



# Técnicas de inmunohistoquímica

## ESTUDIO DE LA APOPTOSIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE TUNEL

A. Panizo Santos y F. Vega Vázquez

*Departamento de Anatomía Patológica, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona.*

### INTRODUCCIÓN

La apoptosis es una forma activa de muerte celular programada genéticamente como respuesta a señales moleculares externas o internas, que fue identificada debido a su característica morfológica por Kerr y cols. en 1972 (1). A diferencia de la necrosis celular, la apoptosis es un proceso activo que requiere la energía y la expresión de ciertos genes.

La expresión morfológica de la apoptosis se caracteriza por la condensación de la heterocromatina nuclear, la disminución del tamaño celular y la condensación citoplasmática, lo que da lugar a la imagen morfológica que se conoce como cuerpo apoptótico. Es un proceso que ocurre con tanta rapidez que es difícil observarlo y cuantificarlo utilizando únicamente la morfolología.

Los métodos de detección de la apoptosis se clasifican en dos tipos: a) métodos directos, que nos permiten objetivar la presencia o ausencia de apoptosis en un determinado tejido, y b) métodos indirectos, que analizan la expresión de diferentes genes que controlan este proceso (familia bcl-2, p53, familia ICE, Fas, etc.).

### TÉCNICA DE TUNEL

Un método directo útil para estudiar la apoptosis es la técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*), descrita por Gavrieli y cols. en 1992 (2). Durante la apoptosis las endonucleasas nucleares digieren el DNA genómico en fragmentos oligonucleosomales de aproximadamente 180-200 pares de bases, hecho que favorece la realización de esta técnica.

Los fragmentos de DNA se marcan mediante la incorporación catalítica de 16-dUTP marcado en los extremos libres, por medio de la enzima transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT). La accesibilidad de la enzima a los puntos de rotura del DNA está disminuida debido a las proteínas nucleares (3) y a los procesos de fijación de la muestra y posterior fijación en etanol (2, 4). Debido a estos factores se han desarrollado diferentes métodos de desenmascaramiento para mejorar la sen-

sibilidad de la técnica de TUNEL: incubación con detergentes (triton X-100) (5), enzimas proteolíticas (proteína K 25 mg/ml en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y dos lavados posteriores en PBS) (6, 7) y pretratamiento de la muestra con microondas (370 W durante 5 minutos en coplín con 200 ml de citrato *buffer* 0,01 M, pH 6) (8, 9).

Tras el desenmascaramiento de los puntos de rotura del DNA se añade la enzima TdT y 16-dUTP marcado mediante digoxigenina y anticuerpos frente a digoxigenina marcados con peroxidasa. La reacción enzimática se bloquea posteriormente mediante dos lavados de 5 minutos en NaCl 30 mM y 30 mM de citrato sódico. Posteriormente se lleva a cabo el revelado de la peroxidasa como en cualquier técnica inmunohistoquímica: la unión de la peroxidasa se visualiza utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03%, como sustrato, y diaminobencidina (1 mg/ml en Tris al 0,05 M, pH 7,6) como cromógeno. Las muestras se contrastan con verde metilo o hematoxilina de Harris.

Cada laboratorio debe protocolizar y estandarizar los diferentes pasos (fijación de la muestra, pretratamientos...) en la técnica de TUNEL, ya que la concentración óptima de los reactivos empleados en la técnica varía de un tejido a otro. La interpretación de los resultados debe hacerse siempre y cuando los controles positivos y negativos que se realizan en cada prueba sean correctos, y en el caso del control positivo debe ser una señal intensa nuclear. Es importante el empleo de controles externos positivos y negativos, ya que con frecuencia esta técnica obtiene resultados falsamente positivos (dando lugar a índices de apoptosis exageradamente elevados como para ser reales) y falsamente negativos.

Diversos autores, entre ellos Ansari y cols., han mencionado que la técnica de TUNEL es selectiva (más que específica) para los núcleos de las células en apoptosis, ya que éstas presentan un mayor grado de fragmentación del DNA (10). Es importante tener en cuenta el grado de fragmentación, ya que puede darse fragmentación de DNA en numerosas situaciones biológicas o artefactuales, como por ejemplo:

- a) Necrosis.
- b) Replicación, reparación, recombinación o compactación-relajación del DNA durante la mitosis.
- c) Fijación de la muestra, inclusión en parafina y corte histológico del tejido.
- d) Pretratamientos con detergentes y proteínasa K.

Mediante esta técnica se visualizan por medio de tinción nuclear aquellas células que presentan roturas de DNA características de apoptosis. Incluso se detectan células con características bioquímicas de apoptosis (rotura característica del DNA) y sin rasgos morfológicos celulares aún de apoptosis (preapoptosis) (2, 7).

En los últimos años se está estudiando la apoptosis como un factor que participa en la patogénesis de numerosos procesos patológicos. Los campos donde destaca el empleo de la técnica de TUNEL para el estudio de la apoptosis son:

- Patología cardiovascular: arterioesclerosis, isquemia miocárdica, hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca (11-14).
- Patología del trasplante: cardíaco, renal y hepático (15-18).
- Patología neuromuscular: enfermedades neurodegenerativas tipo Parkinson, esclerosis múltiple; patología isquémica y miopatías (19, 20).
- Patología autoinmune: lupus eritematoso, artritis reumatoide, tiroiditis autoinmune, vasculitis (21-23).
- Patología infecciosa (24, 25).
- Patología oncológica (26-29).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972; 26: 239-257.
2. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol 1992; 119: 493-501.
3. Kerrigan, D., Pommier, Y., Kohn, K.W. *Protein-linked DNA strand breaks produced by etoposide and teniposide in mouse L1210 and human VA-13 and HT-29 cell lines: Relationship to cytotoxicity*. NCI Monogr 1987; 4: 117-121.
4. Gorczyca, W., Tuziak, T., Kram, A., Malamed, M.R., Darzynkiewicz, Z. *Detection of apoptosis-associated DNA strand breaks in fine-needle aspiration biopsies by in situ end labelling of fragmented DNA*. Cytometry 1994; 15: 169-175.
5. Kressel, M., Groscurth, P. *Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA*. Cell Tis Res 1994; 278: 549-556.
6. Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H.P., Tokyka, K.V., Lassmann, H. *Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of in situ tailing and nick translation techniques*. Lab Invest 1994; 71: 219-225.

7. Migheli, A., Cavalla, P., Marino, S., Schiffer, D. *A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end labelling of DNA strand breaks.* J Neuropathol Exper Neurol 1994; 53: 606-616.
8. Lucassen, P.J., Chung, W.C.J., Vermeulen, J.P., Van Lookeren Campagne, M., Van Dierendonck, J.H., Swaab, D.F. *Microwave-enhanced in situ end-labelling of fragmented DNA: Parametric studies in relation to postmortem delay and fixation of rat and human brain.* J Histochem Cytochem 1995; 43: 1163-1171.
9. Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Azoti, L., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C., Brambilla, E. *TUNEL: Improvement and evaluation of the method for in situ apoptotic cell identification.* Biochemica 1997; 2: 12-17.
10. Ansari, B., Coates, B.D., Greenstein, B.D., Hall, P.A. *In situ end labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states.* J Pathol 1993; 170: 1-8.
11. Bjorkerud, S., Bjorkerud, B. *Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, specially in inflammatory cells (macrophages and T cells) and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability.* Am J Pathol 1996; 149: 367-380.
12. Veinot, J.P., Gattinger, D.A., Fliss, H. *Early apoptosis in human myocardial infarcts.* Hum Pathol 1997; 28: 485-492.
13. Teiger, E., Than, V.D., Richard, L. *Apoptosis in pressure overload induced heart hypertrophy in the rat.* J Clin Invest 1996; 97: 2891-2895.
14. Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J.A., Quaini, E. y cols. *Apoptosis in the failing human heart.* N Engl J Med 1997; 336: 1131-1141.
15. Dong, C., Wilson, J.E., Winters, G.L., McManus, B.M. *Human transplant coronary artery disease: Pathological evidence for fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy.* Lab Invest 1996; 74: 921-931.
16. Szabolcs, M., Michler, R.E., Yang, X., Aji, W., Roy, D., Athan, E., Sciacca, R.R., Minanov, O.P., Cannon, P.J. *Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase.* Circulation 1996; 94: 1665-1673.
17. Ito, H., Kasagi, N., Shomori, K. y cols. *Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labelling.* Transplantation 1995; 60: 794-798.
18. Krams, S.M., Egawa, H., Quinn, M.B., Martínez, O.M. *Apoptosis as a mechanism of cell death in rat model of liver allograft rejection.* Transplant Proc 1995; 27: 466-467.
19. Offen, D. y cols. *Dopamine-melanin induces apoptosis in PC12 cells; possible implications for the etiology of Parkinson's disease.* Neurochem Int 1997; 31: 207-216.
20. Dowling, P., Husar, W., Menonna, H., Donnenfeld, H., Cook, S., Sidhu, M. *Cell death and birth in multiple sclerosis brain.* J Neurol Sci 1997; 149: 1-11.
21. Young, L.H.Y., Joag, S.V., Lin, P.Y. y cols. *Expression of cytolytic mediators by synovial fluid lymphocytes in rheumatoid arthritis.* Am J Pathol 1992; 140: 1261-1268.
22. Wu, Z., Podack, E.R., McKenzie, J.M., Olsen, K.J., Zakarija, M. *Perforin expression by thyroid-infiltrating T cells in autoimmune thyroid disease.* Clin Exp Immunol 1994; 98: 470-477.
23. Secko, Y., Minota, S., Kawasaki, A. y cols. *Perforin-secreting killer cell infiltration and expression of a 65-kD heat-shock protein in aortic tissue of patients with Takayasu's arteritis.* J Clin Invest 1994; 93: 750-758.
24. Ito, M. y cols. *Apoptosis of cord blood T lymphocytes by herpes simplex virus type Y.* J Gen Virol 1997; 78: 1971-1975.
25. Chisari, F.V., Ferrari, C. *Hepatitis B virus immunopathogenesis.* Annu Rev Immunol 1995; 13: 29-60.
26. Baretton, G.B., Diebold, J., Chistoforis, G. y cols. *Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas.* Cancer 1996; 77: 255-264.
27. Aihara, M., Scardino, P.T., Truong, L.D. y cols. *The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason grade 3 adenocarcinomas of the prostate.* Cancer 1995; 75: 522-529.
28. Leoncini, L., Del Vecchio, M.T., Megha, T. y cols. *Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas.* Am J Pathol 1993; 142: 755-763.
29. Bouscary, D. y cols. *Fas/Apo-1 (DC95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes.* Leukemia 1997; 11: 839-845.

