

33.1. Introducción. Técnicas inmuno histoquímicas convencionales.

Corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados.

Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos.

Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.

Aunque se utilizan habitualmente en histología (tejidos) también se pueden utilizar en citología, tanto en extendidos citológicos como en botones celulares.

En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro.

Por ejemplo, las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul).

Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A.

El espectro de anticuerpos disponibles comercialmente crece día a día y actualmente es posible encontrar marcadores para una amplia gama de antígenos.

Las técnicas inmunohistoquímicas enzimáticas permiten una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz.

El material así estudiado puede archivarse por años sin pérdida de la intensidad de la reacción. Los anticuerpos monoclonales han permitido aumentar la especificidad, sensibilidad y gama de esta técnica.

Desventajas: presencia de reacción inespecífica, especialmente cuando se utilizan anticuerpos policlonales, algunos reactivos son potencialmente carcinógenos y su manipulación debe ser cuidadosa, requieren estandarización precisa y estricto control de calidad.

La inmunohistoquímica tiene utilidad diagnóstica en identificación de diferenciación y de marcadores pronósticos de neoplasias (marcadores tumorales). Por ejemplo, es posible la identificación de los productos de oncogenes y de genes supresores de tumores con anticuerpos monoclonales, especialmente contra c-erbB-2, bcl-2, p21, Rb1 y p53; la identificación de marcadores de diferenciación como HMB-45 para melanocitos (melanoma), AE1 para carcinomas, vimentina para sarcomas y CD45 para leucocitos (linfomas).

Existen sistemas automatizados que permiten la tinción de un gran número de casos simultáneamente con la ventaja de pasos definidos y estandarización de las variables usuales con costo relativamente bajo y en mucho menor tiempo.

33.2. Requisitos del procesamiento de muestras para su optimización.

Existen diversos tipos de técnicas, cuya indicación dependerá del anticuerpo a utilizar (monoclonal o policlonal), material disponible (fresco, congelado o fijado en formalina) y antígenos a estudiar (de superficie o membrana, citoplasmáticos o nucleares).

Un elemento importante a considerar es la óptima preservación del tejido y por ende de los antígenos. Para ello, en algunos casos es importante tener en cuenta las condiciones de fijación (fijador utilizado, tiempo de fijación, etc).

La mayoría de los antígenos se conservan adecuadamente después de la fijación en formalina e inclusión en parafina.

Algunos son más lábiles y sólo se detectan en cortes de congelación.

33.3. Tipos y utilidad de las técnicas de inmunohistoquímica. Equipamiento necesario.

33.3.1. Técnica de la inmunoperoxidasa.

Como se ha dicho, en las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro.

Hay distintos tipos de técnicas de inmunoperoxidasa:

33.3.2. Técnicas con anticuerpos marcados.

En ellas el trazador enzimático se une por enlace covalente al anticuerpo, realizándose un método directo o indirecto.

33.3.2.1. Método directo.

El fundamento consiste en, que el anticuerpo se conjuga directamente con la peroxidasa.

Ventaja: sencillez.

Inconveniente: menor sensibilidad en la detección de antígenos que el método directo, aunque superior a los métodos de inmunofluorescencia.

Dificultades:

- A veces es dificultosa la conjugación enzima-anticuerpo.
- Durante la conjugación puede debilitarse la actividad del anticuerpo y/o de la enzima.
- En ocasiones se mezclan anticuerpos no conjugados con los conjugados, siendo muy difícil purificar los conjugados

33.3.2.2. Método indirecto.

El fundamento consiste en, que en una primera fase se une el anticuerpo primario específico al antígeno de un tejido.

En una segunda fase se añade un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, obtenido de otro animal, que se une específicamente al anticuerpo primario.

Ventajas:

- Mayor sensibilidad.
- El anticuerpo secundario puede utilizarse para diversos anticuerpos o antisueros primarios de una misma especie.

Dificultades: la unión enzima-anticuerpo secundario es laboriosa y a veces los resultados que se obtienen son irregulares.

Inconvenientes de los métodos de inmunoperoxidasa:

- La peroxidasa propia de los tejidos puede originar falsos positivos.

33.3.3. Técnicas con anticuerpos no marcados. Técnica de peroxidasa- antiperoxidasa (PAP).

Como trazador se utilizan inmunocomplejos formados por precipitación y constituidos por 3 moléculas de peroxidasa más 2 moléculas de anticuerpos específicos frente a ella, en vez de anticuerpos marcados.

Reactivos inmunes necesarios:

- Anticuerpo primario.
- Anticuerpo secundario que hace de puente entre el Ac primario y el complejo PAP.
- Complejo PAP, que contiene la enzima trazadora.

Este método de inmunolocalización es mucho más eficaz y sensible que otros métodos anteriormente descritos.

Ventajas:

- Se demuestran antígenos sin necesidad de marcar los anticuerpos empleados, evitándose manipulaciones y pérdida de actividad.
- Hay al menos 3 moléculas de inmunoperoxidasa en el complejo final por cada molécula de anticuerpo primario ligado, lo cual incrementa notablemente la sensibilidad.

Técnica.

- Fijador: FORMALINA 10%
- Cortes: en parafina, 5 micras, sobre láminas cubiertas de pegamento.

Soluciones:

1. Solución metanol-peróxido de hidrógeno 3%.
2. Solución de anticuerpo primario.
3. Solución de anticuerpo puente.
4. Solución del complejo peroxidasa-antiperoxidasa.
5. Solución salina de fosfato estabilizadora, pH 7 - 7,6.
6. Solución sustrato diaminobencidina.
7. Solución de Hematoxilina de Mayer.
8. Solución de tripsina.

33.3.4. Técnicas con Fosfatasa Alcalina.

La fosfatasa alcalina es más difícil de utilizar que la peroxidasa. Hidroliza ésteres de fosfato en un medio básico.

El revelado de la enzima se hace con: naftol-AS-fosfato como sustrato y sales de diazonio como agente de copulación, obteniéndose como resultado un colorante azoico rojo o azul.

Inconveniente: necesita un medio de montaje acuoso.

Ventaja: Existen pocos tejidos con fosfatasa alcalina endógena.

Las técnicas que usan la fosfatasa alcalina como trazador pueden usar: Anticuerpos marcados (directo o indirecto), o Anticuerpos no marcados (Ej. técnica de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina).

33.3.5. Técnica de Avidina – Biotina.

Se basa en la gran fuerza no inmune que existe entre las moléculas de biotina (vitamina de escaso peso molecular del grupo B presente en la yema de huevo) y las de Avidina (presente en la clara del huevo y en la bacteria *Streptomyces avidinii*).

Ambas sustancias pueden unirse a anticuerpos o enzimas, pero sobre todo lo hace la biotina, debido a su pequeño tamaño.

Se puede marcar con biotina el anticuerpo primario (método directo) o más frecuentemente el anticuerpo secundario (método indirecto).

En todas las variantes que existen se pueden unir numerosas moléculas de biotina a un solo anticuerpo, lo cual facilita una alta sensibilidad y permite el uso del anticuerpo primario muy diluido.

Fijación: en formalina neutra al 10%, estabilizada.

Cortes: de parafina a 5 micras, en láminas cubiertas con pegamento.

Soluciones:

1. Solución de peróxido de hidrógeno
 - Metanol al 3%.
 - Suero normal (de la misma especie que el anticuerpo puente).
 - Suero normal (de la misma especie que el anticuerpo primario).

2. Solución primaria de anticuerpos.
3. Solución de anticuerpos puente.
4. Solución salina de fosfato estabilizadora (PBS), pH:7 a 7,6.
5. Solución sustrato de diaminobencidina (DAB).
6. Solución de hematoxilina de Mayer.
7. Solución de Tripsina. Método:
 1. Se desparafina e hidrata.
 2. Solución de Peróxido de Hidrógeno, media hora, para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena.
 3. Lavar con agua destilada.
 4. Introducir en solución estabilizadora.
 5. Solución de Tripsina, a 37°C, 3 - 10 min. (opcional).
 6. Enjuagar con solución estabilizadora.
 7. Poner en suero de la especie animal en la que el anticuerpo puente es producido, 30 min.
 8. Colocar 30 min. en solución de Ac primario.
 9. Enjuagar con sol estabilizadora.
 10. Colocar en sol de Anticuerpos puente, 30 min.
 11. Enjuagar con sol estabilizadora.
 12. Sol avidina-biotina, 30 min.
 13. Enjuagar con sol estabilizadora.
 14. Sol de diaminobencidina, 10 min.
 15. Enjuagar con sol estabilizadora y después con agua destilada.
 16. Teñir con Hx de Mayer, 5 min.
 17. Lavar con agua tibia, 10 min.
 18. Se deshidrata y aclara con alcohol etílico 95%--absoluto.
 19. Xileno, 2 pases de 2 min.
 20. Montar en resina.

33.4. Controles de calidad.

Estas técnicas necesitan de controles internos o paralelos, usualmente positivos y negativos.

El control negativo se obtiene realizando la misma técnica, pero con omisión del paso de incubación con anticuerpo primario.

Uno de los problemas actuales con estas técnicas no es la técnica en sí, manual o automatizada, o la posibilidad de acceder a los numerosos anticuerpos existentes, sino la interpretación de los resultados.

Los errores de interpretación disminuyen a un nivel aceptable cuando el patólogo y sus colaboradores tienen experiencia en estas técnicas y los resultados se analizan a la luz de los demás hallazgos clínico-patológicos.

Las técnicas inmunohistoquímicas son técnicas que permiten la visualización de la reacción antígeno-anticuerpo añadiendo un trazador enzimático junto a una sustancia denominada cromógeno. La enzima peroxidasa es el trazador enzimático que más se utiliza.

De forma paralela, se establecen controles de calidad externa controlados por entidades independientes como el que proporciona la SEAP (Sociedad Española de Anatomía Patológica). Los Sistemas Externos de Garantía de Calidad son necesarios en Patología.

El programa de calidad de la SEAP comenzó en 2004. Desde entonces está creciendo y mejorando para alcanzar los objetivos básicos: promover y difundir la calidad en España ayudando a los laboratorios a mejorar la calidad de las técnicas en las que basan su diagnóstico diario y en las que se basan las decisiones más críticas de pronóstico y tratamiento de los pacientes.

Se ha ido ampliando el espectro del control en Patología y por ello, actualmente el programa consta de las siguientes secciones y los siguientes módulos:

1. Sección de Inmunohistoquímica (IHQ) y Patología Molecular (PM).

a. IHQ.

i. Módulo de patología quirúrgica.

ii. Módulo de HER2-neu.

iii. Módulo de patología mamaria.

iv. Módulo de hematopatología.

b. PM.

i. Módulo de patología molecular para RAS.

ii. Módulo de patología molecular para BRAF.

iii. Módulo de patología molecular para EGFR.

iv. Módulo de HPV.

v. Otras: ALK mediante IHQ, ALK mediante FISH.

2. Sección garantía de calidad de diagnóstico.

a. Módulo de Diagnóstico en Citopatología.

b. Módulo de Diagnóstico en Patología Quirúrgica.

A la hora de seleccionar unos u otros programas es importante señalar que los hay personales (Diagnóstico) e institucionales (IHQ y PM).