



Técnicas de inmunohistoquímica

DOBLE MARCAJE EN INMUNOHISTOQUÍMICA

A. Panizo y M.A. Idoate

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

El marcaje inmunohistoquímico múltiple supone una modificación de la técnica habitual de tinción. Su finalidad es la detección simultánea de dos o más antígenos diferentes en un mismo corte de tejido.

Para diferenciar las distintas reactividades, cada uno de los marcajes debe tener como resultado final una señal de un color diferente al resto de los marcajes. Hay diferentes estrategias para poder obtener este resultado y la elección de una u otra depende del criterio que queramos hacer prevalecer en cada caso: sensibilidad, economía, rapidez, minimización de reacciones cruzadas, alto contraste entre ambos marcajes, etc.

Para conseguir dos colores diferentes, cada uno marcando un antígeno distinto, hay dos opciones:

- Usar el mismo sistema enzimático en ambos antígenos y revelar con un cromógeno distinto en cada caso.
- Usar un sistema enzimático diferente, con su correspondiente cromógeno, para cada antígeno.

Técnicamente, una doble tinción inmunohistoquímica no supone mayor dificultad que la realización de dos técnicas simples consecutivas. El primer paso es optimizar cada una de las tinciones individuales que se van a combinar. Si en la doble tinción queremos incluir un anticuerpo que es nuevo para nosotros, se debe asegurar una calidad óptima de la técnica para dicho anticuerpo.

El desenmascaramiento antigénico se debe realizar cuando al menos uno de los antígenos lo requiera. En caso de que para el antígeno se recomiende un tratamiento distinto, se nos puede plantear algún problema. Entonces es recomendable hacer un único pretratamiento con calor al comienzo de la técnica, ya que combinar digestión enzimática y calentamiento suele tener como resultado una fuerte alteración del tejido que se traduce en una tinción deficiente con una pobre preservación morfológica.

Si vamos a combinar un antígeno nuclear con uno citoplasmático, de membrana o extracelular, se debe realizar inmunohistoquímica para el nuclear en primer lugar y con peroxidasa-DAB. Con ello logramos una tinción nuclear más definida (la DAB proporciona tinciones más nítidas que el Fast Red), y facilitare-



Figura 1. Doble inmunohistoquímica con citoqueratinas (color marrón) y actina muscular específica (color rojo) en un corte de mucosa cólica (original, x250).



Figura 2. Doble inmunohistoquímica con CD57-Leu7 (color marrón) y cromogranina (color rojo) en una metástasis ganglionar de un carcinoma neuroendocrino (original, x200).

mos la entrada del anticuerpo hasta el núcleo (los complejos Ag-Ac-enzima-cromógeno en la membrana o el citoplasma pueden dificultarla).

Dado que los sistemas de detección más ampliamente extendidos son los basados en métodos de avidina/biotina, serán éstos sobre los que centraremos nuestra explicación de las técnicas de doble marcaje, si bien podríamos utilizar igualmente sistemas de complejo enzima-anti enzima.

USO DEL MISMO SISTEMA ENZIMÁTICO Y REVELADO CON DISTINTOS CROMÓGENOS

Este método tiene como ventaja una mayor economía, ya que no es necesario disponer de un sistema de detección distinto al que se emplee habitualmente, sino tan sólo un conjunto de cromógeno-sustrato adicional. La desventaja es que las combinaciones de cromógenos distintos que se pueden conseguir no ofrecen un contraste tan alto como el que podemos obtener al emplear sistemas enzimáticos diferentes.

El sistema de detección habitualmente empleado está marcado con peroxidasa, por lo que la utilizaremos de cromógenos más empleada en la técnica de doble inmunomarcaje será: primero, el marcaje con DAB (color marrón), y segundo, el marcaje con AEC (color rojizo) (Figs. 1 y 2). El color rojo del AEC no es tan brillante como el que proporcionan los cromógenos de fosfatasa y en muchas ocasiones puede dar un tono pardusco que contrasta poco con la DAB. En estos casos es posible oscurecer la tinción de DAB con níquel, que proporciona un color gris-negrusco.

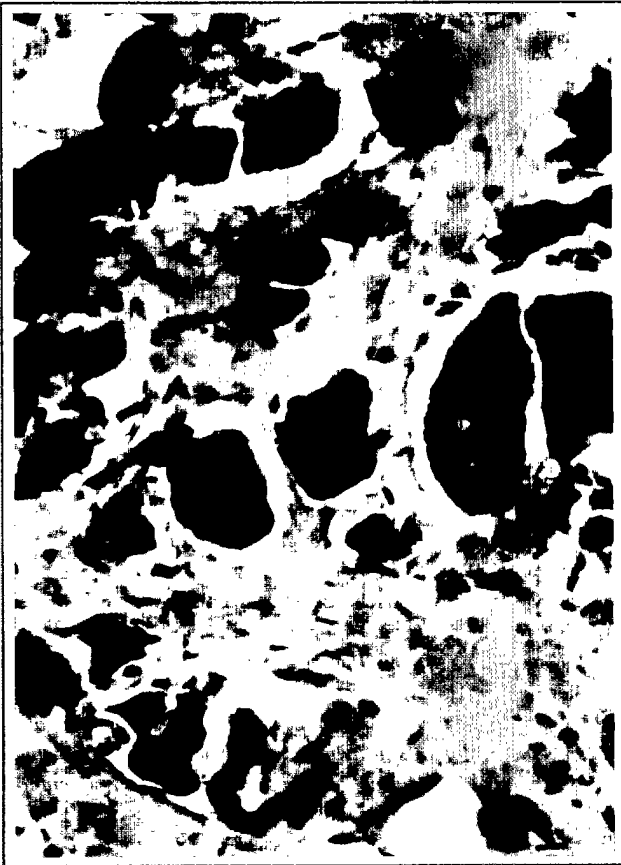


Figura 3. Doble inmunohistoquímica con estrógenos (color marrón) y citoqueratinas (color rojo) en un carcinoma de mama (original, x100).

a interrumpir la técnica en algún paso para continuarla más tarde o al día siguiente. Los dos pasos en que se puede detener la técnica son: después del revelado con DAB en el primer marcaje. En este caso, se introducen los portas en *buffer* y se mantienen en la nevera hasta el día siguiente a 4 °C, y con el segundo anticuerpo primario se realizará la técnica inmunohistoquímica con incubación prolongada durante toda la noche.

Es posible que aun teniendo a punto la técnica para un determinado anticuerpo no logremos resultados satisfactorios cuando lo empleemos en el segundo marcaje. No es infrecuente que haya que prolongar el tiempo de incubación del segundo anticuerpo con respecto al que necesita para una tinción simple. Si notamos una tinción débil para el segundo anticuerpo, se puede incubar 3 horas a temperatura ambiente o hacer incubación de un día para otro a 4 °C.

Por último, hay que recordar que si nuestro sistema de detección habitual es peroxidasa-DAB, la mayoría de los cromógenos para fosfatasa son solubles en alcohol, lo que nos impide deshidratar el tejido. En estos casos se debe realizar un montaje de la preparación en medio acuoso o en un medio adecuado compatible con ambos cromógenos.

En resumen, al realizar la técnica de doble inmunomarcaje se debe tener en cuenta:

- Poner a punto cada técnica por separado.
- Planificar el tiempo teniendo en cuenta que la técnica nos ocupará 2 días (o mañana y tarde).

Si el sistema de detección que empleamos habitualmente está marcado con fosfatasa alcalina, utilizaremos el primer marcaje con rojo fosfatasa (color rojo) y el segundo marcaje con azul fosfatasa (color azul). En estos casos la tinción azul del segundo anticuerpo puede no distinguirse fácilmente de la hematoxilina, por lo que es aconsejable el uso de otra tinción de contraste como el verde metilo.

Existen más variedades de cromógenos disponibles comercialmente que pueden ofrecernos un abanico más amplio de combinaciones.

USO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS DIFERENTES PARA CADA ANTÍGENO

Este método, aunque es un poco más caro, ya que obliga a disponer de dos sistemas de detección distintos, es el que mejores resultados nos permite obtener. La combinación de una tinción de peroxidasa-DAB con los cromógenos rojos de fosfatasa (Fast Red, Red New Fuschin) proporciona un excelente contraste y ambas, a su vez, contrastan bien con la hematoxilina (Fig. 3).

Existen otras combinaciones posibles, pero ésta es nuestra opción recomendada para la mayoría de los casos en que queramos hacer doble marcaje.

Se debe tener en cuenta que el tiempo para la realización de una tinción doble es mayor al habitual, por lo que en ocasiones nos veremos obligados

- Realizar un único desenmascaramiento al inicio de la técnica.
- Establecer como orden primero peroxidasa-DAB y segundo fosfatasa.
- Realizar la tinción nuclear en primer lugar.
- Probar si el orden en que hagamos los dos anticuerpos modifica el resultado.
- Prolongar la incubación del segundo anticuerpo primario si la tinción es débil.
- Montar en el medio adecuado, compatible con ambos cromógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Avivi C, Rosen O, Goldstein RS. *New chromogens for alkaline phosphatase histochemistry: Salmon and magenta phosphatase are useful for single and double-label immunohistochemistry.* J Histochem Cytochem 1994; 42: 551-554.
- Dabbs DJ, Wang X. *Immunocytochemistry on cytologic specimens of limited quantity.* Diagn Cytopathol 1998; 18: 166-169.
- Egger D, Troxler M, Bienz K. *Light and electron microscopic in situ hybridization: Non-radioactive labeling and detection, double hybridization, and combined hybridization-immunocytochemistry.* J Histochem Cytochem 1994; 42: 815-822.
- Hunyady B, Krempels K, Harta G, Mezey E. *Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining.* J Histochem Cytochem 1996; 44: 1353-1362.
- Kriegsmann J, Keyszer G, Geiler T, Gay RE, Gay S. *A new double labeling technique for combined in situ hybridization and immunohistochemical analysis.* Lab Invest 1994; 71: 911-917.
- Linn SC, Honkoop AH, Hoekman K, Van der Valk P, Pinedo HM, Giaccone G. *P53 and P-glycoprotein are often co-expressed and are associated with poor prognosis in breast cancer.* Br J Cancer 1996; 74: 63-68.
- Malik NJ, Daymon ME. *Improved double immunoenzyme labeling using alkaline phosphatase and horseradish peroxidase.* J Clin Pathol 1982; 35: 1092-1094.
- Marijjanowski MM, Teeling P, Dingemans KP, Becker AE. *Multiple labelling in electron microscopy: Its application in cardiovascular research.* Scanning Microsc Suppl 1996; 10: 261-271.
- Maçon DY, Sammons R. *Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents.* J Clin Pathol 1978; 31: 454-460.
- Mateo MS, Sáez AI, Sanche-Beato M y cols. *Expression of p21 WAF1/CIP1 in fetal and adult tissues: Simultaneous analysis with Ki67 and p53.* J Clin Pathol 1997; 50: 645-653.
- Muller-Lander U, Kriegsmann J, Gay RE, Gay S. *A one-day double-labelling technique for tissue specimens: Immunogold-silver staining for in situ hybridization combined with alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase (APAAP) immunohistochemistry for antigens.* Histochem J 1996; 28: 133-134.
- Sassano H, Date F, Imatani A, Asaki S, Nagura H. *Double immunostaining for c-erbB2 and p53 in human stomach cancer cells.* Hum Pathol 1993; 24: 584-589.
- Tornusciolo DR, Schmidt RE, Roth KA. *Simultaneous detection of TDT-mediated dUTP-biotin nick end-labelling (TUNEL)-positive cells and multiple immunohistochemical markers in single tissue sections.* Biotechniques 1995; 19: 800-805.
- Villaseca MA, Roa I, Araya JC y cols. *Double immunostaining for p53 and molecular chaperone hsp72/73 in gastric carcinoma.* Mol Pathol 1997; 50: 317-321.