

Adaptación del anticuerpo MIB-1 a una técnica de inmunohistoquímica basada en transporte capilar de reactivos.

I. CUIEL, F. GÓMEZ, MT. CORCUERA, M. ROLDÁN, A. PICAZO, E. MUÑOZ Y M. J. ALONSO.

Servicio de Anatomía Patológica. Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

SUMMARY

Adaptation of MIB-1 antibody to an immunohistochemical technique based upon the capillary action principle.

MIB-1 antibody recognizes Ki-67 antigen in formalin fixed, paraffin embedded biopsy specimens, so it is useful to estimate the proliferation rate in a cellular population. We have adapted its utilization in an immunohistochemical work station based in the capillar transport of reactivos principle. Biopsy specimens of lymph node diagnosed as high-grade lymphoma and an avidine-biotin-alkaline phosphatase immunohistochemical kit were used in this study. The results are similar to those obtained with the manual methods, so the nuclei of positive cells appear stained in bright red. This adaptation brings forward swiftness and simplicity and it permits to quantify the proliferation rate with image analysis

Key words: Immunohistochemical methods. MIB-1. Cell proliferation.

INTRODUCCION

La fracción de proliferación de una población celular se puede estimar mediante la detección inmunohistoquímica de antígenos como el Ki-67 y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

En 1992, Key et al (1), utilizando partes recombinantes del Ki-67 como inmunógenos, obtuvieron tres anticuerpos, denominados MIB 1-3. Sin embargo, su aplicación inicial a material fijado e incluido en parafina fue desalentador, ya que MIB-1 y MIB-3 sólo marcaban débilmente figuras mitóticas, mientras que MIB-2 daba resultados negativos al igual que Ki-67. Un año antes, Shi et al (2), habían puesto a punto un método desenmascarador de antígenos en material fijado e incluido en parafina mediante la utilización de un tratamiento con calor por microondas. La aplicación de MIB-1 y MIB-3 conjuntamente con este método demos-

tró la viabilidad de esos anticuerpos como marcadores de proliferación celular en material procesado rutinariamente (3).

Concretamente, el anticuerpo MIB-1 ha dado excelentes resultados con técnicas manuales de inmunohistoquímica. Sin embargo, su adaptación a sistemas de inmunohistoquímica basados en transporte capilar de reactivos ha supuesto serios problemas y los resultados en muchos casos han sido decepcionantes.

MATERIAL Y METODOS

La adaptación se ha llevado a cabo sobre cortes de biopsias de ganglio con linfoma de alto grado.

Se ha utilizado un anticuerpo monoclonal de ratón concentrado anti Ki-67, clon MIB-1 (Immunotech S.A.), y el equipo de inmunohistoquímica "Ultraprobe" (Biomedica Corp.), basado en el método avidina-biotina-fosfatasa alcalina. Todas las incubaciones, excepto el tratamiento en microondas, se realizaron en la estación de trabajo para inmunohistoquímica "Microprobe" (Biomedica Corp.), basada en el principio de transporte capilar de reactivos (4). El tratamiento desenmascarador

Correspondencia: Dra. María José Alonso-Martín. Servicio de Anatomía Patológica. Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva. Instituto de Salud Carlos III. c/ Sinesio Delgado 10. 28029 Madrid.

de antígenos se efectuó en un horno microondas con una potencia de 1250 W (Balay BAHM 100). El protocolo seguido ha sido el siguiente:

1. Desparafinar y rehidratar los cortes de tejido hasta tampón de lavado (Biomed Corp.).
2. Redusol (Biomed Corp.), 2 minutos a 40°C.
3. Cuatro lavados con tampón a temperatura ambiente (t.a.).
4. Pepsina (Biomed Corp.), 5 minutos a 40°C.
5. Tres lavados con tampón a t.a.
6. Introducir los portaobjetos en tampón citrato pH 6 y someter a dos tratamientos de cinco minutos en horno microondas. Dejar enfriar hasta la t.a. y realizar dos lavados con agua destilada.
7. Lavado con tampón a t.a.
8. Anticuerpo primario (MIB-1) diluido 1/30 en PBS, 1 hora a 40°C.
9. Dos lavados con tampón a t.a.
10. Anticuerpo secundario polivalente biotilado, 10 minutos a 40°C.
11. Dos lavados con tampón a t.a.
12. Avidina-fosfatasa alcalina, 10 minutos a 40°C.
13. Un lavado con tampón a t.a.
14. Un lavado con amplificador de fosfatasa (Biomed Corp.) a t.a.
15. Sustrato/cromógeno (naftol fosfato/fast red), 15 minutos a 40°C.
16. Un lavado con agua destilada a t.a.
17. Hematoxilina de Mayer, 10 segundos a t.a.
18. Dos lavados con agua destilada a t.a.
19. Un lavado con tampón a t.a.
20. Un lavado con agua destilada a t.a.
21. Montaje con glicerol-gelatina o similar.

RESULTADOS

Las células positivas presentan un núcleo de color rojo brillante, mientras que las células negativas presentan un núcleo de color azul debido a la coloración de contraste (fig. 1).

DISCUSION

Numerosos estudios demuestran que el índice de proliferación de una población de células tumorales tiene una clara significación pronóstica. Este índice se puede calcular directamente estudiando el ciclo celular por citometría de flujo o análisis de imagen, o se puede estimar indirectamente mediante la detección inmunohistoquímica de antígenos de proliferación celular (5,6).

El antígeno nuclear Ki-67 está presente en todas las fases del ciclo celular, excepto en G₀, pero presenta el inconveniente de ser lábil a la fijación, por lo que su inmunolocalización ha de realizarse en material fresco (7,8). El PCNA no presenta este inconveniente, pero,

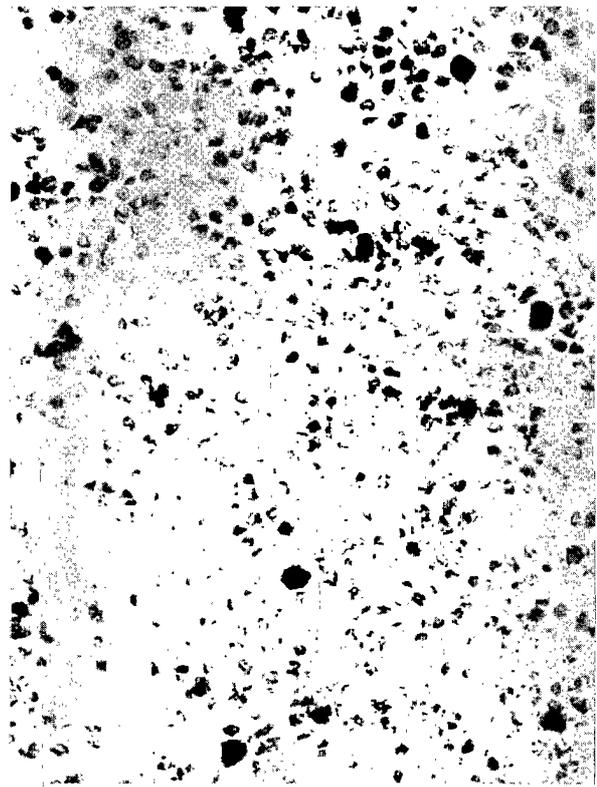


Figura 1: Biopsia de ganglio axilar de linfoma no-Hodking de alto grado de malignidad en la que se ha realizado la técnica de inmunohistoquímica descrita en este trabajo. Las células MIB-1 positivas presentan sus núcleos de color rojo intenso.

sin embargo, algunos trabajos comparativos concluyen la existencia de una sobreestimación en los valores obtenidos con este antígeno debido a su larga vida media o a una estabilización de su ARNm, lo que hace detectable a esta proteína incluso en células no cíclicas (9,10).

El anticuerpo MIB-1, reúne las mejores características de los dos anteriores: detecta el antígeno Ki-67 y se puede emplear en material fijado e incluido en parafina.

Los resultados obtenidos con el protocolo descrito en este trabajo son similares a aquellos obtenidos con técnicas manuales de inmunohistoquímica, permitiendo distinguir claramente los núcleos positivos, de color rojo, de los negativos, de color azul. Además presenta ventajas adicionales, por la sencillez técnica y la rapidez que implican los sistemas de transporte capilar de reactivos. Por otra parte, la diferencia de color entre los núcleos de las células positivas y negativas posibilita la aplicación de análisis de imagen para cuantificar el área nuclear positiva para este anticuerpo como una estimación del índice de proliferación de una población celular en estudio.

RESUMEN

El anticuerpo MIB-1 reconoce el antígeno Ki-67 en material fijado e incluido en parafina. por lo que resulta idóneo para calcular la fracción de proliferación de una población celular. Nosotros hemos adaptado su empleo a una estación de trabajo para inmunohistoquímica basada en el principio de transporte capilar de reactivos. Se han utilizado biopsias de ganglio con linfoma de alto grado y un equipo de reactivos basado en el método avidina-biotina-fosfatasa alcalina. Los resultados son similares a los obtenidos con técnicas manuales. observándose los núcleos de las células positivas de color rojo brillante. Esta adaptación aporta rapidez y sencillez técnica y permite la aplicación de análisis de imagen para cuantificar la fracción de proliferación.

Palabras clave: Métodos inmunohistoquímicos. MIB-1. Proliferación celular.

BIBLIOGRAFIA

1. Key G, Becker MHG, Duchrow M, Shinter C, Gerdes J. New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) prepared against recombinant parts of the Ki-67 antigen. *Anal Cell Pathol* 1992; 4: 181.
2. Shi RR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwaves oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748.
3. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant part of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin section. *J Pathol* 1992; 168: 357-363.
4. Brigati DJ, Budgeon LR, Unger ER, et al. Immunocytochemistry is automated: Development of a robotic workstation based upon the capillary action principle. *J Histotechnol* 1988; 11: 165-183.
5. Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic. *J Pathol* 1990; 160: 93-102.
6. Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: S4-S13.
7. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
8. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1716.
9. Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
10. Bravo R, MacDonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin-proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987; 10: 1549-1554.

