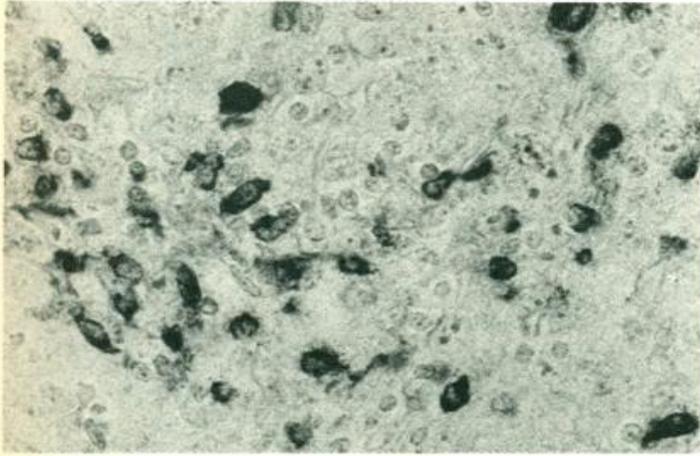


Figura 2.- Tinción positiva para lizozima en histiositoma fibroso de la piel. (Aumento original x 500)

Marcadores tisulares específicos

Están presentes sólo en uno o muy pocos tejidos y permiten así indicar un origen probable y su diferenciación predominante.

Mioglobina en rhabdomyosarcomas, tumores Mülllerianos mixtos del tracto genital femenino, tumor de Wilms, nefroblastomas y timoma sarcomatoide.

Antígeno relacionado al factor VIII en hemangiomas, angiosarcomas y proliferaciones vasculares atípicas (hemangioma histiocitoide, proliferación papilar atípica intravascular).

Actina en tumores de músculo liso y células mioepiteliales.

Proteína ácida glial (GFA) en astrocitos.

Esta proteína se ha demostrado en placas de esclerosis múltiple, astrocitomas, glioblastomas y ependimomas.

Recientemente se ha estudiado la distribución de la isoenzima enolasa en cerebro humano y sus tumores. Se ha demostrado alfa-enolasa en astrocitomas, ependimomas, oligodendrogliomas, meningiomas y neurinoma del acústico.

También se ha estudiado queratina intracelular (queratina de estrato córneo humano y proteína de la queratina) en mucosa bronquial normal y patológica, lo cual ha permitido estudiar la diferenciación epitelial anormal en los estados pre-neoplásicos, en el diagnóstico de carcinoma epidermoide poco diferenciado y su distinción de metástasis pulmonares.

Microorganismos

Se han estudiado virus papiloma humanos, *Legionella pneumoniae*, antígeno de superficie y del corion de la hepatitis B (HBsAg y HBcAg). Se han detectado virus de herpes simple en encefalitis, antígenos de sarampión en panencefalitis esclerosante subaguda y antígenos asociados al virus Epstein-Barr en casos de linfomas B.

Otro interesante antígeno viral es uno con reacción cruzada en carcinoma mamario de rata y humano, que se ha observado sólo en carcinoma y no en lesiones benignas. Actualmente está en estudio y sus proyecciones son innumerables.

REFERENCIAS

- Mukai K., Rosai J.: Applications of immunoperoxidase techniques in surgical pathology. *Progress in Surgical Pathology* 1:15. Ed. C. Fenoglio, M. Wolff, Masson Pub. Co., New York, 1980.
- Boy J. McWilliams E.: Immunoperoxidase staining of *Legionella pneumophila*. *Histopathology* 6:191, 1982.
- Thivolet F et al: Intracellular keratins in normal and pathological bronchial mucosa. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 395:87, 1982.
- Royds J et al: Enolase isoenzyme distribution in the human brain and its tumors. *J Pathol* 137:37, 1982.

