

Por gentileza de



DAKO

Técnicas de inmunohistoquímica

PAPEL DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN CITOLOGÍA

M.D. Lozano y A. Panizo

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

La inmunohistoquímica se ha convertido en una técnica casi imprescindible en el diagnóstico histopatológico de muchas neoplasias y otras lesiones. La posibilidad de teñir y poner de manifiesto proteínas celulares, y más recientemente algunos genes y sus productos, en secciones tisulares representa un gran avance en nuestras capacidades diagnósticas.

La importancia de la inmunohistoquímica en citología está claramente reconocida. En general, la citología ofrece menos claves diagnósticas que la biopsia, la arquitectura de las lesiones es menos aparente, y hay mayores problemas por muestra inadecuada o insuficiente, lo que hace que algunas claves diagnósticas de determinadas lesiones puedan no estar presentes. A esto hay que añadir el aumento creciente en la demanda de diagnósticos citológicos, todo lo cual hace suponer que las técnicas de ayuda al diagnóstico como la inmunohistoquímica tengan incluso más aplicación en citología que en biopsias (1-4). De hecho, las principales indicaciones de la inmunohistoquímica en citología son superponibles a las de la biopsia, y pueden resumirse en las siguientes:

- Ayuda en el diagnóstico y tipificación de tumores poco diferenciados.
- Identificación del tumor primario en determinadas lesiones metastásicas (mama, tiroides, próstata, melanoma).
- Diagnóstico diferencial de adenocarcinoma frente a mesotelioma.

Sin embargo, hoy día la inmunohistoquímica no es una técnica ampliamente aceptada en citología. En general, carece de métodos estándar y ofrece resultados dispares. No existen series largas con protocolos

establecidos, y faltan estudios comparativos entre la citología y la biopsia (1, 5-7). En la literatura existen algunos estudios que comparan diversos métodos de fijación y tipos de muestras con resultados variables (8). En esta revisión se ponen de manifiesto los logros y las aplicaciones, así como algunos problemas en la práctica de inmunohistoquímica en citología.

Al igual que ocurre con la inmunohistoquímica sobre secciones tisulares, son factores determinantes del éxito de la inmunohistoquímica el material sobre el que se aplican las técnicas, el tipo y características de fijación, los procesos de digestión enzimática, el método de tinción inmunohistoquímica empleado, los procedimientos de bloqueo de enzimas endógenas, y los tipos de anticuerpos y diluciones de los mismos utilizados. Todo esto es igualmente aplicable a la citología, con el añadido de que en ocasiones el mismo anticuerpo aplicado a un tejido y a una extensión citológica puede requerir condiciones de trabajo diferentes. En este sentido, existen resultados variables en las series publicadas según los anticuerpos utilizados y la experiencia de los laboratorios (1, 2, 5, 6). Así, el porcentaje de casos en que la inmunohistoquímica fue de alguna utilidad diagnóstica varía del 50% al 82% (1, 5, 7). Esta variabilidad en los resultados se ha atribuido a diversos factores:

- El número limitado de preparaciones citológicas comparado con la cantidad de cortes que pueden obtenerse de un bloque de parafina. Por ello, la elección de los anticuerpos debe ser cuidadosa.
- La arbitrariedad en la cantidad y calidad del material citológico en los diferentes extendidos, incluso en los provenientes de una misma muestra (por ejemplo PAAF). La inevitable superposición excesiva y agrupamientos celulares y la presencia de fondos intensamente hemorrágicos y necróticos, así como de material proteináceo en el fondo de las extensiones, pueden impedir la correcta difusión del anticuerpo.
- Problemas técnicos que se derivan y varían con la experiencia de cada laboratorio.

Todo esto da lugar a serios problemas de interpretación y al riesgo de falsos positivos y negativos. Una tinción falsamente positiva se deriva de células degeneradas que absorben el anticuerpo de forma inespecífica o en restos de membranas celulares embebidas en líquidos proteináceos. Por el contrario, no son raros los falsos negativos debidos a la pérdida de inmunorreactividad para algunos anticuerpos cuando las células se disponen de forma muy cohesiva, especialmente cuando están degeneradas debido a un retraso en la fijación, lo cual impide una adecuada penetración de los anticuerpos (1, 9). Otras fuentes de falsos negativos son una inapropiada dilución de los anticuerpos, una baja concentración antigénica en las células que se analizan, y problemas inherentes a la experiencia de quién realiza la técnica. La existencia de fondo que dificulta la interpretación de los resultados es un problema frecuente. Generalmente se debe a la presencia de líquido rico en proteínas y hematíes en el fondo de las extensiones, que puede interferir total o parcialmente la interpretación de los resultados.

En un intento de obviar al menos en parte estos problemas se han propuesto diferentes soluciones (8, 10):

- El procedimiento de fijación ideal debe ser de uso fácil y preservar adecuadamente la citomorfología y la inmunorreactividad frente a varios antígenos. En este sentido, distintos grupos han recomendado diversos fijadores y métodos de fijación: desde el convencional alcohol de 96° hasta complicados protocolos que incluyen combinaciones de acetona, formol y glutaraldehído con tiempos y concentraciones determinados (1, 8).
- El uso de bloques celulares conlleva obtener mejores resultados (1, 11, 12). Una de las mayores ventajas es que permiten la realización de diversos anticuerpos en las mismas células, y los portos se procesan como cualquier biopsia. Sin embargo, esto no siempre es posible, especialmente cuando el material citológico es escaso. Por ello esta técnica se sigue aplicando a extensiones fijadas en alcohol no teñidas y a las teñidas con Papanicolaou (8, 13).

Nuestra experiencia en la actualidad se basa en la aplicación de 25 anticuerpos a más de 150 muestras citológicas después de varios meses de optimización de estas técnicas. Las muestras proceden en un 70% de PAAF y el resto corresponden a líquidos corporales. Todas las muestras han sido fijadas de forma rutinaria en alcohol de 96°. Siempre realizamos la técnica de forma manual con estreptavidina-peroxidasa, revelado con AEC, y recuperación antigénica con microondas.

La Tabla 1 muestra los anticuerpos con los cuales tenemos experiencia en citología, y las Figs. 1 y 2 son dos ejemplos representativos. No conocemos referencias en la literatura que comparen el rendimiento de los diferentes anticuerpos comercializados. En nuestro laboratorio, de los 25 anticuerpos analizados, obtenemos sistemáticamente tinciones débiles y poco valorables con progesterona, HMB45, MT1 y MB2. Al igual que lo publicado en otras series, los mejores resultados a excepción del bloque celular se obtienen en extensiones previamente teñidas con Papanicolaou (1, 13-15). La realización de técnicas de inmunohistoquímica directamente sobre extensiones teñidas con Papanicolaou tiene una serie de ventajas sobreañadidas, entre ellas la conservación de la citomorfología, que conlleva una buena preservación antigénica, disminuye la tinción de fondo y permite estudios retrospectivos.

Dadas las especiales características de la citología y su creciente auge como método diagnóstico, es importante la aplicación y optimización de cualquiera de las técnicas aplicables a la biopsia. La realización de inmunohistoquímica sobre extendidos citológicos es hoy día una ayuda diagnóstica con el mismo valor que tiene en el estudio de secciones tisulares, pero con una serie de limitaciones que deben ser tenidas en cuenta y que derivan de la propia naturaleza del material sobre el que se trabaja. Por ello, a la hora de aplicarla, es necesaria una interpretación cuidadosa basada en la propia experiencia con cada anticuerpo.

Tabla 1. Características de algunos anticuerpos utilizados en citología.

Anticuerpo	Clon	Dilución	Laboratorio
Pan-CK	Policlonal	Prediluido	Biogenex
CAM 5.2	CAM 5.2	Prediluido	Beckton
CK7	LP5K	1/10	Novocastra
CK20	Ks20.8	1/100	Dako
CEA	SP-651	1/800	Biogenex
CA125	Ov185:1	1/1000	Novocastra
CA19.9	C241:5:1:4	1/1000	Novocastra
Vimentina	V9	1/1000	Dako
S-100	HMB-45	1/100	Biogenex
NSE	N3	1/1000	Biogenex
Estrógenos	ER1D5	1/300	Novocastra
Progesterona	1A6	1/100	Novocastra
Tiroglobulina	Tg6	Prediluido	Biogenex
PSA	Policlonal	1/10.000	Dako
Calcitonina	Policlonal	1/400	Biogenex
Cromogranina	LK2H10	1/800	Biogenex
Alfa-FP	C3	1/50	Novocastra
CD99	O13	1/15	Signet
CD34	MY10	1/200	Beckton
ALC	CD45	1/800	Biogenex
CD20	L26	1/800	Dako
CD3	Policlonal	Prediluido	Signet
CD43	MT1	1/400	Biogenex
MB2	MB2	1/400	Biogenex



Figura 1. Adenocarcinoma en líquido pleural con marcada inmunorreactividad frente a CEA.

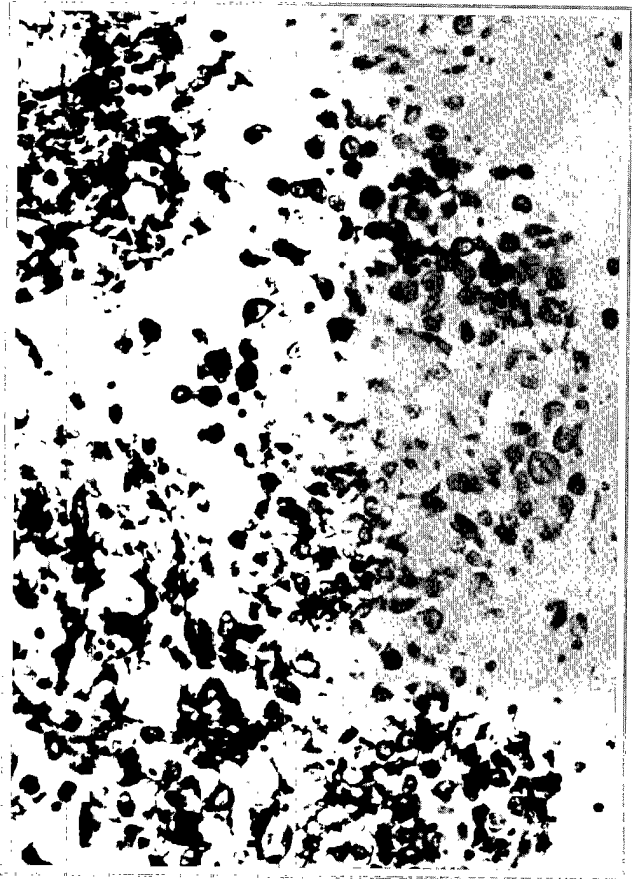


Figura 2. Intensa positividad para vimentina en un sarcoma sinovial (PAAF de masa en partes blandas).

BIBLIOGRAFÍA

- Shield PW, Perkins G, Wright G. *Immunocytochemical staining of cytologic specimens. How helpful is it?* Am J Clin Pathol 1996; 105: 157-162.
- Leong ASY. *Immunostaining of cytologic specimens.* Am J Clin Pathol 1996; 105: 139-140.
- Leong ASY, Wannakrairot P. *A retrospective analysis of immunohistochemical staining in identification of poorly differentiated round cell and spindle cell tumors: Results, reagents, and costs.* Pathology 1992; 24: 254-260.
- Dalquen P, Sauter G, Epper R y cols. *Immunocytochemistry in diagnostic cytology.* Recent Results Cancer Res 1993; 133: 47-80.
- Flens MJ, Van der Aik P, Tadema TM y cols. *The contribution of immunohistochemistry in diagnostic cytology: Comparison and evaluation with immunohistology.* Cancer 1990; 65: 2704-2711.
- Osamura RY. *Applications of immunocytochemistry to diagnosis cytopathology.* Diagn Cytopathol 1989; 5: 55-63.
- Chess Q, Hadju SI. *The role of immunoperoxidase staining in diagnostic cytology.* Acta Cytol 1986; 30: 1-7.
- Suthipintawong C, Leong ASY, Vinyuvat S. *Immunostaining of cell preparations: A comparative evaluation of common fixatives and protocols.* Diagn Cytopathol 1996; 15: 167-174.
- Wazir JF, Martin-Bates E, Woodward G, Coleman DV. *Evaluation of immunocytochemical staining as a method of improving diagnostic accuracy in a routine cytopathology laboratory.* Cytopathology 1991; 2: 75-82.
- Reynolds GM, Young FI, Young JA y cols. *Microwave oven antigen retrieval applied to the immunostaining of cytopathology specimens.* Cytopathology 1994; 5: 245-258.
- Domagala WM, Markiewski M, Tuziak T, Kram A, Weber K, Osborn M. *Immunocytochemistry on fine-needle aspirates in paraffin miniblocks.* Acta Cytol 1990; 34: 292-296.
- Kung ITM, Chan ST, Lo ESF. *Application of immunoperoxidase technique to cell block preparations from fine-needle aspirates.* Acta Cytol 1990; 34: 297-303.
- Abendroth CS, Dabbs DJ. *Immunocytochemical staining of previously stained cytologic specimens.* Acta Cytol 1995; 39: 379-386.
- Travis WD, Wold LE. *Immunoperoxidase staining of fine needle aspiration specimens previously stained by the Papanicolaou technique.* Acta Cytol 1987; 31: 517-520.
- Weintraub J, Redard M, Wegner D, Vassilakos P. *The application of immunocytochemical techniques to routinely-fixed and stained cytologic specimens.* Path Res Pract 1990; 186: 658-665.