



**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**  
**CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**“Estandarización y Optimización de Protocolos Inmunohistoquímicos  
Mediante la Utilización de Controles Generados con Micromatrices de  
Tejido, Elaborados para el Servicio de Anatomía Patológica del  
Hospital Dr. Gustavo Fricke”**

**Seminario de Grado  
presentado en conformidad a los requisitos para obtener  
el Grado Académico de  
“Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología  
y Citodiagnóstico”**

**Autores**

**William Campusano Andrade**

**Carla Carrasco Lucero**

**Profesor Guía Francesca Norero Pineda  
Profesor Co Guía Raúl González Álvarez**

**Septiembre 2013**

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestros padres y familiares por apoyarnos siempre, por los valores que han inculcado en nosotros, y por la oportunidad de tener una carrera de la cual estar orgullosos. Gracias por ser un excelente ejemplo de vida.

A nuestra profesora guía Francesca Norero y a nuestro profesor co-guía Raúl González, por la confianza que depositaron en nosotros, pero por sobre todo por la enorme paciencia.

Y a todos los que de alguna manera hicieron posible la realización de este trabajo.

**William Campusano A**

**Carla Carrasco L**

*Dedicado a mis padres porque me comprendieron al haber elegido mi camino. Porque con su enseñanza, amor y confianza, fortalecieron mi vida. Porque siempre existieron palabras de apoyo, que me ayudaron a seguir adelante. Porque con su esfuerzo y sacrificio, logré el triunfo que hoy les brindo. Con admiración y respeto.*

## RESUMEN

Durante años se ha tratado de objetivar el diagnóstico inmunohistoquímico, sin embargo, la carencia de recursos suficientes provoca que se deje de lado el mejor método para alcanzar una interpretación uniforme, los controles. Producto de la ausencia del uso de controles en cada procedimiento inmunohistoquímico, es que no existe un instrumento que permita validar el resultado de la técnica, no existiendo garantía acerca de la calidad y resultados de esta.

Para dar solución a esta problemática es que mediante la técnica Tissue Microarray se elaboraron una serie de micromatrices que servirán como control tanto para los marcadores útiles en cáncer de mama como para los de línea primaria, las cuales tienen la ventaja de que pueden ser utilizadas dentro de la misma placa y además dentro de la misma gota de reactivo, garantizando que ambos tejidos reciban el mismo tratamiento sin la necesidad de aumentar la cantidad de reactivos a utilizar.

Finalmente se evaluó la funcionalidad de estas micromatrices, a través de un estudio estadístico que involucró a todo el staff del laboratorio de histopatología del hospital Dr. Gustavo Fricke, el cual arrojó que existían variaciones tanto inter como intra-observador, algunas de las cuales resultaron ser claves en un posible cambio de diagnóstico (score). A partir de estos hallazgos es que se concluye que las micromatrices tisulares resultaron ser una herramienta de fácil confección, económica y eficaz cuya implementación es posible en cualquier laboratorio de anatomía patológica, además de servir como una herramienta de aprendizaje para futuras generaciones.

*Palabras Clave: Inmunohistoquímica, Tissue Microarray, Controles.*

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
1.1 Revisión bibliográfica.....	15
1.1.1 Conceptos básicos de inmunología.....	15
1.1.1.1 Anticuerpos.....	17
1.1.1.1.1 Estructura de un anticuerpo.....	18
1.1.1.1.1.1 Cadenas livianas y pesadas.....	19
1.1.1.1.1.2 Regiones de un anticuerpo : Parte variable y constante de las cadenas livianas y pesadas.....	20
1.1.1.1.1.2.1 Dominios moleculares en las cadenas ligeras y pesadas.....	21
1.1.1.1.1.3 Regiones hipervariables.....	22
1.1.1.1.1.4 Moléculas adicionales a la unidad estructural básica.....	23
1.1.1.1.1.5 Estructura espacial de las inmunoglobulinas.....	23
1.1.1.2 Variaciones estructurales en las inmunoglobulinas.....	24
1.1.1.2.1 Subclases de inmunoglobulinas.....	24
1.1.1.2.1.1 Alotipo.....	25
1.1.1.2.1.2 Idiotipo.....	25
1.1.1.3 Propiedades individuales de las inmunoglobulinas.....	26
1.1.1.3.1 Inmunoglobulina G.....	27
1.1.1.3.2 Inmunoglobulina M.....	28
1.1.1.4 Anticuerpos policlonales.....	28
1.1.1.4.1 Producción de anticuerpos policlonales.....	29
1.1.1.5 Anticuerpos monoclonales.....	31
1.1.1.5.1 Obtención de anticuerpos monoclonales.....	31
1.1.1.5.2 Producción en masa de anticuerpos monoclonales.....	32
1.1.1.5.3 Ventajas y desventajas de los anticuerpos monoclonales.....	35
1.1.1.6 Afinidad y avidéz entre los anticuerpos.....	35

1.1.1.7	Reactividad cruzada de anticuerpos.....	38
1.1.1.8	Velocidad de reacción de los anticuerpos.....	39
1.1.1.9	Manejo de los anticuerpos.....	40
1.1.2	Técnica inmunohistoquímica.....	41
1.1.2.1	Elección entre anticuerpos monoclonales y policlonales.....	41
1.1.2.2	Titulación de anticuerpos.....	42
1.1.2.3	Preparación del tejido para técnica inmunohistoquímica.....	43
1.1.2.3.1	Fijación.....	43
1.1.2.3.2	Inclusión y corte.....	47
1.1.2.3.3	Recuperación antigénica.....	47
1.1.2.3.3.1	Desenmascaramiento antigénico mediante calor.....	49
1.1.2.4	Incubación con suero normal.....	51
1.1.2.5	Bloqueo de la actividad enzimática endógena.....	51
1.1.2.6	Incubaciones.....	51
1.1.2.7	Lavados.....	52
1.1.2.8	Revelado.....	52
1.1.3	Métodos de coloración.....	53
1.1.3.1	Métodos de complejos inmunes solubles de enzima.....	53
1.1.3.2	Método de (estrept) avidina - biotina.....	54
1.1.3.3	Método del polímero conjugado.....	54
1.1.4	Controles en inmunohistoquímica.....	55
1.1.4.1	Controles de tejido negativo.....	57
1.1.4.2	Controles de tejido positivos.....	57
1.1.4.3	Controles de tejido interno.....	57
1.1.5	Microarray tisular (TMA) : Una nueva y poderosa herramienta.....	59
1.1.5.1	Definición.....	59
1.1.5.2	Historia.....	60
1.1.5.3	Tipos de microarrays tisulares.....	62
1.1.5.3.1	TMA multitumor o de prevalencia.....	62
1.1.5.3.2	TMA de progresión.....	63
1.1.5.3.3	TMA de pronóstico.....	63

1.1.5.4 Otras variantes relacionadas con los tissue microarrays convencionales	63
1.1.5.4.1 Crioarrays	64
1.1.5.4.2 TMAs que contienen líneas celulares	64
1.1.5.4.3 Tissue macroarrays	64
1.1.5.5 Ventajas e inconvenientes de los tissue microarrays	65
1.1.5.6 Validación de la técnica	67
1.1.5.6.1 Estudios de validación	67
1.1.6 Aplicación de los TMAs para la optimización de protocolos imunohistoquímicos en marcadores útiles para cáncer de mama y línea primaria	69
<b>CAPÍTULO 2 : OBJETIVOS</b>	<b>73</b>
2.1 Objetivo general	73
2.1.1 Objetivos específicos	73
<b>CAPÍTULO 3 : MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>75</b>
3.1 Kit de anticuerpos utilizados	75
3.1.1 Marcadores de utilidad en cáncer mamario	75
3.1.1.1 Receptores estrógeno - progesterona	75
3.1.1.2 HercepTest	76
3.1.2 Línea primaria	76
3.1.2.1 LCA o CD45 ( Antígeno Leucocitario Común)	77
3.1.2.2 S100	77
3.1.2.3 CK (AE1-AE3)	78
3.1.2.4 Vimentina	78
3.1.3 Implementación básica para inmunohistoquímica	78
3.1.4 Materiales para procesamiento de rutina	80
3.1.5 Materiales para la elaboración de la matriz tisular	81

3.2 Metodología.....	81
3.2.1 Tipo de estudio.....	81
3.2.2 Obtención y selección de las muestras.....	81
3.2.2.1 Muestras para línea primaria.....	82
3.2.2.2 Muestras para marcadores útiles en cáncer de mama.....	83
3.2.3 Tratamiento previo de los tacos donadores.....	84
3.2.4 Producción de una micromatriz tisular.....	85
<b>CAPÍTULO 4 : RESULTADOS.....</b>	<b>88</b>
4.1 Búsqueda de controles positivos y negativos para la línea primaria.....	88
4.1.1 Prueba N° 1.....	88
4.1.2 Prueba N° 2.....	91
4.2 Evaluación de las micromatrices finales correspondientes a la línea primaria.....	93
4.2.1 Matriz definitiva CK (AE1- AE3).....	94
4.2.2 Matriz definitiva S100.....	95
4.2.3 Matriz definitiva VIM.....	96
4.2.4 Matriz definitiva LCA.....	97
4.3 Elaboración de las matrices para los marcadores útiles en cáncer de mama.....	98
4.3.1 Resultados HercepTest.....	100
4.3.2 Resultados receptores hormonales.....	101
4.3.2.1 Progesterona.....	101
4.3.2.2 Estrógeno.....	102
4.4 Stock de micromatrices control.....	103
4.5 Evaluación de las micromatrices control.....	106
4.5.1 Evaluación de las micromatrices con alumnos de Tecnología Médica.....	110
<b>CAPITULO 5 : DISCUSIÓN.....</b>	<b>112</b>

<b>CAPÍTULO 6 : CONCLUSIÓN.....</b>	<b>118</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>130</b>

## INDICE DE TABLAS.

	Pág.
TABLA N° 4.1 <i>Composición de la primera micromatriz de prueba.....</i>	88
TABLA N° 4.2 <i>Resultados primera prueba IHQ.....</i>	89
TABLA N° 4.3 <i>Resultados segunda prueba IHQ.....</i>	91
TABLA N° 4.4 <i>Resultados de la segunda micromatriz de prueba.....</i>	92
TABLA N° 4.5 <i>Micromatrices línea primaria.....</i>	93
TABLA N° 4.6 <i>Resultados estudio IHQ previo.....</i>	98
TABLA N° 4.7 <i>Casos totales IHQ 2007-2012.....</i>	104
TABLA N° 4.8 <i>Casos relevantes.....</i>	109

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>FIGURA 3.1</b> <i>Elaboración y corte de un bloque TMA</i> .....	87
<b>FIGURA 4.1</b> <i>Esquema que señala la distribución de los tejidos al interior de la matriz</i> .....	89
<b>FIGURA 4.2</b> <i>Primera matriz constituida por doce tejidos diferentes y su posterior tinción IHQ en placa</i> .....	90
<b>FIGURA 4.3</b> <i>Miometrio</i> .....	94
<b>FIGURA 4.4</b> <i>Próstata</i> .....	94
<b>FIGURA 4.5</b> <i>Miometrio</i> .....	95
<b>FIGURA 4.6</b> <i>Melanoma maligno</i> .....	95
<b>FIGURA 4.7</b> <i>Coriocarcinoma</i> .....	96
<b>FIGURA 4.8</b> <i>Melanoma maligno nodular</i> .....	96
<b>FIGURA 4.9</b> <i>Osteosarcoma mamario</i> .....	97
<b>FIGURA 4.10</b> <i>Amígdala palatina</i> .....	97
<b>FIGURA 4.11</b> <i>Distribución de intensidades</i> .....	99
<b>FIGURA 4.12</b> <i>Resultados marcación HercepTest</i> .....	100
<b>FIGURA 4.13</b> <i>Resultados receptor progesterona</i> .....	101
<b>FIGURA 4.14</b> <i>Resultados receptor estrógeno</i> .....	102
<b>FIGURA 4.15</b> <i>Placa que contiene una micromatriz control para el marcador CK (AE1- AE3)</i> .....	103
<b>FIGURA 4.16</b> <i>Número de casos problema</i> .....	107
<b>FIGURA 4.17</b> <i>Gráfico profesionales</i> .....	108
<b>FIGURA 4.18</b> <i>Intensidades</i> .....	109
<b>FIGURA 4.19</b> <i>Resultados relevantes en probable cambio de tratamiento</i> .....	110
<b>FIGURA 4.20</b> <i>Gráfico alumnos</i> .....	111

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN.

Los servicios de anatomía patológica conforman el pilar fundamental en la detección, determinación, y clasificación de las distintas patologías que se presentan en los establecimientos de salud públicos y privados. Esto comúnmente se realiza a partir de técnicas histopatológicas y citológicas. Sin embargo, en algunas ocasiones el diagnóstico se torna más difícil, principalmente frente a patologías de tipo neoplásico, esto debido a que "se pierde la diferenciación celular" (Jaramillo, 1991), por lo que hay que recurrir a procedimientos especiales, los cuales en la actualidad son esenciales en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de afecciones que representan una mayor complejidad en su estudio y se denominan técnicas inmunohistoquímicas. "Estas constituyen una potente herramienta que permite la detección de moléculas proteicas en las células o en su superficie a través de los microscopios tradicionales" (Roche Farma, 2013).

Dentro de sus principales ventajas nos encontramos con que "juega un rol fundamental en la determinación precisa de los tipos celulares que escapan de la detección morfológica pura "(Revista Chilena de Cirugía, 2007), contribuye a la determinación de metástasis de origen desconocido, tipificación de linfomas y es clave en diagnóstico de cáncer mamario, además de cumplir un papel esencial en la selección del tratamiento más adecuado para cada paciente, por ende constituye una herramienta multifuncional clave para un laboratorio de histopatología.

Pese a la gran cantidad de ventajas que poseen las técnicas IHQ y de lo esencial que se ha vuelto su aplicación rutinaria en la actualidad, su implementación cuenta con algunas limitantes, la principal es que los reactivos que se requieren para su aplicación

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

son caros, esto genera que la variedad de anticuerpos que son utilizados en laboratorios pertenecientes a hospitales estatales esté limitada a sólo a aquellos que sean requeridos por patologías que representen una prioridad (como es el caso de los que se utilizan para el diagnóstico de cáncer mamario), puesto que la compra de un panel de anticuerpos de mayor variedad junto a sus respectivos reactivos (kits), que cubran el diagnóstico de todas las patologías a las cuales se le podrían practicar estas técnicas representaría un gasto que no es posible de solventar por un laboratorio de estas características. A todo esto, también se le suma que el número de muestras que pueden ser analizadas con cada uno de los kits, está muy por debajo de la demanda de esta herramienta, la cual ha ido en aumento en los últimos años. Todo esto ha dificultado de manera radical su uso masivo y regular en los centros de atención.

Teniendo en cuenta esta situación es que se busca reducir la cantidad de reactivos empleados tras cada procedimiento IHQ al mínimo, con el propósito de cubrir el mayor número de estudios posibles. En general la mayoría de los procedimientos IHQ son realizados en un solo corte que contiene la sección de un espécimen en particular, para ahorrar tiempo y dinero. Es por esta razón que actualmente no se utilizan controles paralelos al tejido en estudio.

El hecho de no utilizar controles internos provoca finalmente que la objetividad del protocolo se vea afectada, ya que el empleo de éstos permite establecer si los protocolos de tinción se han seguido de manera correcta, si han existido variaciones día a día o de trabajador en trabajador y si los reactivos a utilizar se encuentran en condiciones adecuadas, en pocas palabras sustentan la validez de cada técnica. Además, hay que considerar que todo procedimiento diseñado para su uso en diagnóstico in vitro debe ser supervisado por controles de reactivo y tejido. "Los controles de reactivo y de tejido son necesarios para la validación de los resultados de la coloración IHQ sin su uso, la interpretación de la coloración sería casual y los resultados de dudoso valor" (Boenisch, 2002).

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Frente a la relevancia del proceso de estandarización de los procedimientos IHQ que se llevan a cabo en el laboratorio de Anatomía Patológica es que este estudio se encuentra enfocado en establecer y detallar el método a través del cual se pueda dar solución a la problemática presentada anteriormente. Para ello se utilizará como base el método diseñado por Hector Battifora patólogo de City of Hope en Duarte (CA, USA), denominado actualmente como Tissue Microarray o Micromatrices de Tejido, adaptándolo a las necesidades de cada protocolo IHQ utilizado.

La principal ventaja de la utilización de esta técnica es la reducción significativa de tiempo y coste para su realización. "Es posible efectuar un estudio de grandes series de pacientes en un tiempo escaso". (Congreso Hispano Virtual Americano de Anatomía Patológica, 2002) Ello se halla motivado por una rápida velocidad en el procesamiento de las muestras, la posibilidad de análisis simultáneo y estandarizado de una amplia población de tumores o múltiples muestras y la existencia de un área de tamaño suficiente para analizar, además de facilitar la comparación de la ubicación de la tinción en las células (membrana, citoplasma, núcleo), pues, este método permite montar un gran número de tejidos normales o tumorales en una membrana de revestimiento la cual es embebida en un único bloque de parafina.

Es esta particular característica la que constituirá la base para dar inicio a la búsqueda de los tejidos más adecuados que serán requeridos para conformar las matrices tisulares que constituyen el centro de esta investigación.

## **1.1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

### **1.1.1.- Conceptos básicos de inmunología.**

Para comprender el funcionamiento de las técnicas inmunohistoquímicas es necesario manejar algunos conceptos básicos de inmunología, pues representan la base de cada uno de estos métodos.

Nuestro sistema inmune responde, en forma habitual, a un agente extraño (antígeno) mediante la producción de anticuerpos, que de forma selectiva se unen a una parte en especial del antígeno. De la misma forma, y según la teoría de la vigilancia inmunológica, las células T citotóxicas recorren el cuerpo humano dentro del sistema circulatorio a través del tejido mesenquimatoso, en busca de fragmentos peptídicos asociados con antígenos de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad: Es decir, detectan células con potencial maligno. "Por mecanismos aún no dilucidados en su totalidad, las células T destruyen las células afectadas, que han sido expuestas" (Elias, 1990).

Esta odisea celular, fue lo que dio la idea a Coons en 1941, cuando describió una técnica de inmunofluorescencia para la detección de antígenos celulares en cortes de tejido y 25 años después Nakane, Pierce y Avrameus, revolucionaron la técnica hasta hacerla práctica, útil, de fácil realización y aplicabilidad clínica, llegando a la inmunohistoquímica (en adelante IHQ) como es hoy.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

"En las últimas décadas la utilización de métodos IHQ ha sido progresivamente creciente y se ha consolidado como tecnología esencial en el diagnóstico histopatológico de rutina" (Ceccotti & Sforza, 2007). En general y muy especialmente en lo que respecta a la patología oncológica, son cada vez más los casos que requieren el apoyo de las técnicas IHQ para establecer su clasificación y realizar el correspondiente diagnóstico diferencial.

Vilches et al (2010):

Señalan que el advenimiento de la inmunohistoquímica ha facilitado en gran medida la realización de diagnósticos certeros. Los avances en los métodos y procesos inmunohistoquímicos, así como la introducción de nuevos marcadores, han permitido resolver problemas diagnósticos específicos.

Es importante considerar que la IHQ tiene una mayor complejidad que los procedimientos de rutina que se emplean en el laboratorio clásico de anatomía patológica, por lo requiere de una metodología diferente a la del mismo. Por ello es importante conocer en profundidad sus ventajas y limitaciones.

En base a esto es que se vuelve necesario contar con los conocimientos básicos de sus principales reactivos, los cuales se denominan anticuerpos y/o inmunoglobulinas, puesto a que "la elección de un panel de anticuerpos inapropiado o excesivamente limitado puede llevar a conclusiones diagnósticas insuficientes o erróneas" (Ceccotti & Sforza, 2007).

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

### 1.1.1.1.- *Anticuerpos.*

Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas, Ig.) son glicoproteínas variables del tipo gamma globulina producidas por los linfocitos B en respuesta a la presencia de un antígeno. Estos forman el componente humoral del sistema inmunitario adaptativo, que se completa con el componente celular formado por los linfocitos T.

Según Litman et al (1993):

Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos.

"Las moléculas a las que se unen los anticuerpos son, por definición, antígenos" (Parham, 2006). Un antígeno es una sustancia ajena al cuerpo que el sistema inmunológico reconoce como una amenaza. Cuando el cuerpo detecta antígenos, se induce una respuesta inmunitaria con la formación de anticuerpos como forma de defensa. Por lo que las inmunoglobulinas constituyen el receptor específico para el antígeno presente en la membrana de los linfocitos B y se secretan tras la activación celular en forma de moléculas circulantes.

Todos los tipos de macromoléculas biológicas funcionan como antígenos, pero las proteínas y los hidratos de carbono son los más comunes." La unión de los anticuerpos a un patógeno puede inactivar al patógeno y también tornarlo susceptible a la destrucción por otros componentes del sistema inmunitario" (Parham, 2006).

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Parham (2006) indica:

Cada uno de los anticuerpos es específico, lo que significa que estos pueden unirse a un solo antígeno o a un número muy pequeño de antígenos diferentes. Por esa razón la inmunidad contra el virus del sarampión no brinda protección contra el virus de gripe, ni la inmunidad contra la gripe protege contra el sarampión. El sistema inmunitario de un individuo puede producir anticuerpos contra un inmenso número de sustancias diferentes, tantos como la gran cantidad de antígenos extraños y diversos a los que una persona probablemente se verá expuesta durante toda su vida. Por consiguiente, en conjunto los anticuerpos tienen una gran diversidad de especificidades de unión al antígeno; el número total de anticuerpos específicos diferentes que puede producir un individuo se conoce como repertorio de anticuerpos.

### *1.1.1.1.1.- Estructura de un anticuerpo.*

Como se mencionó con anterioridad la función de una molécula de anticuerpo en la defensa del huésped es reconocer a su antígeno correspondiente, unirse a él y conducirlo hacia otros componentes del sistema inmunitario. Estos luego destruyen el antígeno o lo eliminan del cuerpo. La unión al antígeno y la interacción con otras células y moléculas del sistema inmunitario están a cargo de partes diferentes de la molécula de anticuerpo. Una de ellas es muy variable, en el sentido de que su secuencia de aminoácidos difiere considerablemente de un anticuerpo a otro. El resto de la molécula es mucho menos variable en la secuencia de los aminoácidos. Esta parte constante del anticuerpo interactúa con otros componentes del sistema inmunitario.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas. Dos son de mayor tamaño y se denominan cadenas pesadas, y dos, de menor tamaño se denominan cadenas ligeras. Las cadenas ligeras y pesadas se agrupan de tal manera que existe una proximidad espacial entre los cuatro extremos amínicos, por una parte, y los extremos carboxílicos por otra. ([www.inmunologiaenlinea.es](http://www.inmunologiaenlinea.es)) Se ensamblan en una estructura parecida a la letra Y. (Ver anexo N° 1)

Según Parham (2006):

Cada brazo de la Y está formado por una cadena liviana completa apareada con el extremo amino (extremo N) de una cadena pesada, unidas en forma covalente por un puente disulfuro. El tallo de la Y consiste en los extremos carboxilo (extremo C) apareados de las dos cadenas pesadas. Las dos cadenas pesadas también están unidas entre sí por puentes disulfuro.

### *1.1.1.1.1.- Cadenas Livianas y Pesadas.*

Existen dos tipos diferentes de cadenas ligeras denominadas kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ) y hay cinco tipos de cadenas pesadas en mamíferos que se denominan: Alfa ( $\alpha$ ), Delta ( $\delta$ ), Epsilon ( $\epsilon$ ), Gamma ( $\gamma$ ) y Mu ( $\mu$ ), que dan lugar a las cinco clases de inmunoglobulinas existentes IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM respectivamente, considerando que son las cadenas pesadas las que determinan la clase de anticuerpo o isotipo, término que será definido más adelante.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Janeway et al (2001) indican:

Que las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño y composición:  $\alpha$  y  $\gamma$  contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que  $\mu$  y  $\epsilon$  poseen aproximadamente 550 en contraste con esto la longitud aproximada de la cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos, de ahí el origen de sus respectivos nombres.

Las cadenas pesadas además están unidas entre sí por puentes disulfuro intercatenarios, que pueden ser distintos en número dependiendo del tipo de inmunoglobulina. Esta zona, donde se encuentran los puentes intercatenarios, es muy flexible y constituye lo que se denomina zona bisagra, que es por donde se deforman estas moléculas cuando se unen al antígeno. "Esta confiere una gran flexibilidad a la molécula y le permite unirse a distintos tipos de antígenos. La región bisagra puede contener desde 10 a más de 60 aminoácidos" (Álvarez, 2004).

*1.1.1.1.1.2.- Regiones de un anticuerpo: Parte variable y constante de las cadenas ligeras y pesadas.*

De acuerdo a (<http://www.inmunologiaenlinea.es/>) las cadenas ligeras poseen dos partes, una correspondiente al extremo carboxílico que es constante ( $C_L$ ) y otra que ubicada al extremo amínico, que es muy variable ( $V_L$ ). También las cadenas pesadas poseen una parte variable ( $V_H$ ) y otra constante ( $CH$ ).

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Ingraham & Ingraham (1998) señalan:

Que las cadenas polipeptídicas de anticuerpos diferentes varían mucho en su secuencia de aminoácidos y las diferencias de secuencia se concentran en la región del extremo amino de cada tipo de cadena; esta región se conoce como región variable (Fab) o región V, que contienen las secuencias de aminoácidos específicas y únicas que se originan por recombinaciones de DNA durante la diferenciación de los linfocitos.

Esta variabilidad es la razón de la gran diversidad de especificidades de unión al antígeno que existe entre los anticuerpos, porque las regiones V apareadas de una cadena pesada y una cadena ligera forman el sitio de unión al antígeno. "Por consiguiente cada molécula en forma de Y tiene dos sitios de unión al antígeno idénticos, uno al final de cada brazo" (Parham, 2006).

Las partes restantes de las cadenas livianas y pesadas tienen una variación mucho menor de secuencia de aminoácidos entre anticuerpos diferentes por ende se conocen como regiones constantes o regiones C (Fc). "El fragmento Fc es quien define la actividad biológica, la clase y subclase de cadenas pesadas" (<http://www.inmunologiaenlinea.es>)

1.1.1.1.1.2.1.- Dominios *moleculares en las cadenas ligeras y pesadas*.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Los dominios de son esenciales para el correcto plegamiento y funcionalidad de la proteína.

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras poseen grupos de aminoácidos unidos por puentes disulfuro intracatenarios. Estos segmentos repetidos en las cadenas L y H se conocen como dominios. Los dominios de la parte constante de las cadenas pesadas presentan una gran homología secuencial no sólo entre ellos, sino también con la región constante de la cadena L." De forma similar, los únicos segmentos variables en las cadenas L y H presentan cierta homología entre ellos y en menor grado a los de la región constante". ([www.inmunologiaenlinea.es](http://www.inmunologiaenlinea.es))

Álvarez (2004) explica:

Que la región V de la cadena pesada consta de un dominio de inmunoglobulina (Vh), y la región C de la cadena pesada consta de tres o cuatro dominios (CH1, CH2, CH3, CH4). La región V de la cadena ligera tiene un dominio de inmunoglobulina (VL) y la región C de la cadena ligera tiene un único dominio (CL).

Los dominios V son los responsables de la unión con el antígeno y los dominios C, con excepción del CH1, constituyen el fragmento Fc que, como ya se ha indicado, determina las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas Es entre los dominios CH1 y CH2 donde se establece la zona bisagra.

### 1.1.1.1.1.3.- Regiones Hipervariables.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Según García. F (1997):

Las zonas variables, tanto de la cadena L como H, poseen a su vez unas regiones de mayor grado de variabilidad. Son tres pequeños segmentos muy variables, por lo que se les conoce como regiones hipervariables, cuya importancia radica en que conforman el centro activo de las inmunoglobulinas, que es por donde se produce el reconocimiento y unión al antígeno. Cada una de estas regiones hipervariables se compone de 17 a 20 aminoácidos, de tal manera que pequeños cambios suponen una enorme fuente de variabilidad de posibilidades de unión al antígeno sin cambiar el resto de la molécula.

### *1.1.1.1.1.4.- Moléculas adicionales a la unidad estructural básica.*

En las inmunoglobulinas aparecen, además de las cuatro cadenas polipeptídicas básicas, un componente glucídico (que representa el 2-14 % del peso total de la molécula) y en algunas clases de inmunoglobulinas, glicoproteínas adicionales conocidas como cadena J y pieza de secreción. La cadena J es una glicoproteína con un 12 % de azúcares y un peso molecular de 15 kD que une, mediante puentes disulfuro, extremos Fc en la IgA e IgM. "La pieza de secreción es una glicoproteína de 58 kD de peso molecular que sintetizan las células epiteliales de las mucosas y glándulas exocrinas" (inmunologiaenlinea.es).

### *1.1.1.1.1.5.- Estructura espacial de las inmunoglobulinas.*

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Cada uno de los dominios de las cadenas está constituido a modo de “cilindros” en los que se encuentran plegados en forma de sandwich dos grupos de cadenas proteicas, una con tres cadenas polipeptídicas y la otra con cuatro, que presentan estructuras secundarias es de hoja plegada b. Estas dos capas proteicas están alineadas paralelamente rodeando un espacio interior en el que predomina la presencia de aminoácidos hidrófobos. La unión de esas dos capas se efectúa por puentes disulfuro.

En [www.inmunologiaenlinea.es](http://www.inmunologiaenlinea.es), se plantea que en las zonas constantes, las capas de cuatro segmentos están en el exterior de la molécula y las de tres en el interior, mientras que en las variables es al contrario; por lo demás, el modelo global de plegado guarda gran semejanza entre los dominios variables y constantes. Sin embargo, las regiones hipervariables constituyen tres bucles adicionales que no se someten al plegamiento del resto del dominio.

### *1.1.1.2.- Variaciones estructurales en las inmunoglobulinas.*

#### *1.1.1.2.1- Subclases de inmunoglobulinas*

Como se mencionó anteriormente las inmunoglobulinas se clasifican en cinco tipos IgG, IgA IgM IgG IgD e IgE de acuerdo al tipo de cadena pesada que estas posean.

Además de esta clasificación se sabe que no todas las inmunoglobulinas de una misma clase tienen la misma estructura, sino que dentro de éstas se pueden establecer subclases basándose en la secuencia aminoacídica de la región constante de las

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

cadenas pesadas (H) y el diverso número de los puentes disulfuro intercatenarios establecidos entre éstas. Es así como la IgG se divide en cuatro subclases (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y la IgA e IgM en dos (IgA e IgG2; IgM e IgM2) respectivamente.

Las regiones constantes de las cadenas pesadas de estas diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas se conocen como variantes isotípicas y son las mismas en todos los individuos normales de la misma especie.

"Al conjunto de clases y subclases de una inmunoglobulina se le conoce como isotipo" (Rojas, 2006).

### 1.1.1.2.1.1.- *Alotipo.*

"Los alotipos son pequeños cambios que puede tener un individuo normal en el ordenamiento de un aminoácido particular, en las diferentes cadenas de sus inmunoglobulinas" (García. F, 1997).

### 1.1.1.2.1.2 .- *Idiotipo.*

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Los idiotipos corresponden a la estructura conformacional de los sitios de combinación de los anticuerpos y en ellos participan las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en su porción amino-terminal.

Rojas (2006) indica:

Que dentro de la estructura anticuerpo, el idiotipo constituye la porción más extraña para el individuo que lo produce y por esto resulta inmunogénico; cualquier individuo puede responder inmunológicamente contra los idiotipos de sus propios anticuerpos inducidos por antígenos exógenos.

### *1.1.1.3.- Propiedades individuales de las inmunoglobulinas.*

En relación a sus funciones generales nos encontramos con que participan en la aglutinación de partículas, activación del complemento por vía clásica, neutralización de antígenos, opsonización, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), actúan como receptores en células B y además participan en reacciones de hipersensibilidad.

De las cinco clases de inmunoglobulinas, IgM e IgM serán consideradas con mayor detalle, debido a que son los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia en inmunohistoquímica.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

### 1.1.1.3.1.- Inmunoglobulina G.

"Esta inmunoglobulina es producida por células plasmáticas del bazo, médula ósea y nódulos linfáticos. Es el anticuerpo de mayor concentración sanguínea" (Gómez et al., 2007).

"Tiene un peso molecular aproximado de 150 kDa y una concentración elevada en el suero de (10 mg/ml), siendo escasa en las secreciones. Su vida media es de aproximadamente 20 días" (Álvarez, 2004). Junto a IgD son las de menor tamaño, lo cual les permite atravesar el endotelio vascular para acceder a focos inflamatorios.

De acuerdo a Montoya (2008):

Constituye el 70 a 75% de todos los anticuerpos circulantes y predomina en la segunda respuesta de anticuerpos, es decir esta es la respuesta que sigue a contactos posteriores con un antígeno determinado, corresponde a la segunda línea de defensa.

"Participan por medio de los dominios CH2 en la activación del complemento por vía clásica, requiriéndose al menos dos moléculas de IgG para activar la ruta" (Gómez et al., 2007).

"En relación a su estructura esta tiene la fórmula general de  $\gamma_2\kappa_2$  o  $\gamma_2\lambda_2$ , lo que denota que una molécula de IgG está compuesta por dos cadenas livianas de tipo kappa o de tipo lambda" (Boenisch, 2002).

La inmunoglobulina G es el anticuerpo más abundante en el huésped hiperinmunizado, en el animal recién inmunizado IgM es el primer anticuerpo humoral detectable.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

### 1.1.1.3.2.- *Inmunoglobulina M.*

"Es el primer tipo de anticuerpo que aparece en el suero tras la exposición a un antígeno" (Berg et al., 2008). "Representa el 10% de las inmunoglobulinas totales" (Montoya, 2008).

Muñoz & García (1998):

Plantean que se produce inicialmente en la respuesta inmune primaria contra ciertos antígenos, como los grupos sanguíneos y bacterias gram negativas; es la Ig que activa al complemento más eficientemente y forma parte de las proteínas membranales de los linfocitos B.

Su estructura está constituida por un pentámero que consiste de cinco subunidades de aproximadamente 180 kD cada una. La fórmula general se puede expresar como  $(\mu_2 \kappa_2)$  o  $(\mu_2 \lambda_2)$ . Cada subunidad está unida por medio de un péptido rico en sulfidril, la cadena J (15kD) y consiste de dos cadenas pesadas ( $\mu$ ) y dos cadenas livianas tipo kappa o lambda. Las cadenas J contribuyen en la integridad y estabilidad del pentámero.

### 1.1.1.4.- *Anticuerpos policlonales.*

La formación de anticuerpos tiene lugar en las células procedentes de la médula ósea, llamadas linfocitos, que en presencia de un antígeno se diferencian hacia células

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

formadoras de anticuerpos." Cada linfocito origina una población celular o un clon, en la que cada célula es genéticamente idéntica a las demás produciendo un mismo anticuerpo" (Coll, 1993). En otras palabras, cuando se inocula un antígeno (o penetra un patógeno) se produce una respuesta de anticuerpos frente a cada uno de los determinantes antigénicos o epitopes del antígeno. Todos los anticuerpos se producen de forma simultánea, todos reaccionan con el antígeno, pero solo con un determinante concreto. Esto es lo que se produce en la respuesta inmune normal, y a esta mezcla de anticuerpos es a la que se denomina suero Policlonal, porque procede de varios linfocitos B que se expandieron (tras reconocer al antígeno) produciendo cada uno un clon celular.

### *1.1.1.4.1.- Producción de anticuerpos policlonales.*

A partir de un suero policlonal se puede obtener un suero específico para el antígeno mediante aislamiento y purificación. Si bien los anticuerpos obtenidos, son todos específicos para el antígeno, variarán en su afinidad para el mismo al proceder de distintos clones. La Técnica básicamente consiste en efectuar una cromatografía de afinidad en columna.

El animal preferido para la producción artificial de este tipo de anticuerpos es el conejo debido a su fácil mantenimiento, sin embargo, también existen otros como la cabra, cerdo, oveja caballo entre otros. (Ver anexo N° 2)

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Una ventaja adicional en su uso es que la presencia de anticuerpos humanos contra proteínas del conejo es mucho más rara que contra proteínas de otros rumiantes, tales como la cabra.

Boenisch (2002) señala:

Que además los anticuerpos de conejo precipitan las proteínas humanas con un rango más amplio de exceso de antígeno o anticuerpo y pools de anticuerpos hechos a partir de muchos conejos son menos propensos a que resulten con variaciones de partida a partida que los pools hechos con sólo algunos animales más grandes.

La obtención de los anticuerpos policlonales se realiza recolectando la sangre del animal utilizado para su producción. En el caso de los conejos se extrae de la oreja, por otra parte, en el caso de animales más grandes se extrae de la vena yugular o del corazón, incluso en algunos casos se requiere sacrificar al animal. Posteriormente cuando ya se han retirado las células sanguíneas, se podrán obtener estos anticuerpos policlonales, en forma de antisuero estabilizado o como fracciones de inmunoglobulinas con diferentes grados de pureza.

Uno de los principales problemas que plantea el uso de anticuerpos policlonales es su gran variabilidad, así como las limitaciones en la cantidad de suero que puede obtenerse.

Por otra parte, Álvarez (2004):

Destaca que en el antisuero se encuentran anticuerpos de distintas clases y subclases con diferencias en sus afinidades por el antígeno y en sus actividades biológicas, lo que hace difícil la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Sin embargo, esto no implica que no puedan ser utilizados con éxito incluso en la actualidad. En cuanto a sus aplicaciones inmunohistoquímicas podemos mencionar que estos son útiles en la detección de proteínas que tienen menores niveles de expresión, debido a que mientras más anticuerpos puedan unirse a una única molécula de proteína, mayor será la señal de detección.

### *1.1.1.5.- Anticuerpos monoclonales.*

Si la inoculación o inmunización se realizásemos con un antígeno que contuviese un único epítipo, solo se activaría un clon celular y se produciría un único anticuerpo. A un suero que tuviese estas características se le denomina suero monoclonal. Esta situación, no se produce en condiciones normales, pero en determinadas condiciones patológicas aparecen neoplasias de células B y de los plasmocitos derivados de ellas (Mieloma múltiple). Como son células productoras de anticuerpos, éstos se acumulan en la sangre en grandes cantidades. Como ocurre en todos los procesos tumorales el origen está en una célula que se maligniza y se multiplica de forma autónoma e independiente de los sistemas de regulación del organismo, lo que es lo mismo que decir que todas las células del mieloma proceden de una misma célula y, por tanto, producen el mismo anticuerpo. Aunque existen mielomas de cada una de las cinco clases de inmunoglobulinas los más frecuentes producen los isotipos IgA e IgG.

#### *1.1.1.5.1.- Obtención de anticuerpos monoclonales.*

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

En 1975, George Kohler y César Milstein, citado por Valpuesta (2012) demostraron que la hibridación (fusión) de los linfocitos inmunes de ratón con células de mieloma originaban células híbridas las cuales podían secretar inmunoglobulinas homogéneas de especificidad predefinida, los anticuerpos monoclonales.

Estas células fusionadas híbridas, pueden multiplicarse rápida e indefinidamente, y además pueden producir gran cantidad de anticuerpos.

### *1.1.1.5.2. Producción en masa de anticuerpos monoclonales.*

Para producir anticuerpos monoclonales primero se deben extraer células B del bazo de un animal que ha sido expuesto al antígeno. Estas células B son fusionadas en presencia de PEG (polietilenglicol) con células tumorales de mieloma múltiple. Esto es necesario porque en cultivo la vida media de los linfocitos secretores de anticuerpo se limita a unas pocas semanas. Al fusionar estas células con las tumorales se obtienen híbridos celulares, conocidos como hibridomas, que son potencialmente inmortales. (Ver anexo N° 3)

Dado que la fusión es un evento completamente al azar, la mezcla de células obtenidas luego de la misma estará formada por esplenocitos, células de mieloma, esplenocitos fusionados entre sí, células de mieloma fusionadas entre sí y además por los hibridomas linfocito B-célula de mieloma. En cultivo, los esplenocitos no fusionados mueren con el tiempo por ser células normales.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Montaño & Romano (1995) plantean:

Que además las mielomas al ser células tumorales pueden vivir indefinidamente y como se replican con mayor rapidez que los hibridomas, crecerían en forma predominante, "ahogando" al resto de las células. De lo anterior se desprende la necesidad de disponer de un mecanismo de selección que permita solamente el crecimiento de los hibridomas, eliminando a las células mielomas.

Esto se obtiene con el llamado medio HAT y el fundamento en que se basa es el siguiente: "Las células eucariotas disponen de dos vías para la síntesis del ADN. Una es la llamada "vía principal o de novo" y la otra es la "vía de rescate", en la cual se requiere la enzima *hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa* (HGPRT)" (Harlow y Lane, 1988).

Hudson & Hay (1989) explican:

Que la clave de la selección está en que las células de mieloma que se utilizan para la fusión son deficientes en la enzima HGPRT, es decir, que sintetizan su ADN únicamente por la vía principal. Esta vía principal puede ser bloqueada por la adición de la droga aminopterina. De manera que, si al medio de cultivo en el que crece el producto de fusión se añade aminopterina, las células mielomas no fusionadas o fusionadas entre sí morirán, ya que serán incapaces de sintetizar ADN.

Según Montaño & Romano (1995):

Si se consideran ahora las células híbridas, éstas tienen la capacidad de crecimiento tumoral heredada de las células mielomas, pero también tienen el gen que codifica la enzima HGPRT, heredado de los linfocitos normales, pudiendo sin-

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

tetizar ADN por la vía de rescate. De esta forma, en presencia de Hipoxantina-Aminopterina-Timidina (HAT) las únicas células con capacidad de crecimiento, "seleccionadas" gracias a un fenómeno de complementación génica, son las híbridas.

Existe aún otro evento de selección, el cual está destinado a identificar y aislar, del total de híbridos producidos, a los hibridomas productores de los anticuerpos de interés. La identificación se logra con un método apropiado para la evaluación de los sobrenadantes de cultivo y el aislamiento se realiza mediante el clonamiento. Una vez seleccionado el clon de células híbridas deseado, el próximo paso es la producción de grandes cantidades de anticuerpo monoclonal. Para el crecimiento del clon seleccionado de células híbridas puede utilizarse la cavidad peritoneal de ratones, preferentemente de la misma cepa utilizada para el paso inicial de inmunización. Primero, se inyecta en la cavidad peritoneal un irritante orgánico, para producir una peritonitis química.

Luego, se inyectan las células híbridas de la línea seleccionada dentro de la cavidad peritoneal. En el transcurso de los días se desarrolla un tumor conocido como hibridoma. Este tumor produce grandes cantidades de anticuerpos monoclonales que pueden obtenerse por aspiración del líquido ascítico a partir de la cavidad peritoneal del animal (ratón).

Koneman & Allen (2008) mencionan:

Que un ratón que tiene el tumor puede sobrevivir entre 4 y 6 semanas, durante las cuales se pueden recolectar grandes cantidades de anticuerpos. Los hibridomas también pueden crecer en cultivo de tejido a partir de los cuales se producen anticuerpos altamente purificados, sin la potencial contaminación del suero, de la interferencia no específica de proteínas de la ascitis o de la reactividad cruzada de anticuerpos de histocompatibilidad derivados de los tejidos del ratón.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

### *1.1.1.5.3.- Ventajas y desventajas de los anticuerpos monoclonales.*

La ventaja principal de los anticuerpos monoclonales como reactivos es que proporcionan un único material estándar para todos los laboratorios en todo el mundo, en un aporte ilimitado si se mantiene la inmortalidad y la pureza de la línea celular; por otra parte, los antisueros obtenidos de animales diferentes pueden ser tan distintos entre sí como la tiza y el queso.

"El enfoque monoclonal de nuevo muestra su excelencia en relación con las estrategias convencionales para la producción de anticuerpos específicos contra componentes individuales en una mezcla compleja de antígenos" (Roitt, 2008). "Otras ventajas de los anticuerpos monoclonales, es que no se contaminan por otros anticuerpos indeseables y que pueden obtenerse en cantidades muy grandes" (Mollison, 1987).

En inmunohistoquímica es importante considerar ciertas desventajas presentes en los anticuerpos monoclonales al momento de seleccionar los clones útiles. Si comparamos los anticuerpos monoclonales en relación a los policlonales su principal ventaja es la especificidad, no obstante estos dependen más de factores ambientales como el pH y sustancia disuelta para su funcionamiento óptimo. Otra de las desventajas de los anticuerpos monoclonales que se pueden citar, son el alto costo de su producción y el largo tiempo que se requiere para seleccionar el anticuerpo específico que se necesita.

### *1.1.1.6.- Afinidad y avidéz entre los anticuerpos.*

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

La afinidad es la medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico y uno de los sitios de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo.

Arnaiz et al. (1995) plantea qué:

Puede entenderse como constante de afinidad ( $K_d$ ) entre un antígeno y un anticuerpo: hace referencia a la naturaleza inmunoquímica de estas interacciones (1. Puentes de hidrógeno, 2. Interacciones electrostáticas, 3. Fuerzas de Van der Waals y 4. Interacciones hidrofóbicas); una alta afinidad supone un mayor acoplamiento antígeno/anticuerpo. Se define en términos termodinámicos.

Es decir, "se requiere más energía para separar un complejo formado entre anticuerpos de alta afinidad y antígeno, que para separar otro constituido con un anticuerpo de baja afinidad "(Golub, 1986).

La afinidad intrínseca de un anticuerpo reside en la región HV y es determinada por la misma secuencia de aminoácidos que determina la especificidad.

Boenisch (2002) afirma que:

En inmunohistoquímica la afinidad funcional de un anticuerpo o antisero se puede definir vagamente por el tiempo que requiera para alcanzar el equilibrio con el antígeno tisular. Si alícuotas iguales de dos anticuerpos o antiseros de punto de dilución óptima idéntico son incubados por periodos de tiempo crecientes con el antígeno del tejido, el anticuerpo que alcance primero el nivel de la máxima intensidad de coloración es el de la afinidad funcional más alta.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Por otra parte, la avidéz hace referencia a la estabilidad de los complejos formados por anticuerpos y antígenos multivalentes. La avidéz está en gran medida determinada por la afinidad de la interacción inicial antígeno/ anticuerpo, pero depende además de otros factores que afectan la estabilidad del complejo antígeno/anticuerpo.

Arnaiz et al (1995) plantean que:

Entre estos factores se encuentran las valencias del antígeno y anticuerpo, sus cargas netas, la diversidad de los anticuerpos producidos en respuesta al antígeno y la flexibilidad de la molécula en su región flexible. No se define en términos termodinámicos.

Con frecuencia el término avidéz se utiliza también para describir la suma total de las afinidades intrínsecas encontradas en una población de anticuerpos policlonales.

Dado que las reacciones antígeno anticuerpo son reversibles, los complejos inmunes simples que se forman en el tejido pueden disociarse durante los ciclos de lavado usados en IHQ. La facilidad y grado de disociación varían de anticuerpo a anticuerpo y bajas concentraciones de sales, así como bajas temperaturas reducirán la posibilidad de una coloración débil, debido a una disociación de un complejo inmune ya formado. "Por esto se prefieren anticuerpos de alta afinidad, con menor chance de que ocurra la disociación durante el lavado, comparándolos con anticuerpos de baja afinidad" (Boenisch, 2002)

Como se mencionó en primera instancia una población de anticuerpos policlonales contiene un espectro relativamente continuo de afinidades con varios epítopes de un antígeno dado. Es por esta razón que luego de la incubación con anticuerpos primarios de este tipo, no es probable que el lavado excesivo resulte en una pérdida apreciable de la coloración. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales son de afinidad uniforme y, si la afinidad es baja, la pérdida de coloración seguramente se deba

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

a la disociación del anticuerpo de su epítoto. Es por ello que en la medida de lo posible se deben seleccionar anticuerpos monoclonales de alta afinidad.

"La experiencia con el manejo de anticuerpos en IHQ ha demostrado que se puede reducir el tiempo de lavado e incubación en baños de buffer y que una agitación suave ayuda a reducir la coloración de fondo" (Boenisch, 2002).

### *1.1.1.7.- Reactividad cruzada de anticuerpos.*

La reactividad cruzada está relacionada con que algunas de las moléculas de anticuerpo pueden tener una afección muy baja por el antígeno que ha estimulado su producción y, de hecho, puede ser que reaccione de forma semejante con alguna otra molécula. Por otra parte, la reactividad cruzada puede resultar simplemente de un anticuerpo que sea incapaz de discriminar entre antígenos diferentes debido a sus similitudes estructurales. "Cuanto mayor sea la especificidad de un anticuerpo menor será la posibilidad de que ocurra esta situación". (Moss et al., 1982).

De acuerdo a Kelley (1993):

En términos más sencillos existen dos tipos de reacciones cruzadas, el primero cuando se aplica a una especie de anticuerpos única (productos idénticos de un clon único, anticuerpos monoclonales) la reacción cruzada es la consecuencia del hecho de que solo una pequeña fracción de los potenciales grupos formadores de uniones en el sitio de combinación puede realmente ser usada por un solo epítoto, y por lo tanto otro patrón de uniones en el mismo sitio de fijación puede

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

interactuar potencialmente con un bajo número de epítopes químicamente disímiles. En segundo lugar, cuando se aplica a un antisuero que contiene una colección heterogénea de anticuerpos, (provenientes de varios clones diferentes que responden a distintos epítopes en un antígeno complejo, policlonales), la reacción cruzada posee un significado diferente. Cuando mayor es la cantidad de epítopes que una molécula tiene en común con el antígeno original, mayor será el número de moléculas de anticuerpo que se unirá en ese antisuero.

Por lo tanto, cuando se está comparando la reacción de varios antígenos con un antisuero único, la reacción cruzada implica una similitud química y cuando se está comparando la reacción de varios antígenos con un anticuerpo monoclonal, esto no es así.

### *1.1.1.8.- Velocidad de reacción de los anticuerpos.*

Aunque bajo condiciones ideales los anticuerpos reaccionan con sus antígenos muy rápidamente, en IHQ estas condiciones rara vez se dan. Generalmente dependen de la fijación del tejido, de la concentración del anticuerpo, de la temperatura ambiente y de otras variables, por lo que el tiempo de incubación del anticuerpo primario puede requerir de hasta 48 horas para alcanzar una máxima reactividad.

Actualmente no es una sorpresa la necesidad que ha surgido de acortar los tiempos de procesamiento en los laboratorios, fundamentalmente debido a la utilización más frecuente de los procesos IHQ en el diagnóstico de la patología quirúrgica.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Los periodos cortos de incubación serían hechos factibles mediante la utilización de anticuerpos primarios de alta afinidad en concentraciones elevadas, lo que disminuye el tiempo de reacción, producto de la saturación más rápida de los sitios de unión. Sin embargo, no se sabe si las incubaciones más cortas con preparaciones de anticuerpos más concentradas establecerían el equilibrio más rápido porque, como regla, producen una coloración inespecífica, la cual se conoce como background, lo que impediría una interpretación precisa de la marcación.

De todas maneras, es importante dejar en claro que una vez que se haya seleccionado el tiempo adecuado de incubación, por experimentación o de acuerdo a lo que indican los fabricantes del anticuerpo, es fundamental mantenerlo o la coloración de este no será reproducible en forma consistente.

### *1.1.1.9.- Manejo de los Anticuerpos.*

Boenisch (2002) establece que:

Para lograr un funcionamiento óptimo de los reactivos que son utilizados en IHQ, es imperativo observar ciertas reglas básicas para su manejo y almacenaje. De ser mantenidos adecuadamente los reactivos se mantendrán estables durante meses o aún años.

En general todos los reactivos incluyendo los anticuerpos contienen su respectiva ficha técnica, en la cual el fabricante entrega las indicaciones correspondientes en cuanto a dilución (si es que viniera concentrado), manejo,

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

controles y almacenaje. Por lo que es clave seguir de manera estricta estas especificaciones para no desperdiciar este valioso recurso.

Es importante dejar en claro que para esta investigación se utilizaron anticuerpos de la marca DAKO por lo que las indicaciones son obtenidas principalmente de los mismos distribuidores, otro tipo de marcas deberán ser consultadas en sus respectivas fichas técnicas.

### **1.1.2.- Técnica inmunohistoquímica.**

#### *1.1.2.1.- Elección entre anticuerpos monoclonales y policlonales.*

Los anticuerpos monoclonales presentan ciertas ventajas sobre los anticuerpos policlonales; Se necesita muy poca cantidad de antígeno para producir una cantidad ilimitada de anticuerpos. Se pueden obtener anticuerpos específicos contra un simple determinante antigénico, aunque se utilice como inmunógeno un antígeno impuro o una

mezcla de antígenos; Los hibridomas se pueden preservar congelados en nitrógeno líquido o a una temperatura de  $-70^{\circ}$  con lo cual se asegura una fuente continua de anticuerpos. Ciertos anticuerpos monoclonales altamente específicos permiten reconocer relaciones serológicas que no son reconocidas por los policlonales. El uso de anticuerpos monoclonales elimina la variabilidad en calidad y especificidad existente en los policlonales. Se pueden utilizar como inmuno-reactivos en los métodos comúnmente

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

utilizados en el diagnóstico. Esas propiedades facilitan la estandarización de los ensayos inmunológicos en diferentes laboratorios y aseguran una distribución continua de anticuerpos.

Sin embargo, paradójicamente, los anticuerpos policlonales a veces proporcionan mayor especificidad que los monoclonales frente al mismo antígeno. Esto se debe a que las reacciones cruzadas no deseadas se pueden eliminar de un suero policlonal mediante absorción con el antígeno causante de la interferencia, mientras que las reacciones cruzadas no buscadas no se pueden eliminar de un anticuerpo monoclonal porque tiene una única especificidad. "La especificidad de los anticuerpos policlonales se pueden mejorar también mediante cromatografía de afinidad utilizando antígenospurificados".

(<http://ucmfarmaciadatos.netai.net/segund0/Inmunologia/fity/19.pdf>)

### *1.1.2.2.- Titulación de anticuerpos.*

El título de un anticuerpo se refiere a la mínima concentración (mayor dilución) de anticuerpo que resulta todavía eficaz en un ensayo, por ejemplo, la aglutinación. Los anticuerpos deben titularse antes de utilizarlos en un inmunoensayo porque usar una alta concentración es un desperdicio, puede dar señales inespecíficas y puede ser poco sensible en ensayos de inhibición. Por otro lado, una concentración demasiado baja obviamente produce una pérdida de sensibilidad.

En inmunohistoquímica, el título de un anticuerpo puede definirse como la dilución más alta de antisuero (o anticuerpo monoclonal) que resulta en una máxima

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

coloración específica con la menor cantidad de coloración de fondo, bajo condiciones de trabajo específicas. "Esta dilución máxima está determinada en principio por la cantidad absoluta de anticuerpos presentes" (Boenisch, 2002).

Si se dispone de más de un anticuerpo monoclonal frente a un antígeno de interés, es conveniente determinar si todos reconocen el mismo o diferentes epítomos del antígeno.

Boenisch (2002) indica que:

Para las preparaciones de anticuerpos monoclonales, la dilución más alta está también regida por la afinidad intrínseca del anticuerpo: si el título del anticuerpo se mantiene constante, un anticuerpo de alta afinidad va a reaccionar más rápidamente con el antígeno tisular y dará una coloración más intensa que un anticuerpo de baja afinidad utilizando el mismo tiempo de incubación.

Los títulos pueden variar desde 1:100 a 1: 2.000 para los antisueros policlonales (microgramos de antígeno precipitado por milímetro de antisuero); desde 1: 10 a 1:1.000 para los anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de cultivos celulares; y hasta 1: 1.000.000 para los anticuerpos monoclonales en líquido ascítico.

### *1.1.2.3.-Preparación del tejido para técnicas inmunohistoquímicas.*

#### *1.1.2.3.1.- Fijación.*

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

La calidad de los resultados de cualquier técnica inmunohistoquímica están estrechamente relacionados con una serie de factores condicionantes, entre ellos y quizás el más relevante es el proceso de fijación y su efecto sobre el tejido fijado.

La fijación confiere rigidez al tejido gracias a la formación de uniones entrecruzadas entre las proteínas y, en algunos casos entre los lípidos y los carbohidratos. (Ver anexo N° 4) "Mientras mejor es el grado de entrecruzamiento, mejor es la preservación de la estructura" (Armengol & Miñano, 1995). Sin embargo, un entrecruzamiento extenso altera los antígenos, por efectos químicos directos y por distorsión estructural. Los fijadores atacan selectivamente determinados grupos químicos.

Armengol & Miñano (1995) también afirman:

Que la mayoría de los fijadores se unen covalentemente con los grupos aminos y no afectan a los grupos carboxilos, ni a tampoco a los aminoácidos tirosina e histidina. Estos grupos sin afectar pueden ser partes importantes de epítomos y quedan, por tanto, retenidos para la reacción IHQ.

La detección inmunohistoquímica de un antígeno en tejido fijado depende solo de aquellos grupos que no han sido destruidos por el fijador. La unión directa del fijador con grupos químicos del tejido no es el único factor que destruye la reactividad. Debido a que confiere rigidez al tejido, también disminuye en algunas situaciones la accesibilidad de los reactivos, aunque promueven en general la permeabilidad de las membranas celulares. La fijación también puede inducir cambios conformacionales en los antígenos. Por lo tanto, la destrucción de la inmunoreactividad puede ser extensa, aunque el fijador afecte solamente a grupos químicos concretos.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

La tinción inmunohistoquímica puede afectarse por la pérdida de los epítomos en cualquiera de los pasos de la técnica, una de las funciones de los fijadores es la de inmovilizar los constituyentes evitando su "fuga" y preservar las relaciones estructurales de los constituyentes retenidos

Los efectos de la fijación sobre la tinción IHQ son diferentes si se utilizan antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales. Los antisueros contienen muchos anticuerpos heterogéneos que reaccionan con epítomos diferentes de un antígeno dado. Aun cuando la fijación destruya la mayoría de los epítomos, siempre quedarán algunos intactos que pueden ser reconocidos por algún anticuerpo del antisuero dando lugar a la reacción: "Sin embargo, cualquier alteración del epítomo que es reconocido por el anticuerpo monoclonal dará lugar a que no se produzca ninguna reacción" (Armengol & Miñano, 1995).

Entre las características principales que debería poseer el fijador ideal para inmunohistoquímica nos encontramos con que en primer lugar debe preservar de manera adecuada la morfología celular y tisular, inmovilizar el antígeno para permitir su localización, conservar su antigenicidad y permitir que el anticuerpo pueda acceder a éste, es decir, proporcionar una adecuada permeabilidad de los tejidos a los reactivos inmunohistoquímicos y al anticuerpo que posibilitará su identificación.

"El epitope (la secuencia de aminoácidos), hacia el cual el anticuerpo está dirigido puede estar escondido (enmascarado), modificado o completamente perdido como resultado de una fijación inadecuada" (Shi et al. 2002).

De acuerdo a Hyatt (2002):

Es por esta razón que la acción del fijador debe ser la suficiente como para mantener la integridad de las secciones del tejido durante todo el proceso de inmunotinción, pero a la vez no ser tan agresiva para no destruir el antígeno que está bajo estudio.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

De esto se desprende que el tiempo de fijación debe ser el necesario para preservar la imagen histológica; "un exceso de fijación reduce la inmunoreactividad del tejido" (García del Moral, 2001)

Los diferentes antígenos son afectados de distinta forma por la fijación. Lo que nos conllevaría a idear un fijador adecuado para cada antígeno. Sin embargo, los antisueros también difieren en la composición de anticuerpos reactivos con un antígeno dado." Por lo tanto, un fijador óptimo para un antígeno con un antisuero puede no ser óptimo con otro" (Armengol & Miñano, 1995). "El efecto de cada fijador sobre un antígeno puede ser distinto según la localización histológica y anatómica de dicho antígeno" (García del Moral, 2001). En el caso particular de los anticuerpos monoclonales este efecto es más pronunciado, puesto que determinado tejido puede reaccionar bien cuando ha sido fijado con un fijador determinado y no reaccionar de la misma manera cuando se ha empleado otro fijador.

En resumen, la elección del fijador adecuado es cuestión de experiencia, puesto que los cambios del componente antigénico de interés que resultan tras la acción del fijador no son predecibles. Además de esto la elección del fijador va a depender tanto del antígeno a identificar como también del antisuero a utilizar, no existiendo ningún fijador "universal" para la inmunohistoquímica.

Si bien no existe un fijador "ideal" para este tipo de protocolos, hay una gran variedad de fijadores que, de acuerdo a la experiencia del investigador podrían considerarse como los más adecuados, obviamente no hay que dejar de lado que la acción de éste puede interferir de manera negativa sobre el antígeno que deseamos localizar, por lo tanto es importante tener en consideración que el uso de otras formas de conservación tisular como lo es la congelación podrían ser más adecuados según sea el caso.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Acotándonos a esta investigación el fijador utilizado fue el formol tamponado al 10%, que de acuerdo a la literatura "es el que genera buenos resultados en la mayor parte de los estudios" (García del Moral, 2001; Buchwalow & Böcker, 2010; Boenisch, 2002). No obstante, la formalina disminuye la inmunoreactividad de los antígenos tisulares a través del mecanismo mencionado en un principio.

### *1.1.2.3.2.- Inclusión y corte.*

Para la realización de cortes finos útiles en inmunohistoquímica es imprescindible, en la mayoría de los casos incluir las muestras en alguno de los medios de inclusión habituales en los estudios morfológicos de rutina. Entre ellos el más utilizado es la parafina, ésta se utiliza normalmente cuando se desea rastrear un determinado antígeno en una región determinada puesto que los cortes de parafina son fáciles de realizar y se pueden obtener en cantidad sin que se pierda el tejido. El grosor de los cortes generalmente fluctúa entre los 3 a 5  $\mu\text{m}$ , ya que mientras más finos sean los cortes mejor será la resolución microscópica.

### *1.1.2.3.3.- Recuperación antigénica.*

García. J et al. (2006) indican que:

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Los antígenos se ven afectados de manera distinta por los diferentes procesamientos previos a la técnica inmunohistoquímica, es por ello que en este tipo de procedimientos es fundamental tener en cuenta ciertos factores: tipo y tiempo de fijación, procesamiento del tejido, naturaleza del antígeno a detectar, así como también su localización.

Generalmente el fijador más utilizado es la formalina o formol al 10% el cual actúa mediante la formación de puentes de metileno entre varios aminoácidos y polipéptidos.

Según Buchwalow & Böcker (2010):

Esta red que se forma entre las proteínas para detener el proceso de muerte celular, en conjunto con el resto del procesamiento del tejido para la inclusión en parafina provoca una alteración negativa en la estructura conformacional de las macromoléculas proteicas, la cual afecta la interacción antígeno anticuerpo que consecuentemente disminuye la intensidad de la reacción final en el procedimiento inmunohistoquímico. Esto es lo que se conoce como enmascaramiento antigénico.

Muchos anticuerpos reaccionan con antígenos resistentes al procesamiento con formaldehído y parafina. Otros antígenos pierden su reactividad inmunológica luego del procesamiento de rutina.

De acuerdo a Hyatt (2002):

Para recuperar la antigenicidad de las secciones de tejido que han sido enmascaradas por la fijación con formalina y la inclusión en parafina, los cortes deben ser sometidas a un proceso que se conoce como recuperación antigénica.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

En el website perteneciente a biopur s.r.l (2007) se señala que mediante estas técnicas de desenmascaramiento se busca revertir este proceso, eliminando parcialmente los enlaces cruzados, restaurando la conformación de los epítopes y eliminando los iones calcio con citrato.

Dentro de los métodos de recuperación antigénica existen el tratamiento proteolítico y el pre-tratamiento con calor. Se le dará mayor énfasis al segundo método debido a que es el utilizado en este estudio.

### *1.1.2.3.3.1.- Desenmascaramiento antigénico mediante calor.*

Aprovechando que "las proteínas fijadas en formol no se desnaturalizan con altas temperaturas (100°C)" (Shi et al. 1991) "en 1991 Shi y Cols utilizaron el calor junto a soluciones con metales pesados como método de desenmascaramiento empleando como fuente de calor un horno microondas"(Riera, 1999). "Éstos ya habían sido utilizados anteriormente para acelerar el proceso de las técnicas histoquímicas" (Corominas et al.1987).

La gran mejora de intensificación de la reacción, el aumento del número de anticuerpos que se pueden utilizar en el material fijado en formol (sobre todo antígenos de superficie y nucleares), su fácil manejo y estandarización hace que "este método sea el más utilizado actualmente, pasándose a denominar como técnica de recuperación de antígenos" (Momose et al., 1993).

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Las soluciones de desenmascaramiento utilizadas han sido diversas, desde el agua destilada, el bicarbonato sódico, "siendo actualmente el citrato sódico, 10 mM a pH 6-7, la más utilizada por presentar mejores resultados" (Grown et al., 1993). No obstante, "varios trabajos han observado variaciones de la inmunorreactividad al realizar variaciones en su molaridad" (Suurmeijer & Boom, 1993) "y pH" (Suurmeijer, 1994).

"Las fuentes de calor han sido distintas con el paso del tiempo. La primera utilizada fue el horno de microondas convencional, con potencia entre los 600 y 800 W" (Leong et al., 1988).

Corominas et al. (1987) señala que:

La acción de rotura de los enlaces de los fijadores no se produce por acción directa del microondas, sino por la rápida oscilación que tiene lugar sobre las moléculas bipolares de agua de la solución, lo que produce un aumento de energía térmica, y por lo tanto, de la temperatura.

Sin embargo, con la utilización de los hornos microondas existen una serie de inconvenientes, como son la dificultad del control de la temperatura, lo que puede producir resultados no homogéneos en la recuperación antigénica, y el limitado número de preparaciones a tratar por cada ciclo. "Por ello se utilizan otras fuentes de calor, como la olla a presión" (Norton et al., 1994) u olla de Pascal en nuestro caso, "y el autoclave". (Bankfalvi et al., 1994); "en ambos se consiguen temperaturas superiores a la ebullición (130 °C), siendo los resultados similares o algo superiores a los de los hornos microondas" (Miller et al., 1994). Las ventajas que ofrecen son una mejor uniformidad de la temperatura y de los resultados, así como poder procesar un mayor número de preparaciones, menor costo.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

### *1.1.2.4.- Incubación con suero normal.*

La incubación con suero normal previene la tinción de fondo (o background) debida a la unión del anticuerpo primario con componentes de los tejidos diferentes a su antígeno específico." Para ello se bloquean los lugares de unión inespecífica con suero normal de la especie animal de la que se ha obtenido el anticuerpo secundario" (Blanco et al., 2007).

### *1.1.2.5.- Bloqueo de la actividad enzimática endógena.*

Los tejidos pueden contener la enzima empleada para revelar la unión antígeno-anticuerpo. Esta actividad enzimática endógena es preciso bloquearla (previamente a la incubación con suero normal) para evitar falsos positivos. "La peroxidasa endógena se bloquea tratando las muestras con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en metanol" (Blanco et al, 2007).

### *1.1.2.6.- Incubaciones.*

Aunque la unión del anticuerpo al antígeno se puede detectar en segundos, el equilibrio normalmente no se alcanza hasta que no pasan varias horas de la adición del anticuerpo al antígeno. Para muchos ensayos, las incubaciones de 1-2 horas producen la máxima unión. El rendimiento se ve afectado por la temperatura y por eso se pueden hacer incubaciones más cortas a 37°C, las cuales deberán colocarse en una cámara

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

húmeda para prevenir la evaporación y secado de los cortes de tejido, mientras que las incubaciones largas (por ejemplo, toda la noche) se harán a 4°C. El término temperatura ambiente que se emplea en muchas técnicas se refiere a una temperatura de aproximadamente 20°C.

### 1.1.2.7.- Lavados.

García del Moral (2001) señala que:

En cualquier procedimiento inmunohistoquímico es preciso eliminar todo el antisuero no unido al antígeno durante una incubación antes de pasar a la siguiente, lo cual se realiza lavando los cortes en el tampón elegido. Habitualmente TBS. (Tris Buffer Salino 10X)

### 1.1.2.8.- Revelado.

En inmunohistoquímica se denomina revelado al proceso a través del cual se pone en evidencia el lugar de la reacción antígeno - anticuerpo mediante la adición del sustrato de la enzima peroxidasa y un cromógeno. El cromógeno más utilizado en las técnicas IHQ que emplean peroxidasa es la DAB o diamenobencidina.

Cuando la enzima peroxidasa se incuba con un sustrato adecuado, generalmente peróxido de hidrógeno, "libera oxígeno nascente que por oxidación de la DAB origina un producto de la reacción insoluble y color pardo" (García del Moral,

2001).

### **1.1.3.- Métodos de coloración.**

Método directo: con esta técnica, la más antigua, "el anticuerpo primario marcado con la enzima se unirá al antígeno tisular y a continuación después de arrastrar con TBS o PBS los anticuerpos no unidos al tejido, se revela la actividad enzimática" (Montero, 1998) mediante el uso de un cromógeno.

Método indirecto de dos pasos: con este método un anticuerpo primario sin conjugar se une primero al antígeno. Luego se aplica un anticuerpo secundario marcado con enzima dirigido contra el anticuerpo primario, seguido por el cromógeno. (Anexo).

Método indirecto de tres pasos: " un segundo anticuerpo marcado con enzima se agrega a la técnica indirecta descrita" (Ceccotti & Sforza, 2007).

#### *1.1.3.1.- Métodos de complejos inmunes solubles de enzima.*

Estas técnicas, a veces también llamadas de anticuerpo no marcado, utilizan un complejo inmune soluble enzima - anti enzima, preformado. Su denominación está relacionada con el complejo inmune enzimático utilizado. Por ejemplo, "el método de PAP que utiliza el complejo peroxidasa - antiperoxidasa o el APAAP, que emplea un

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

complejo de fosfatasa alcalina - antifosfatasa alcalina. Actualmente estas técnicas han sido reemplazadas por métodos mucho más sensibles " (Ceccotti & Sforza, 2007).

### *1.1.3.2.- Método de (estrept) avidina - biotina.*

La mayoría de los métodos de coloración inmunohistoquímica en uso en la actualidad están basados en la alta afinidad de las proteínas estreptavidina (*Streptomyces avidinii*) y la avidina (clara de huevo) por la biotina. Ambas poseen cuatro puntos de unión para la biotina, pero por la orientación molecular de estos puntos se unen menos de cuatro moléculas. "Existen dos tecnologías: el método ABC (que utiliza el complejo avidina o estreptavidina- biotina-enzima) y el método LAB o LSAB (que emplea la streptavidina marcada con la enzima)" (Ceccoti & Sforza, 2007).

### *1.1.3.3.- Método del polímero conjugado.*

Este sistema está basado en la utilización de un polímero de alto peso molecular, el dextrano, "al que se le conjugan covalentemente un gran número de moléculas de enzima (por ejemplo, HRP, hasta 100 moléculas por cadena) y de anticuerpo secundario (hasta 20 moléculas por cadena)" (Pardo Mindán et al., 1998).

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Este método teóricamente aumenta mucho la sensibilidad, permite realizar la tinción en un paso menos que las técnicas tradicionales de (strept) avidina - biotina además de conferir una gran rapidez y simplicidad al método, por otro lado, como estos sistemas evitan el uso de estas moléculas, se evita también la coloración inespecífica que resulta de la biotina endógena.

### **1.1.4.- Controles en inmunohistoquímica.**

Si comparamos la inmunohistoquímica con otras técnicas que se utilizan habitualmente en los laboratorios de anatomía patológica, nos damos cuenta que es técnico dependiente por lo que es difícil conseguir una calidad adecuada y mantenida en el tiempo.

"La validez de la IHQ en el diagnóstico histopatológico depende de la calidad de las inmunotinciones, los anticuerpos " (Finstad et al., 1992) y los sistemas de detección utilizados, otros factores que también tienen un impacto importante en la inmunotinción son la fijación, procesamiento de los tejidos y el desenmascaramiento de los epítomos. "También hay que considerar aquellos factores que se derivan de la interpretación subjetiva por el patólogo de los diversos patrones de tinción" (Mighell et al., 1995), han contribuido aún más al problema de reproducibilidad y difícil estandarización.

A pesar de estos inconvenientes, la IHQ ha crecido en los últimos 20 años hasta convertirse en parte esencial de la anatomía patológica, no solo en la rutina diagnóstica sino también en la investigación morfológica. "Por todo ello en los últimos 10 años se ha incrementado la atención hacia la mejora de la calidad de la IHQ" (Balaton et al., 1996; Bosman et al., 1992; Elias et al., 1989; Herman et al., 1991; Kuenen Bousmeester et al.,

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

1996).

De acuerdo a las diferentes necesidades que requiere la técnica inmunohistoquímica, es que podemos encontrar diversos tipos de controles (control de reactivo y control de tejido), todos ellos con el mismo objetivo, disminuir las diversas variables que pueden afectar el resultado final.

En general la función principal de los controles de reactivo apunta a determinar si los anticuerpos primarios y secundarios son específicos para sus antígenos blancos.

Esto principalmente debido a que como se mencionó anteriormente la visualización tras la cual se realiza el diagnóstico es subjetiva, por lo que los reactivos pertinentes deben controlarse dentro de los programas de control de calidad llevados a cabo rutinariamente tanto por el fabricante como por el usuario.

Boenisch (2002) afirma que:

Los parámetros que involucran estos controles de calidad de reactivo deben documentar mediante un registro apropiado las diluciones, diluyentes, tiempos de incubación y fechas en las que se introduce cualquier cambio en el procedimiento.

Por otra parte, están los controles de tejido los cuales pueden ser internos o externos, positivos o negativos.

"Mediante el uso de controles positivos y negativos con diferentes anticuerpos cada uno todos los procedimientos pueden calificarse como reproducibles y funcionales, respectivamente" (Rodak, 2005).

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

### *1.1.4.1.- Controles de tejido negativo*

"El control negativo se necesita para calificar una tinción como específica o inespecífica y debe ser un tejido que no contenga el antígeno deseado" (Rodak, 2005). Los especímenes de control negativo deben procesarse en forma idéntica (fijados, incluidos) al desconocido.

### *1.1.4.2.- Controles de tejido positivos*

"Los controles positivos son necesarios para garantizar que el anticuerpo primario actúa en forma apropiada" (Rodak, 2005). Estos controles deben procesarse de forma idéntica al espécimen y contener el antígeno buscado.

### *1.1.4.3.- Controles de tejido interno.*

También conocido con el nombre de "control dentro de la misma estructura." Este tipo de control es ideal porque se eliminan las variables de fijación del tejido entre los especímenes y controles.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

El control interno puede ser tanto positivo como negativo, sin embargo muchas veces no es posible encontrarlo dentro de la misma muestra en estudio, lo que representa una limitación esencial.

"Los controles internos positivos contienen el antígeno blanco no solo en los elementos del tejido bajo escrutinio, por Ej., en tumores, sino además en elementos del tejido normal adyacente" (Boenisch, 2002). Son conocidos como un control ideal puesto que eliminan variables como la fijación, inclusión y procesamiento, además de tener una marcación ya conocida. Por el contrario, los controles internos negativos presentan de manera paralela a la marcación de un determinado antígeno estructuras con nula reactividad frente al marcador. Por ejemplo: Para el marcador CK (AE1-AE3) Los alvéolos prostáticos marcarán un patrón de tinción intenso y definido, mientras que el tejido estromal por el contrario presentará nula reactividad frente al marcador.

A pesar de la implementación de estos controles tisulares, y de las variadas propuestas de diversos investigadores que buscan lograr uniformidad en esta rama, la estandarización hasta el día de hoy continua siendo un problema de gran importancia tanto para los fabricantes como para los usuarios en el laboratorio de histopatología, puesto que a diferencia de los inmunoensayos cuantitativos con los cuales se trabaja en laboratorio clínico como lo son el test ELISA, donde los números permiten una información cuantitativa definitiva por encima de la estandarización y el control, los resultados de la coloración inmunohistoquímica continúan dependiendo de la interpretación subjetiva por parte de patólogos con experiencia variable.

Frente a esta necesidad es que a lo largo de los años se ha logrado perfeccionar una técnica que podría reducir significativamente este gran problema.

### **1.1.5.- Microarray Tisular (TMA) : Una nueva y poderosa herramienta.**

La conclusión del Proyecto del Genoma Humano ha permitido nuevas oportunidades de análisis de genes y sus productos en el tejido humano. Es de esperar que en los años próximos se establezcan nuevas clasificaciones moleculares, que aportarán información relevante para la tipificación tumoral. El mayor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la génesis y progresión del cáncer es, por lo tanto, la base para la creación de nuevas herramientas para predecir el potencial maligno de los diferentes tumores. Estas nuevas técnicas tienen en común la capacidad de generar confiabilidad y rendimiento, una gran cantidad de datos emergentes que, por otra parte, sería imposible obtener a partir de la metodología tradicional de la patología molecular.

Lorente Garín et al. (2006) indican que:

La creación de estos futuros mapas o patrones moleculares, son de gran utilidad a nivel clínico, ya que permiten la realización de diferentes ensayos en cientos de muestras simultáneamente.

#### *1.1.5.1.- Definición.*

La palabra microarray proviene del griego *mikro* que significa pequeño y del inglés *array* que quiere decir, distribución ordenada o colección.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Los microarrays de tejidos, también llamados TMA, "consisten en bloques de parafina en el que hasta 1000 cilindros de tejidos diferentes" (Lin & Prichard, 2011) son ensamblados de manera conjunta permitiendo así el análisis histológico múltiple.

La construcción de TMA implica el uso de un dispositivo hueco (punch), que se utiliza para extraer del tejido fragmentos llamados cores o cilindros de un solo bloque donante, y luego estos cilindros de tejido se incluyen en un posterior bloque receptor, obteniendo de este modo un bloque de parafina que puede contener cientos de cilindros, de diferentes bloques donantes. (Ver anexo N° 5)

"En la actualidad los TMA se han convertido en una poderosa herramienta de investigación, la cual es de gran utilidad en los análisis de múltiples muestras a partir de las técnicas de tinción rutinaria" (Wang. H. et al, 2002), "inmunohistoquímica" (Martínez et al., 2011), "hibridación in situ" (Packestein et al., 2002; Van de Rijn & Gilks, 2004), "entre otras aplicaciones" (Shergill et al., 2004; Obermann et al., 2005) entre las cuales se encuentra la posibilidad de estudiar los nuevos marcadores o los ya existentes de manera masiva, servir como control de calidad para los nuevos anticuerpos, facilitar y acelerar el traslado de la información obtenida a la práctica clínica , puesto que obvian las limitaciones de las técnicas convencionales , como la necesidad de estudiar uno a uno miles de especímenes, repitiendo los ensayos, además de las consiguientes y extensas validaciones que estos implican.

### *1.1.5.2.- Historia.*

La idea original de seleccionar fragmentos tisulares de tamaño reducido surge en la década de los 80 como consecuencia del desarrollo de las técnicas

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

inmunohistoquímicas, que suponían una mejora en el diagnóstico histopatológico. Sin embargo, el inconveniente de éstas era la limitada disponibilidad de sus reactivos, el alto coste de estos y lo largo de sus protocolos.

En primera instancia para responder a la necesidad de un método de procesamiento tisular más eficiente, el patólogo Hector Battifora (1986) perteneciente al laboratorio City of Hope en Duarte (CA, USA), desarrolló una técnica que fue denominada en un principio como "Método salchicha" o "Sausage method" el cual permitía montar un gran número de tejidos normales o tumorales en una membrana de revestimiento la que posteriormente se embebía en un único bloque de parafina, al que denominó "multitumor tissue block" (MTTB).

Posteriormente, Wan et al. (1987) del AMC Cancer Research Center de Denver (CO, USA) publicaron una modificación del método de Battifora, que solucionaba el problema de la distribución aleatoria de los tejidos. Lo denominaron "parafin core method". Esta técnica consistía en la preparación de cilindros de tejido parafinado proveniente de bloques histológicos que eran introducidos en una matriz de parafina. Este bloque era seccionado y de esta manera se podían obtener preparaciones histológicas.

Además, a partir de esta técnica describieron la posibilidad de estudiar simultáneamente 120 casos, con el consiguiente ahorro de costes y tiempo al realizar técnicas inmunohistoquímicas.

Finalmente, Kononen (1998) apoyado por un grupo de científicos, en el National Institute of Health (NIH) en Bethesda (MD, USA), desarrollaron la técnica actual, la cual se caracteriza principalmente por la utilización de un sencillo aparato denominado "tissue arrayer", que permite producir tejidos de tamaño y forma regulares los cuales pueden ser dispuestos con mayor precisión.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Esta técnica surge en un contexto en el que comenzaban a despuntar técnicas revolucionarias de análisis genómico, como los cDNA microarrays, mediante las cuales se podían obtener enormes cantidades de datos. Es en este momento en el que se describe una técnica que consistía en pinchar con una aguja de pequeño diámetro un bloque de parafina y extraer un diminuto cilindro de tejido que se colocaba en otro bloque, denominado "receptor", en el que se disponían matricialmente una gran cantidad de cilindros. Potencialmente, se podía pensar en disponer hasta 1000 cilindros de tejido en un mismo bloque. Además, esta técnica aportaba ventajas adicionales, como su utilización en otras técnicas como el FISH e ISH.

### *1.1.5.3.- Tipos de Microarrays tisulares.*

De acuerdo a la composición de los TMA, estos se pueden subdividir en diversos tipos.

#### *1.1.5.3.1.- TMAs multitumor o de prevalencia.*

Están compuestos por distintos tipos tumorales. Se utilizan para cribar alteraciones moleculares de interés. "El primer ejemplo de TMA multitumor contenía 397 muestras de 17 tipos tumorales diferentes" (Schraml et al., 1999).

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

### 1.1.5.3.2.- *TMA*s de progresión.

Contienen muestras de las diferentes etapas de un tumor en particular. Se emplean para descubrir asociaciones entre genotipo y fenotipo tumoral. Por ejemplo, según lo señalado por Bancroft & Gamble (2008) la progresión ideal de un cáncer de mama para construir un TMA debería contener muestras de mama normal, de pacientes con y sin antecedentes de cáncer de mama, diferentes tipos de enfermedades mamarias no neoplásicas, carcinoma in situ ductal y lobular, carcinomas invasivos de todos los estadios, grados y subtipos histológicos. Finalmente, estos bloques también deberían incluir metástasis y casos de tumores reincidentes.

### 1.1.5.3.3.- *TMA*s de pronóstico:

Constituidos por tumores de los que se poseen datos clínicos y seguimiento. Con la ayuda de estos arrays, nuevos parámetros pronósticos podrían ser identificados o "se puede testar el valor de alteraciones moleculares para predecir la respuesta a la quimioterapia" (Moch et al., 1999).

### 1.1.5.4.- *Otras variantes relacionadas con los tissue microarrays convencionales:*

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

### 1.1.5.4.1.- *Crioarrays.*

Son TMAs compuestos de tejidos congelados. "Han surgido como consecuencia de los problemas inherentes a la utilización de TMAs de tejido fijado (dificultad en extraer RNA)" (Fejzo & Slamon , 2001).

### 1.1.5.4.2.- *TMAs que contienen líneas celulares.*

Como su nombre lo indica, "están compuestos por líneas celulares, en vez de tejido parafinado" (Hoos & Cordon-Cardo, 2001). Cabe mencionar que "recientemente se ha descrito un array de líneas celulares congeladas" (Fejzo & Slamon , 2001; Stephan et al. , 2002).

### 1.1.5.4.3.- *Tissue macroarrays.*

Variante sencilla de los TMAs realizada manualmente por lo que el tamaño de los segmentos tisulares que componen el macroarray son de una dimensión mucho mayor que la de los que componen el microarray.

Estos macroarrays podrían representar una alternativa en aquellos casos en que la heterogeneidad tumoral dificulte la evaluación de los datos obtenidos con un TMA habitual.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Se han descrito diversos métodos, con variaciones manuales, dentro de los cuales encontramos el método denominado "*Macrochops*" (Fernández et al., 2001), el cual incluye el uso de un punch que se utiliza para pinchar en el bloque donador y posteriormente el material se introduce en un bloque receptor que consta únicamente de parafina. "Por otra parte también existe una variante en la cual se utilizan hojas de bisturí" (Wang. L et al., 2002). Este método incluye el corte de un bloque de parafina con el material a estudiar, a partir del cual se obtienen secciones de 1,2 x 0,8 cm que pueden ser trasladadas ordenadamente e independientemente a una preparación histológica receptora. De esta forma es posible estudiar de forma simultánea hasta 12 bloques de parafina diferentes.

### *1.1.5 5.- Ventajas e inconvenientes de los tissue microarrays.*

La principal ventaja de la utilización de esta técnica es la reducción significativa de tiempo y coste para su realización. Es posible efectuar un estudio de grandes series de pacientes en un tiempo escaso. Ello se halla motivado por una rápida velocidad en el procesamiento de las muestras, la posibilidad de análisis simultáneo y estandarizado de múltiples muestras y la existencia de un área de tamaño suficiente para analizar.

Esta tecnología permite a investigadores y patólogos, estudiar y evaluar enfermedades en etapas tempranas. Un centenar de muestras tisulares pueden ubicarse en un solo bloque y a su vez todas ellas una vez que son cortadas y procesadas podrán ser evaluadas de manera simultánea por el patólogo, ya que se encuentran dentro de un mismo porta objetos.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

La cantidad de cilindros que pueden ubicarse en un mismo bloque y/o portaobjetos va a depender del tamaño del punch, el cual fluctúa entre los 1 - 4 mm de diámetro y su selección será de acuerdo al tipo de estudio en el cual se utilicen estos bloques TMAs. En general en investigaciones de tipo molecular donde se emplean técnicas como la inmunofluorescencia e inmunohistoquímica se emplean agujas cuyo diámetro es muy pequeño, puesto que se requiere analizar grandes cantidades de tejidos en un mismo bloque para obtener datos estadísticos y patrones comparables

Además, la mayoría de estos se encuentran acompañados por un software que permite analizar los parámetros a estudiar.

La cantidad de secciones que se obtengan de un mismo bloque va a depender de la experiencia del usuario y también del grosor de los cilindros.

Los TMAs permiten analizar la expresión del marcador determinado, estudios clínico-patológicos en los que se valora la expresión de este marcador con otras variables como tipo histológico y grado. También se pueden realizar trabajos cuya finalidad sea la obtención de factores pronósticos, mediante estudios de supervivencia, aparición de recidivas, entre otros." Además, esta técnica también puede ser útil para el estudio de enfermedades no neoplásicas y utilizando citologías" (Rimm, 2001), aunque estas aplicaciones todavía se encuentran en una fase preliminar.

Los principales inconvenientes surgen en los casos de tumores muy heterogéneos histológicamente y cuando existe un mínimo número de células tumorales en las biopsias. La reproducibilidad de los resultados debería validarse mediante un estudio comparativo con secciones completas de un grupo de tumores en estos casos.

Frente a este inconveniente es necesario dejar en claro que los TMAs no se construyen de forma aleatoria, sino seleccionando determinadas regiones del tumor, por lo que en los casos de tumores muy heterogéneos una cuidadosa selección de las zonas puede aumentar la representatividad de los resultados.

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

En el caso de expresarse de forma heterogénea, la evaluación debe ser más cuidadosa. Por último, se contraindica el estudio con TMAs de los marcadores de expresión focal, ya que puede dar lugar a una interpretación errónea. "En este caso, una alternativa sería la utilización de técnicas que requieran de un mayor aporte de material, como los macrochops" (Fernández et al , 2001).

### *1.1.5.6.-Validación de la técnica.*

El reducido tamaño de los cilindros tisulares que conforman las matrices de tejido ha sido durante un largo tiempo uno de los principales cuestionamientos frente al uso de esta técnica, esto debido a que evidentemente estos cilindros de tejido contienen un número de células mucho menor a la sección completa del tejido. Por esta razón es que preguntas como ¿es el cilindro representativo?, ¿es la tinción interpretable?, ¿qué tipos celulares presentan?, ¿qué tipos de células presentan expresión positiva? han sido respondidas mediante una serie de estudios que buscan validar el empleo de estos microchips.

#### *1.1.5.6.1.- Estudios de validación.*

- Gillett et al. (2000) efectuaron estudios en relación a la expresión de receptores de estrógeno y progesterona en carcinomas de mama, comparándola con res-

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

pecto a la del tejido normal. Esta comparación fue realizada mediante el uso de cilindros tisulares.

- Ese mismo año Camp et al. (2000) realizaron un estudio también en carcinomas mamarios, en el cual se evaluó la expresión de receptores ER, PR y Her2/Neu empleando 2 a 10 cilindros respecto de la sección completa de tejido, con la particularidad de que se utilizaron 8 a 11 casos de cada década, comenzando por 1932, a fin de evaluar como influía el paso del tiempo en la expresión de los marcadores.
- Posteriormente se llevó a cabo un estudio acerca de "el efecto de la heterogeneidad tumoral valorando los ER y PR en carcinomas de mama, a partir del cual se obtuvieron resultados favorables especialmente cuando la tinción del marcador era homogénea" (Nocito et al, 2001). No quedó demostrado que el incremento del diámetro del punch aumentase la representatividad del análisis del TMA y además disminuye el número de muestras que pueden disponerse en una única preparación.
- En el año 2002 "se publicó un nuevo estudio de validación por parte de Rubin y sus colaboradores, esta vez evaluando la expresión de Ki-67 en carcinomas de próstata" (Rubin et al., 2002). Estos describieron que la obtención de menos de tres cilindros de la sección original no era representativa de la expresión de la proteína y que un número de cilindros mayor a cuatro no añadía información significativa.
- Asimismo, el meeting de la USCAP de este año aportó una serie de publicaciones que analizaron el problema de la heterogeneidad en el modelo de carcinoma prostático. Concretamente, el grupo de FK Mostofi en el AFIP presentó un trabajo de validación de p53 y bcl-2 en carcinomas de próstata. "Concluyó que los TMAs eran útiles para estudiar la naturaleza multifocal y heterogénea del carci-

noma de próstata, pero no pudo confirmar un valor pronóstico de estos marcadores utilizando esta tecnología" (Merseburger et al, 2002).

- También en este mismo congreso se presentó "un extenso estudio de validación utilizando un panel de 15 anticuerpos de utilidad diagnóstica, con resultados satisfactorios" (Hsu et al., 2002).

Si bien tras la información proporcionada con anterioridad queda bastante claro que los TMAs, son una herramienta cuyo uso ha logrado ser validado de manera satisfactoria a lo largo de los años, es importante considerar que estos no se utilizan para realizar diagnósticos propiamente tales, pues las dimensiones de los cilindros no son aptas para realizar un estudio de estas características. Se debe tener en cuenta que estos son una herramienta de cribaje a nivel poblacional, para analizar de un modo rápido y económico las frecuencias de expresión de marcadores en poblaciones celulares, tisulares o en pacientes utilizando un gran número de casos. Por el contrario, el estudio cuidadoso y exacto de un tumor requiere de múltiples secciones completas, amplias y consecutivas.

#### **1.1.6.- Aplicación de los TMAs para la optimización de protocolos inmunohistoquímicos en marcadores útiles para cáncer de mama y línea primaria.**

El contar con anticuerpos marcadores selectivos de cada variedad de cáncer brinda la posibilidad de poder tratar adecuadamente a cada paciente, pues en varias ocasiones, el estudio microscópico común (tinción con hematoxilina y eosina) no es

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

capaz de clasificar exactamente, a la neoplasia que se estudia. Respecto a esto , la inmunohistoquímica (IHQ) no tan solo puede definir la estipe histológica del cáncer en cuestión (línea primaria): si consideramos como caso aparte el carcinoma de mama, ésta también juega un rol clave en la determinación del tratamiento posterior de las pacientes producto de que es una enfermedad hormonodependiente , lo que implica que al igual que el aparato genital femenino, frente a cada ciclo hormonal, también responda con fenómenos de crecimiento y divisiones celulares.

Por esta razón es que como en todas las pruebas de laboratorio el control de calidad debe estar presente para poder asegurar que el resultado está bien. Cabe recordar, que cuando un cáncer no es clasificado adecuadamente, se aplican, de forma lamentable medicamentos o tratamientos antineoplásicos equívocos, con la consiguiente pérdida de oportunidad para el tratamiento.

En anatomía patológica los TMAs tienen muchas aplicaciones, puesto que sirven como un instrumento de control de calidad para evaluar la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos, métodos de fijación de los tejidos y optimizar los protocolos de tinción. Además, pueden ayudar a optimizar y estandarizar la interpretación de la inmunohistoquímica.

Es precisamente en estos dos últimos puntos donde se centra esta investigación, puesto que nos hemos basado en la técnica de los TMAs para elaborar de manera sencilla una serie de micromatrices tisulares que serán empleadas como control de los protocolos inmunohistoquímicos, que se utilizan tanto para el diagnóstico de cáncer de mama, como para determinar u confirmar el origen de un tumor poco diferenciado o anaplásico (línea primaria).

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

Si bien el uso de controles es de carácter obligatorio para dar validez a la calidad de la técnica IHQ, generalmente se emplean controles en placas paralelas a la muestra problema que no garantizan que ambas hayan recibido exactamente el mismo tratamiento, además de conllevar un gasto extra de reactivo, por lo que el empleo de las micromatrices cubriría ambas falencias, pues las secciones se dispondrán de manera conjunta al tejido en estudio y dentro de la misma gota de reactivo. De esta manera si es que existe o no algún problema en la técnica o algún error en la interpretación de la marcación esto quedará en evidencia. La importancia de la precisión que se busca alcanzar mediante estos controles se basa en que la utilización de los marcadores IHQ es clave al momento de tratar con patologías cancerígenas, puesto que representan una guía diagnóstica, que nos permite determinar la estirpe de un tumor de origen desconocido, evaluar posibles tratamientos y factores pronósticos así además de conocer su evolución en el tiempo.

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS.**

#### **2.1.- OBJETIVO GENERAL.**

"Optimizar los protocolos inmunohistoquímicos en relación a la interpretación e identificación de marcadores tumorales específicos, mediante la implementación de controles obtenidos a partir de micromatrices tisulares".

#### **2.2.1- Objetivos Específicos.**

- Desarrollar diversos tacos control en base a la técnica "Tissue Microarray" o TMA que contribuyan al estudio inmunohistoquímico del perfil molecular de determinados tipos de cáncer.
- Aplicar los cortes obtenidos a partir de las micromatrices control en la misma placa que los casos que se encuentran en estudio.

## CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.

- Elaborar un stock suficiente de matrices control para ser empleados de manera rutinaria en protocolos IHQ según sean requeridos por el servicio.
- Contrastar los resultados obtenidos tras la utilización de los controles, mediante una evaluación, que incluirá a la totalidad de los profesionales que conforman el equipo de diagnóstico anatomopatológico.
- Proponer la implementación de controles como una herramienta de entrenamiento diagnóstico en el área pedagógica.

## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1.- KIT DE ANTICUERPOS UTILIZADOS.**

La selección de los anticuerpos utilizados para esta experimentación fue realizada de acuerdo a los requerimientos del Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Dr. Gustavo Fricke, basándonos en los protocolos inmunohistoquímicos más utilizados anualmente. (Ver anexo N° 6)

##### **3.1.1.- Marcadores de utilidad en cáncer mamario.**

###### *3.1.1.1.- Receptores estrógeno- progesterona.*

La expresión de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) constituyen una variable de valor pronóstico en el cáncer de mama, donde la respuesta a la terapia endocrina será más favorable en tumores con estos receptores positivos. La presencia de receptores de estrógeno implica que los mecanismos celulares

## CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

normales para procesar esta hormona se encuentran conservados a pesar de la transformación neoplásica, especialmente si conjuntamente se expresa el receptor de progesterona.

La importancia clínica del receptor de estrógenos se relaciona con el hecho de que su presencia identifica tumores que son sensibles al tratamiento hormonal con el antagonista correspondiente.

### 3.1.1.2.- *HercepTest*.

Es un ensayo inmunocitoquímico semicuantitativo que determina la sobreexpresión de la proteína HER2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano) en tejidos mamarios cancerosos procesados de forma rutinaria para su evaluación histológica. En concreto demuestra la sobreexpresión de la proteína HER2.

Los resultados del Herceptest ya sean positivos o negativos contribuyen a la clasificación de las células y/o tejidos anormales además de proporcionar la base para la selección del tratamiento con Herceptin™.

### 3.1.2.- Anticuerpos de la línea primaria.

## CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Los anticuerpos que constituyen la línea primaria cumplen un rol fundamental en la identificación de patologías tumorales cuyo origen se encuentra en duda o no es determinable a través de los procedimientos histológicos de rutina. Estos entregan información clave acerca de la procedencia u origen celular de la neoplasia.

### 3.1.2.1.- LCA o CD45 (*Antígeno leucocitario común*).

Marcador de células linfoides. Antígeno de transmembrana presente en todas las células nucleadas de origen hematopoyético. Se expresa en células B y T neoplásicas, en linfomas B y T no-Hodgkin y en leucemias de células B y T.

### 3.1.2.2.- S100.

La proteína S100 usualmente se emplea como marcador de diferenciación neural, pues expresa una positividad frente a tumores perineurales, cartilagosos, osteosarcomas, carcinomas viscerales y ecrinos, gliomas malignos y tumores de células de Langerhans. Además de constituir uno de los marcadores más sensibles de melanocitos, por ende se emplea también en el diagnóstico del melanoma.

## CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 3.1.2.3.- CK (AE1-AE3).

Coctel de dos anticuerpos monoclonales de amplio espectro que son utilizados para la identificación cualitativa de la mayoría de las queratinas humanas mediante la microscopía de luz. Su uso en el laboratorio es complementario a las técnicas rutinarias y permite establecer el origen epitelial de las neoplasias.

### 3.1.2.4.-Vimentina.

Filamento intermediario que contribuye también al sostén físico de la célula, presente en las células de origen mesenquimal y en tumores derivados. Se expresa también en algunos carcinomas (riñón, endometrio, tiroides, colon).

### 3.1.3.- Implementación básica para inmunohistoquímica.

- ✓ Cámara Húmeda ( Ver anexo N°7)
- ✓ Portas silanizados
- ✓ Wash Buffer 10X ( pH 7,6 / concentración 1 : 10)
- ✓ Micropipetas ( 100 u )

### CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### Recuperación antigénica (Ver anexo N°8)

- ✓ Olla de Pascal (Pascal pressurized heating chamber DAKO)
- ✓ Copling
- ✓ Solución recuperadora: Citrato pH 6.0 (DAKO)  
EDTA Tris pH 9.0 ( 50X)
- ✓ Agua bidestilada

#### Sistema de Visualización ( Ver anexo N° 9)

- ✓ Novolink de Novacastra (Polymer detection system)
- ✓ LSAB + System HRP DAKO

#### Cromógeno ( Ver anexo N° 10)

- ✓ DAB DAKO

#### Contraste

- ✓ Verde Luz
- ✓ Hematoxilina de Harris

**3.1.4.- Materiales para procesamiento de rutina.**

Además de los anticuerpos, kits de revelado y sus respectivos protocolos, como requerimiento principal se debe contar con la implementación básica de un laboratorio de anatomía patológica para poder llevar a cabo el procesamiento común de las muestras de tejido seleccionadas. ( Ver anexo N° 11) Requerimientos y materiales :

- ✓ Zona para realizar el examen macroscópico. Idealmente que cuente con óptima extracción de aire en conjunto con las herramientas adecuadas.
- ✓ Cassettes porta tejidos.
- ✓ Procesador automático de tejidos *Shandon Citadel 2000 ThermoFisher Scientific.*
- ✓ Centro de inclusión *Leica EG1150 H.*
- ✓ Parafina.
- ✓ Placa fría *Leica EG1150 C*
- ✓ Moldes.
- ✓ Micrótomos de rotación *Leica RM 2235.*
- ✓ Baño de estirado *Leica HI1210.*
- ✓ Albúmina.
- ✓ Portaobjetos normales
- ✓ Canastillos.
- ✓ Estufa.
- ✓ Batería común de tinción.
- ✓ Medio de montaje hidrófobo *Entellan Merck.*
- ✓ Guantes desechables.
- ✓ Probetas.
- ✓ Pipetas pasteur.
- ✓ Microscopio.

## CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

### **3.1.5.- Materiales para la elaboración de la matriz tisular.**

- ✓ Molde de parafina.
- ✓ Punch para biopsias (3.5 mm).
- ✓ Tacos donadores.

## **3.2.- METODOLOGÍA.**

### **3.2.1.- Tipo de estudio.**

Estudio caso control, descriptivo, transversal con enfoque cuantitativo.

### **3.2.2.- Obtención y selección de las muestras.**

Las muestras empleadas para esta investigación, procederán de tejidos que no se utilizaron en el diagnóstico de la lesión propiamente tal. Es tejido que se desechó, puesto que el material requerido para el estudio histopatológico ya fue apartado.

## CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

La selección de estas muestras tendrá un carácter desicional, es decir, serán escogidas en base a los requerimientos de los marcadores específicos (anticuerpos) con los que se trabajará.

Cabe señalar, que la búsqueda y selección de estas muestras está orientada a encontrar un “control positivo”, es decir, tejidos en los cuales su positividad frente a determinado anticuerpo es conocida, además de un control negativo para establecer la eficacia y sensibilidad de la marcación. Esto involucra tanto a los anticuerpos de la línea primaria, receptores hormonales como también a Herceptest. Sin embargo, en los dos últimos casos se incluirán también las diferentes intensidades de reacción (score) para la interpretación de los resultados.

### 3.2.2.1.- Muestras para línea primaria.

En el caso de la línea primaria, los tejidos que se requerirán como control positivo y negativo para la elaboración de cada una de las matrices serán recolectados de acuerdo a los datos recopilados durante la revisión bibliográfica, pues en general solo se le realizan estudios IHQ a las patologías de mayor complejidad cuyo diagnóstico no es posible de establecer mediante las técnicas de rutina. Por esta razón la mayor parte de los tejidos recopilados no tienen ningún tipo de estudio IHQ previo, a diferencia de las muestras que se emplearán para los receptores hormonales y HercepTest.

La selección de estos tejidos estará estrechamente relacionada con la disponibilidad de ellos en el laboratorio, ya que en general los tejidos que llegan diariamente no son de mucha variedad.

### CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para realizar una selección adecuada de tejido para cada anticuerpo, se confeccionó una matriz prueba, con múltiples tejidos tanto normales como patológicos, cuyo propósito era establecer cuáles eran los que presentaban una marcación más específica y con menor background, siendo estos mismos los que se utilizarían para producir la matriz control definitiva de cada anticuerpo.

#### 3.2.2.2.- *Muestras para marcadores útiles en cáncer de mama.*

Las secciones de mamas utilizadas fueron obtenidas a partir de desechos de biopsias y en algunos casos también de desechos de autopsias, particularmente en el caso de las mamas normales.

Anteriormente se mencionó que en primera instancia para estos marcadores no se realizó ningún tipo de micromatriz de selección, pues ya contábamos con los diagnósticos de cada una de las muestras recolectadas, con excepción de las que provenían de autopsias. Esto se debe a que cada uno de los desechos recolectados, provenían de una muestra mayor, la cual ya había sido previamente procesada y estudiada para descartar la presencia de células cancerígenas. Por lo que para determinar cuáles eran sus intensidades de marcación sólo tuvimos que revisar los registros y verificar cuáles muestras servían y cuáles no. De esta manera la selección de ellas y su orden al interior de la matriz fue determinado en base a los resultados obtenidos en estos estudios.

## CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para las muestras de mamas normales provenientes de desecho de autopsias, se realizaron una serie de micromatrices, cada una con diversas áreas representativas de cada muestra y posteriormente se evaluaron los resultados obtenidos para establecer su intensidad de marcación tanto para HercepTest como para receptores hormonales.

En primera instancia la cantidad de muestras fueron suficientes como para elaborar la primera matriz funcional, sin embargo, producto de algunos problemas que se comentarán en la discusión, estas se hicieron escasas por lo que hubo que recurrir a tacos antiguos en proceso de eliminación.

Hace algunos años no era rutinario y/o obligatorio realizar pruebas IHQ a todas las muestras mamarias que fueran recibidas en el servicio, por lo que la mayoría de los tacos no presentaba ningún tipo de estudio además del H-E , debido a esto es que se llevó a cabo la búsqueda en el sistema computacional de cada uno de los diagnósticos de todas las muestras que logramos rescatar, de esta manera, sólo empleamos las que venían con diagnóstico previo de cáncer para elaborar una serie de matrices prueba que nos permitieran obtener una mayor variedad de intensidades de marcación, de esta manera podríamos dejar un stock suficiente para su utilización posterior.

### **3.2.3.- Tratamiento previo de los tacos donadores.**

Para la elaboración de los tacos que contienen los tejidos “donadores” es necesario realizar el correspondiente examen macroscópico. De esta manera podremos obtener cortes representativos de cada uno de los tejidos de interés.

## CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Una vez que el patólogo haya realizado este proceso, los tejidos se disponen al interior de cassettes previamente rotulados, para ser llevados al procesador de tejidos que permitirá (tras un periodo de alrededor de 16 hrs) la impregnación de estos en parafina, dándoles el sostén suficiente para posteriormente ser incluidos, cortados con el micrótopo de rotación y adheridos a un portaobjetos, empleando de acuerdo a la técnica ya sea de rutina o IHQ un medio de adhesión adecuado. En el caso de las placas que serán teñidas mediante la técnica de rutina Hematoxilina – Eosina, se utilizará albúmina, y para aquellas que sean sometidas a procedimientos Inmunohistoquímicos, se emplearán porta objetos silenizados, esto debido a que los constantes lavados y las altas temperaturas que se emplean durante el proceso de recuperación antigénica pueden provocar el desprendimiento del tejido si se emplean medios de adhesión comunes.

### **3.2.4.- Producción de una matriz tisular.**

- 1- Una vez que se ha llevado a cabo el proceso que permite obtener los tacos que contienen las muestras tisulares de interés, se realiza un corte cuyo grosor varía entre los 4- 5  $\mu\text{m}$ .
- 2- Este corte será teñido con Hematoxilina – Eosina y procesado de manera rutinaria hasta obtener las placas que serán observadas por el patólogo.
- 3- Una vez finalizada esta etapa, mediante la observación microscópica, el patólogo procederá a identificar las zonas idóneas para la punción.

### CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

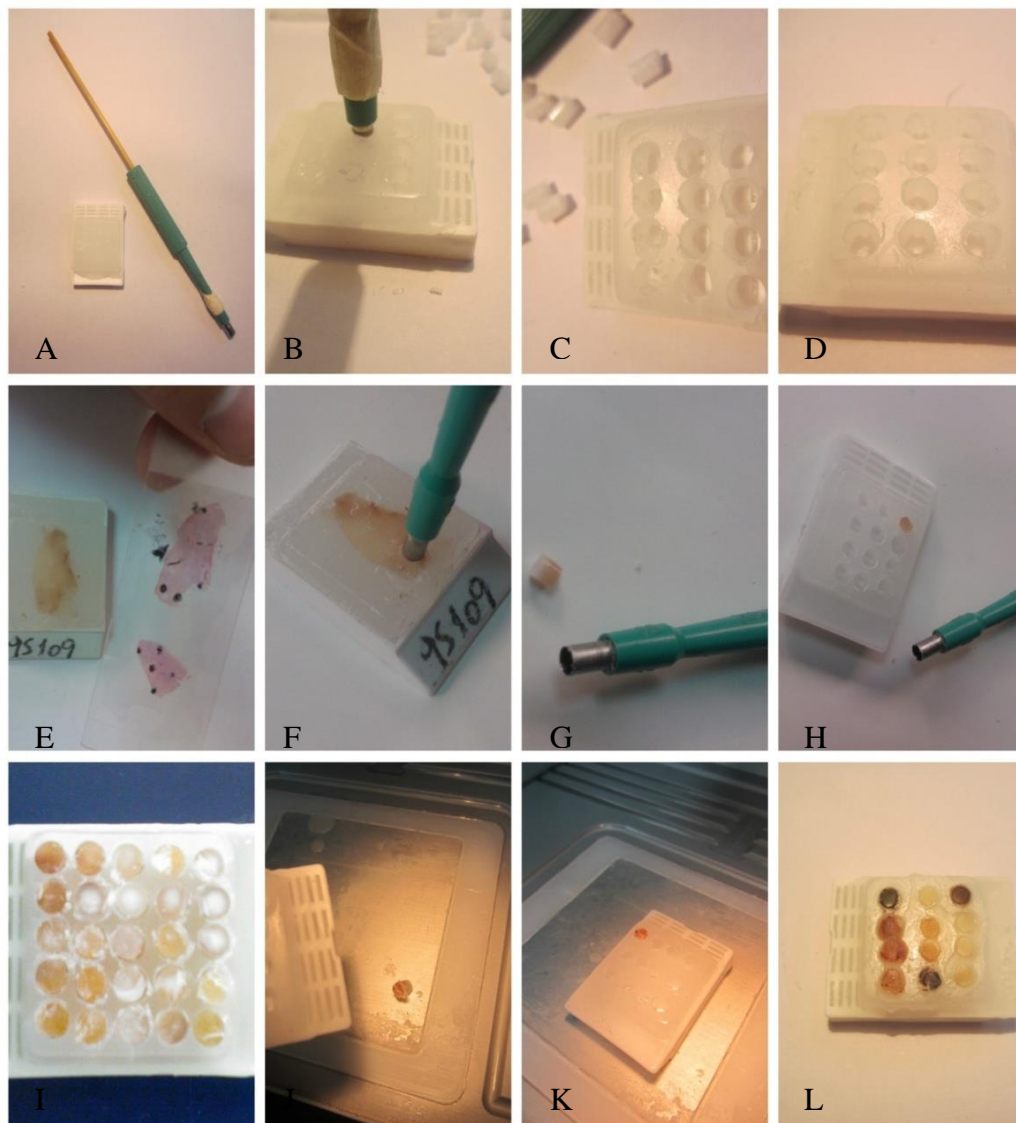
- 4- Posteriormente se realiza una comparación entre las regiones marcadas en la placa con las regiones del taco que dio origen al corte.
- 5- Utilizando el punch de biopsias se realiza la punción en las zonas seleccionadas previamente y los cilindros obtenidos se insertan en la matriz de parafina. Cada cilindro tiene un grosor de 3,5 mm.

La matriz de parafina receptora debe ser fabricada con anterioridad empleando el mismo punch que se utiliza para la punción tisular.

Una vez que los cilindros tisulares se encuentran en su respectiva posición, es recomendable sacarlos uno a uno y agregar una gota de parafina en cada uno de los agujeros de manera individual debido a que se adhieren mejor los cilindros a la matriz de parafina, de esta manera una vez finalizado este paso la matriz es llevada directamente a el refrigerador para poder cortarla y no requiere pasar por la estufa.

- 6- Finalmente, una vez que el bloque con múltiples tejidos o matriz tisular están listos, se empareja la superficie del taco y se procede a realizar nuevos cortes para su estudio IHQ respectivo.

Es importante señalar que se debe llevar un registro de la ubicación exacta de cada cilindro al interior de la matriz, para no cometer errores en su posterior identificación y uso.



**FIGURA 3.1** *Elaboración y corte de un bloque TMA.* A) Para elaboración de la matriz receptora se necesita un punch y un bloque de parafina previamente confeccionado, cuyo tamaño y número de agujeros dependerá de la cantidad de tejidos a estudiar. B) Utilizando el punch se perfora el bloque de parafina C) Hasta obtener el número deseado de agujeros receptores. D) Una vez que la matriz de parafina está lista. E) El corte del bloque donador se marca para indicar el área de interés. F) La placa marcada que contiene el corte del bloque donador se utiliza para localizar el lugar específico del taco que será puncionado. G) Utilizando la varilla cuidadosamente se extrae el cilindro tisular desde el interior del punch H). El cilindro extraído del bloque donador se inserta en un nuevo bloque de parafina denominado matriz receptora, y así sucesivamente con el resto de tejidos seleccionados que quieran ser dispuestos en la misma matriz J) Una vez que la micromatriz este completa los cilindros se sacan uno a uno K) Se aplica parafina en el interior de cada agujero y se re-introducen los cilindros hasta que estén todos adheridos. L) Finalmente el bloque TMA se encuentra listo para ser cortado.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS.

#### 4.1.- BÚSQUEDA DE CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA LA LÍNEA PRIMARIA.

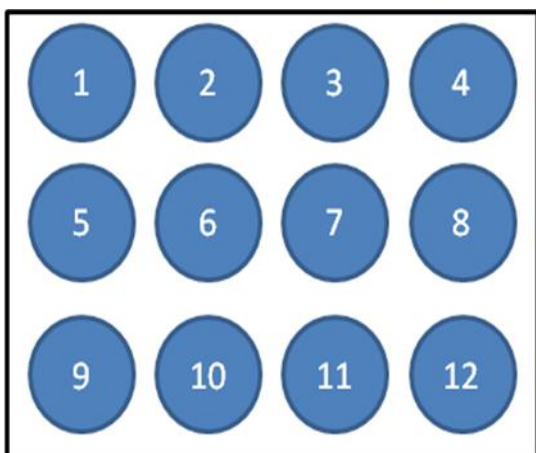
##### 4.1.1.- Prueba N° 1.

Se elaboro una matriz base constituida por doce tejidos diferentes.

TABLA N° 4.1 *Composición de la primera micromatriz de prueba.*

<b>Órgano</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Fuente</b>
<b>1- Próstata</b>	Hiperplasia nodular .	Biopsia
<b>2- Hígado</b>	Normal	Autopsia
<b>3- Ortejo Cutáneo</b>	Melanoma maligno	Biopsia
<b>4- Mama</b>	Osteosarcoma	Biopsia
<b>5- Apéndice</b>	Normal	Autopsia
<b>6-Estómago</b>	Adenocarcinoma Gástrico	Biopsia
<b>7- Ganglio Axilar</b>	Ca. Ductal infiltrante.	Biopsia
<b>8- Intestino Delgado</b>	Enteritis aguda inespecífica.	Biopsia
<b>9- Intestino Grueso</b>	Rectitis aguda inespecífica.	Biopsia
<b>10- Piel</b>	Normal	Autopsia
<b>11- Útero (miometrio)</b>	Normal	Autopsia
<b>12- Amígdala palatina</b>	Amigdalitis crónica	Biopsia

## CAPITULO 4. RESULTADOS.



**FIGURA N°4.1** Esquema que señala la distribución de los doce tejidos al interior de la primera micromatriz prueba.

Una vez preparada la matriz se obtuvieron cuatro cortes, uno para cada uno de los anticuerpos, cada uno de ellos en su respectivo porta objetos previamente silanizado.

Para cada uno de los anticuerpos a evaluar (LCA, VIM, CK (AE1- AE3), S100) se realizó el protocolo correspondiente. (En primera instancia a modo de prueba se utilizó el sistema de revelado Novolink Polymer Detection System de Leica. (Ver protocolo en anexo N° 12)

Los resultados fueron los siguientes:

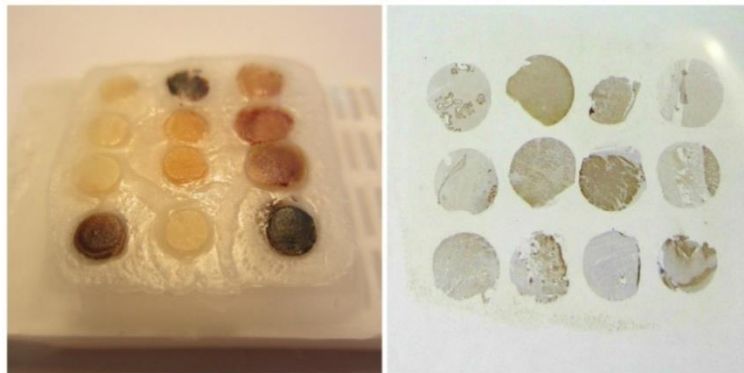
**TABLA N° 4.2** Resultados primera prueba IHQ.

	Vimentina	LCA	S100	CK(AE1-AE3)
<b>Próstata</b>	+/-	+	+	+
<b>Hígado</b>	+	-	+	+
<b>Melanoma</b>	+	+	+	+/-
<b>Osteosarcoma</b>	+	-	-	+
<b>Apéndice</b>	+	+	+	+
<b>Estómago</b>	+	+	+	+
<b>Ganglio axilar</b>	+	+	+	+
<b>I. Delgado</b>	+	+	+	+
<b>I. Grueso</b>	+	+	+/-	+
<b>Piel</b>	x	x	+	+
<b>Útero (miometrio)</b>	x	-	x	-
<b>Amígdala</b>	x	+	+	+

#### CAPITULO 4. RESULTADOS.

- Ausencia de marcación (-)
- Marcación de elementos tisulares inespecíficos (+/-)
- Marcación positiva (+)
- Desprendimiento del corte ( x )

Como se puede apreciar en la tabla anterior la mayoría de los anticuerpos presentan positividad para los diversos tejidos. Sin embargo, de acuerdo a lo observado por el patólogo, algunos de los tejidos presentaron una marcación poco específica (+/-), es decir, hubo tinción en diferentes zonas del tejido. Un ejemplo de ello es el caso de la próstata con el anticuerpo vimentina, en el que la marcación era generalizada en todas las estructuras incluso en las que no deberían presentar tinción, como lo son los alvéolos prostáticos.



**FIGURA N°4.2** *Primera matriz.* Constituida por doce tejidos diferentes y su posterior tinción IHQ en placa.

Por esta razón es que se realizó nuevamente la misma prueba, pero esta vez se empleo el kit de revelado Dako que se emplea para el HercepTest (ver protocolo en anexo N° 13) obteniendo los siguientes resultados:

## CAPITULO 4. RESULTADOS.

### 4.1.2.- Prueba N° 2.

TABLA N°4.3 *Resultados segunda prueba IHQ.*

	Vimentina	LCA	S100	CK(AE1-AE3)
<b>Próstata</b>	+	+	+	+
<b>Hígado</b>	+	-	X	+
<b>Melanoma</b>	+	+	+	+
<b>Osteosarcoma</b>	+	-	+	+
<b>Apéndice</b>	+	X	+	+
<b>Estómago</b>	+	+	+	+
<b>Ganglio</b>	+	+	+	+
<b>I. Delgado</b>	+	X	X	+
<b>I. Grueso</b>	+	+	X	+
<b>Piel</b>	+	+	X	+
<b>Útero (miometrio)</b>	+	-	-	-
<b>Amígdala</b>	+	+	+	+

En esta segunda prueba no se observó la marcación inespecífica para vimentina que presentaban la próstata y el del resto de tejidos, sin embargo, como se aprecia en la tabla en el caso del osteosarcoma hubo un cambio en la marcación con el anticuerpo S100 la cual pasó de ser negativa a positiva, como fue el único caso en el cual se presentó esta situación y no influye con la selección del control final, no lo consideramos. Por lo tanto habiendo resuelto el problema de la especificidad, se procedió a continuar con el estudio en cuestión.

Considerando los resultados obtenidos tanto en la primera como en la segunda prueba se lograron establecer las primeras matrices control correspondientes a CK

#### CAPITULO 4. RESULTADOS.

(AE1- AE3), LCA y S100. No obstante, en el caso de vimentina ninguno de los tejidos utilizados reunía las características como para ser empleado como un control negativo, ya que todos ellos presentaban una marcación bastante intensa.

Para este caso en particular se construyó una segunda matriz de prueba, en la cual varios de los tejidos que usamos fueron los mismos que la anterior, con el propósito de corroborar los resultados y también de ocuparlos como controles propiamente tales de la matriz a utilizar, en caso de cualquier problema de especificidad que pudiera presentar la inmunotinción. Incorporamos también dos tumores a los cuales les asignamos un número ya que no tenían diagnóstico, pues nos fueron facilitados desde la biblioteca del laboratorio de anatomía patológica. Su diagnóstico fue establecido mediante una tinción H-E.

TABLA N°4.4 *Resultados de la segunda micromatriz de prueba.*

<b>Tejido</b>	<b>Fuente</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Vimentina</b>
<b>Intestino Delgado</b>	Biopsia	Enteritis aguda inespecífica	+
<b>Intestino Grueso</b>	Biopsia	Rectitis aguda inespecífica	+
<b>Vejiga</b>	Autopsia	Normal	+
<b>Ortejo cutáneo</b>	Biopsia	Hemangioma capilar	+
<b>Útero</b>	Biopsia	AdenoCa. Endometrial	+
<b>Hígado</b>	Biopsia	Normal	+
<b>Mama</b>	Biopsia	Carcinoma canalicular infiltrante	+
<b>Estómago</b>	Biopsia	AdenoCa. Antral ulcerado	+
<b>Tumor 1</b>	Biopsia	Coriocarcinoma	-
<b>Ganglio metastásico</b>	Biopsia	Ca. Ductal Infiltrante	+
<b>Tumor 2</b>	Biopsia	Sarcoma	+

## CAPITULO 4. RESULTADOS.

Debido a que en el caso de los anticuerpos que conforman la línea primaria la intensidad de marcación no cumple un rol relevante, la selección de los controles positivos se realizó en base a la especificidad de la marcación, ausencia de background y también a la cantidad de muestras disponibles para cada uno de ellos. En el caso del control negativo la única condición es la ausencia absoluta de marcación.

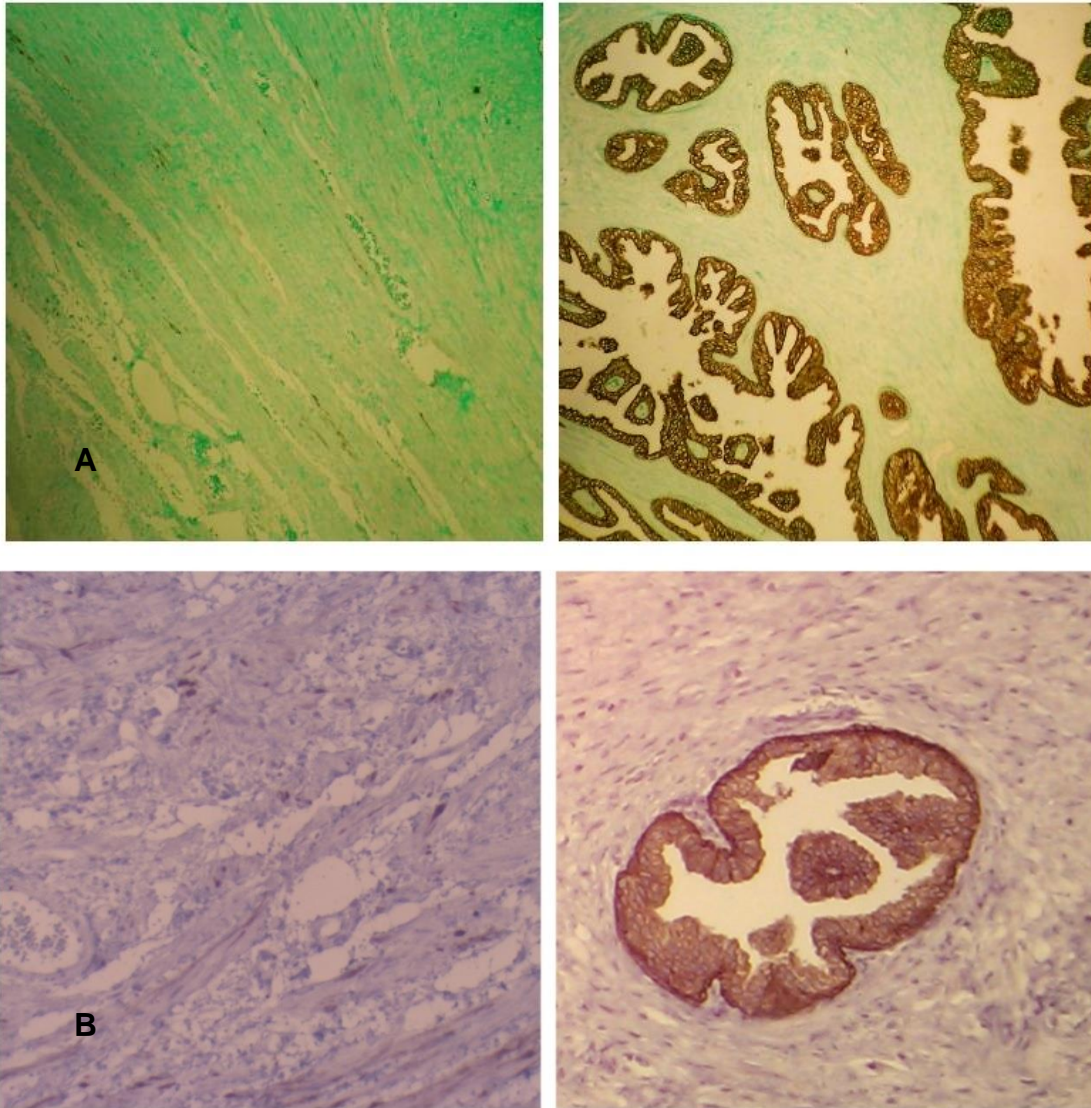
TABLA N°4.5 *Micromatrices Línea Primaria.*

<b>Anticuerpo</b>	<b>Control Positivo</b>	<b>Control Negativo</b>
<b>CK(AE1-AE3)</b>	Próstata	Miometrio
<b>S100</b>	Melanoma	Miometrio
<b>Vimentina</b>	Melanoma	Coriocarcinoma
<b>LCA/CD45</b>	Amígdala	Osteosarcoma Mamario

### **4.2.- EVALUACIÓN DE LAS MICROMATRICES FINALES CORRESPONDIENTES A LA LÍNEA PRIMARIA.**

A continuación, se presentan las fotografías de cada uno de los tejidos que conforman las diversas micromatrices tisulares.

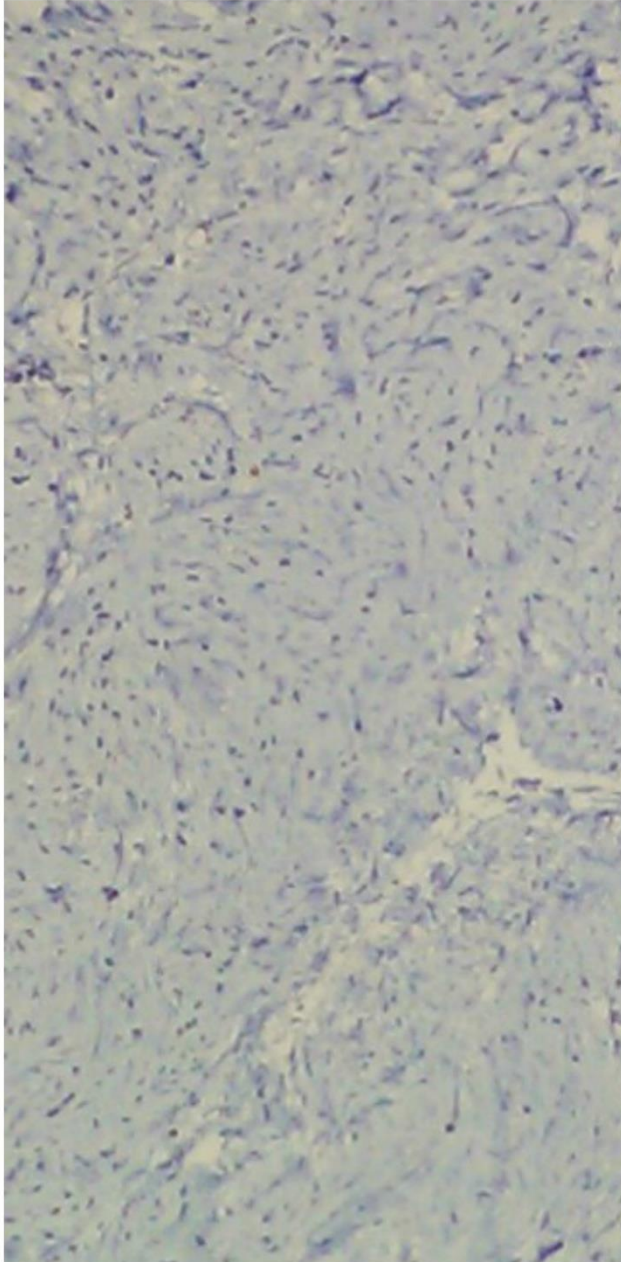
4.2.1 Matriz definitiva CK (AE1- AE3).



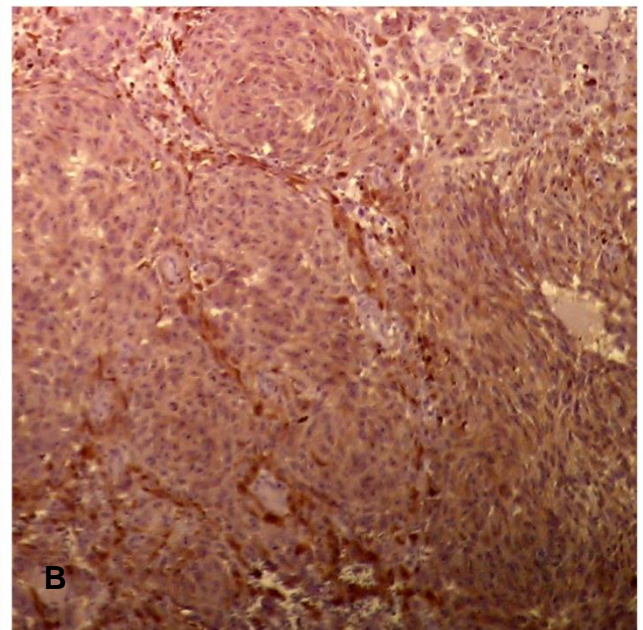
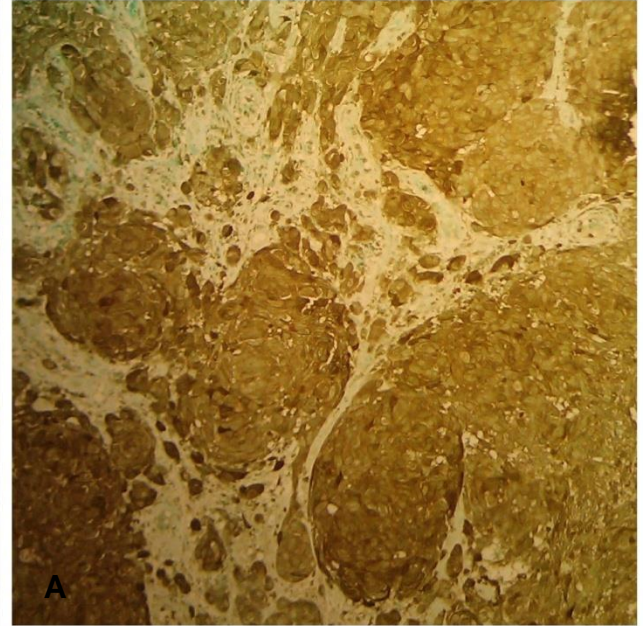
**FIGURA N°4.3** *Miometrio 10X* : **Control negativo**. Haces de células musculares lisas en diferentes orientaciones que conforman una red tridimensional junto con vasos y tejido de sostén. Ausencia de marcación IHQ. Contraste A) Verde luz B) Hematoxilina de Harris.

**FIGURA N°4.4** *Próstata 10X* : **Control positivo**. Hiperplasia prostática nodular. Intensa marcación de los alvéolos prostáticos en contraste con el tejido fibromuscular cuya marcación es nula.

4.2.2.- Matriz definitiva S100.

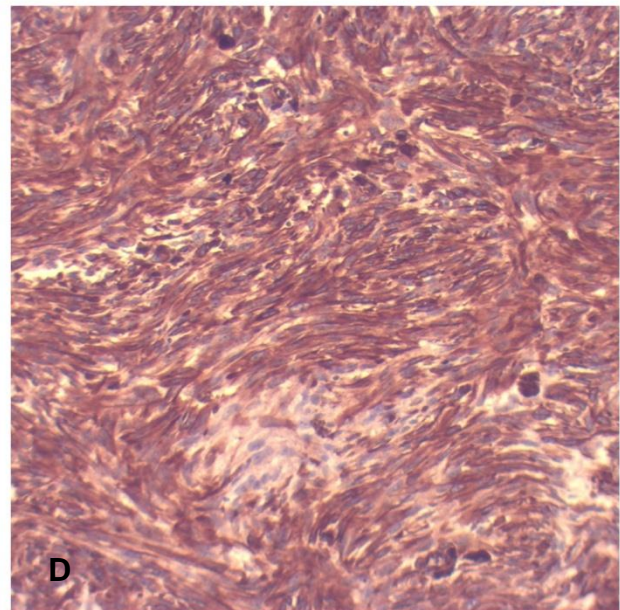
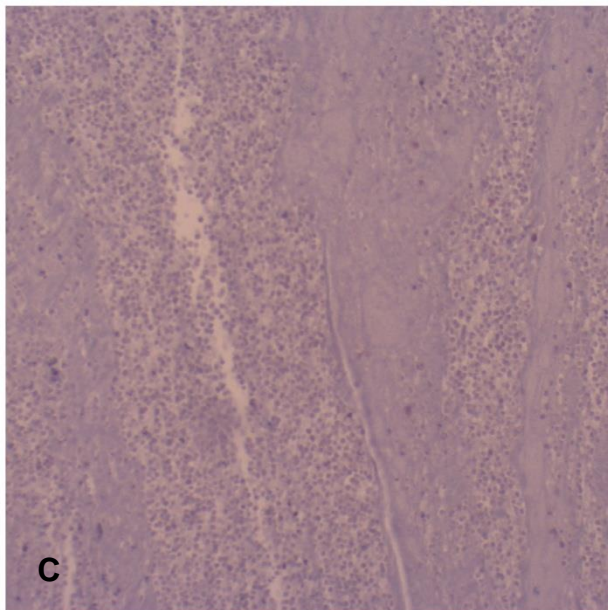
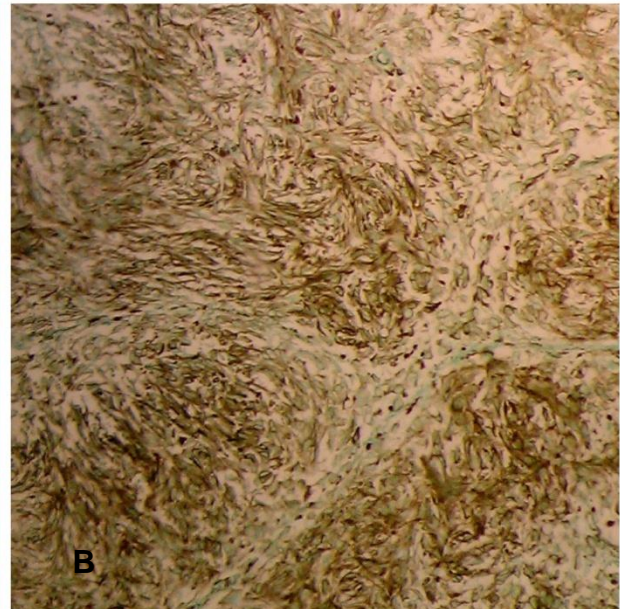
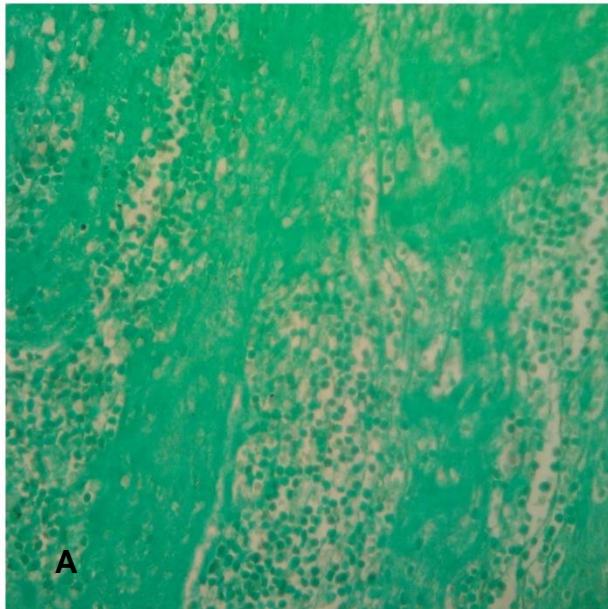


**FIGURA N°4.5** *Miometrio 10X. Control negativo.* Estroma conjuntivo denso que rodea los haces de fibras musculares lisas. Ausencia de marcación IHQ. Contraste Hematoxilina de Harris.



**FIGURA N°4.6** *Melanoma maligno 10X. Control positivo.* Tinción nuclear y citoplasmática característica para la proteína S100 en melanoma nodular. Contraste A) Verde Luz B) Hematoxilina de Harris.

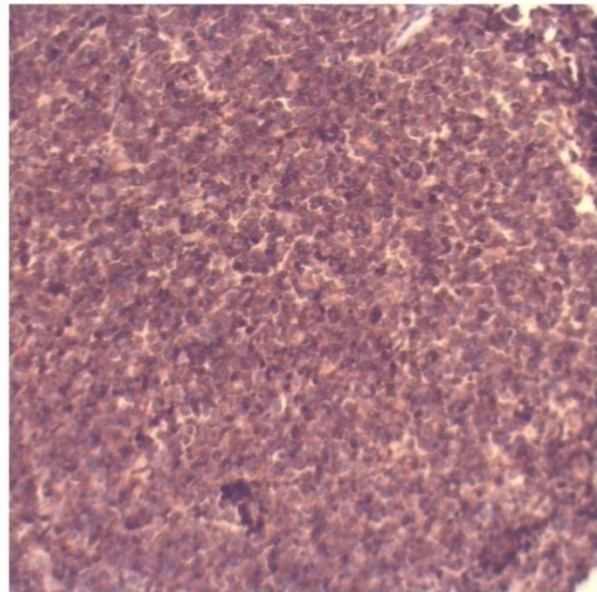
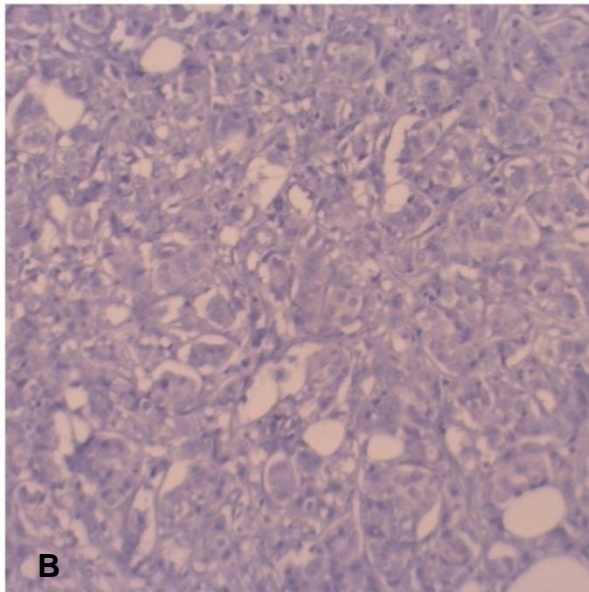
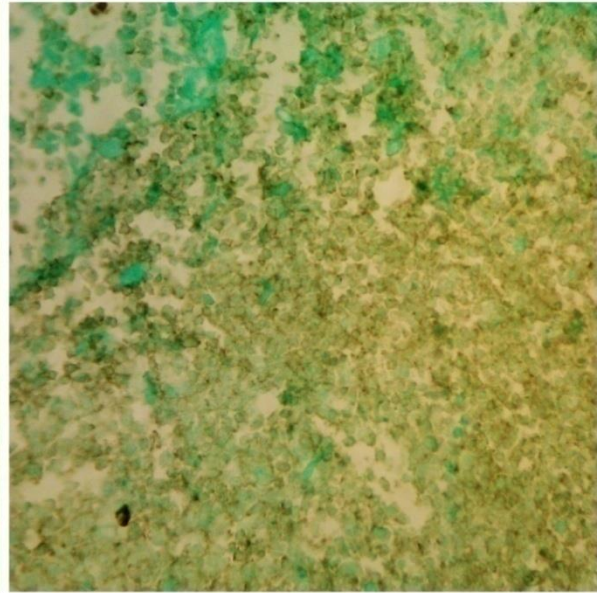
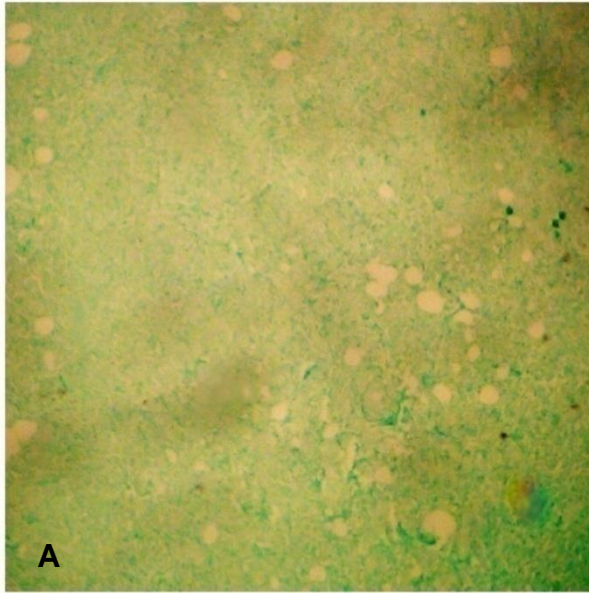
4.2.3.- Matriz definitiva VIM.



**FIGURA N°4.7** *Corioid carcinoma* 10X: **Control negativo.** Extensa área de necrosis tumoral con ausencia total de marcación. Contraste A) Verde luz. C) Hematoxilina de Harris

**FIGURA N° 4.8.** *Melanoma maligno nodular.* Imagen B) 10X imagen D) 40X **Control positivo.** Fuerte inmunotinción tanto en el citoplasma de las células tumorales como en las células mesenquimales que las rodean. Contraste B) Verde Luz D) Hematoxilina de Harris

4.2.4.- Matriz definitiva LCA.



**FIGURA N°4.9** *Osteosarcoma Mamario* 10X. Control negativo. Cúmulos de células tumorales malignas . Ausencia total de marcación. Contraste A) Verde Luz B) Hematoxilina de Harris.

**FIGURA N°4.10** *Amígdala palatina* 10X. **Control positivo.** intensa tinción de la membrana de las células linfoides propias de la amígdala

### 4.3.- ELABORACIÓN DE LAS MATRICES PARA LOS MARCADORES ÚTILES EN CÁNCER DE MAMA.

Como las muestras de cáncer de mama presentaban un estudio IHQ previo, en primera instancia se procedió a confeccionar las matrices sin realizar ningún tipo de prueba, a diferencia de los de la línea primaria, pues la clasificación de éstos ya había sido realizada por el patólogo. Por lo que solo se realizaron cortes con tinción de rutina para localizar las zonas de punción.

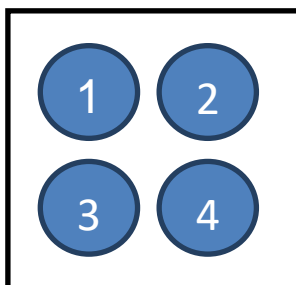
TABLA N°4.6 *Resultados estudio IHQ previo.*

Score	HT	RE	PGR
0	Ca. Ductal Infiltrante diferenciado grado I de Elston y Ellis.	<i>Ca. Ductal infiltrante escirroso bien diferenciado grado I de Elston y Ellis.</i>	<i>Ca. Ductal infiltrante escirroso bien diferenciado grado I de Elston y Ellis.</i>
1	<i>Ca. Ductal infiltrante escirroso bien diferenciado grado I de Elston y Ellis.</i>	Ca. Ductal infiltrante escirroso bien diferenciado grado I de Elston y Ellis.	Ca. Ductal infiltrante escirroso bien diferenciado grado I de Elston y Ellis.
2	No hay evidencia de Malignidad en la muestra. Pero presenta un control interno positivo.	Ca. Ductal Infiltrante diferenciado grado I de Elston y Ellis.	Ca. Ductal Infiltrante diferenciado grado I de Elston y Ellis

CAPITULO 4. RESULTADOS.

3	<i>Ca. Canalicular infiltrante infiltrante grado I Elston y Ellis.</i>	Ca. Ductal Infiltrante escirroso moderadamente diferenciado grado II de Elston y Ellis.	Ca. Ductal Infiltrante escirroso moderadamente diferenciado grado II de Elston y Ellis.
---	--	---	---

La confección de las matrices correspondientes a los receptores hormonales y HercepTest se realizó teniendo en consideración la intensidad de tinción de las células tumorales y continuidad de la membrana en el segundo caso, cuya clasificación se efectúa asignándole un número (Score) que va desde el 0 al +3, como se puede apreciar en la tabla anterior.

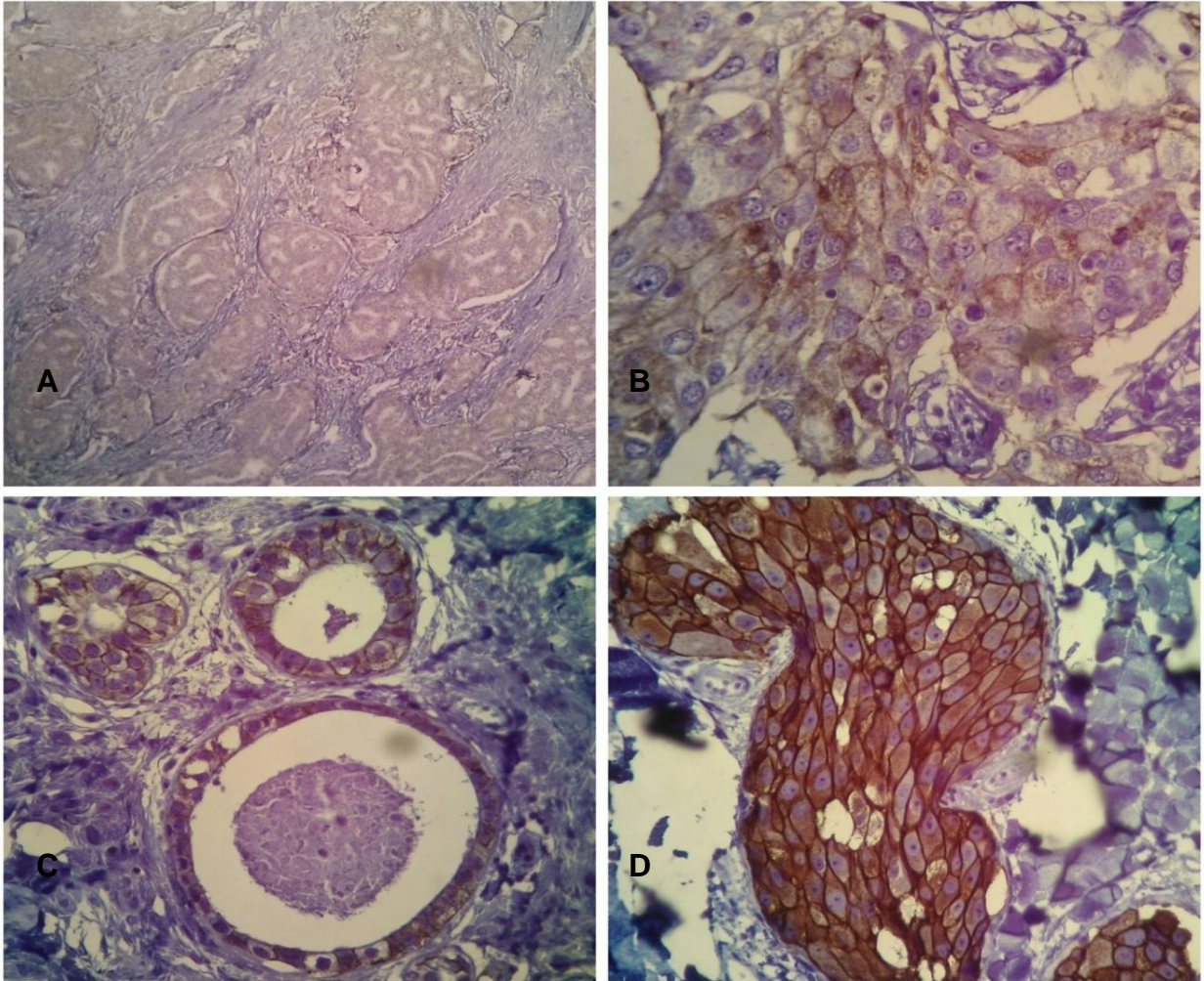


- 0: Nula reacción / control -
- +1: Intensidad baja de los elementos neoplásicos
- +2: Intensidad moderada de los elementos neoplásicos
- +3: Intensidad alta de los elementos neoplásicos

**Figura N° 4.11** *Distribución de intensidades.*

Una vez confeccionada la matriz y obtenidos los cortes se comprobó la marcación de cada cilindro de tejido sometiendo la matriz al protocolo respectivo para cada anticuerpo. (Ver anexo N° 14)

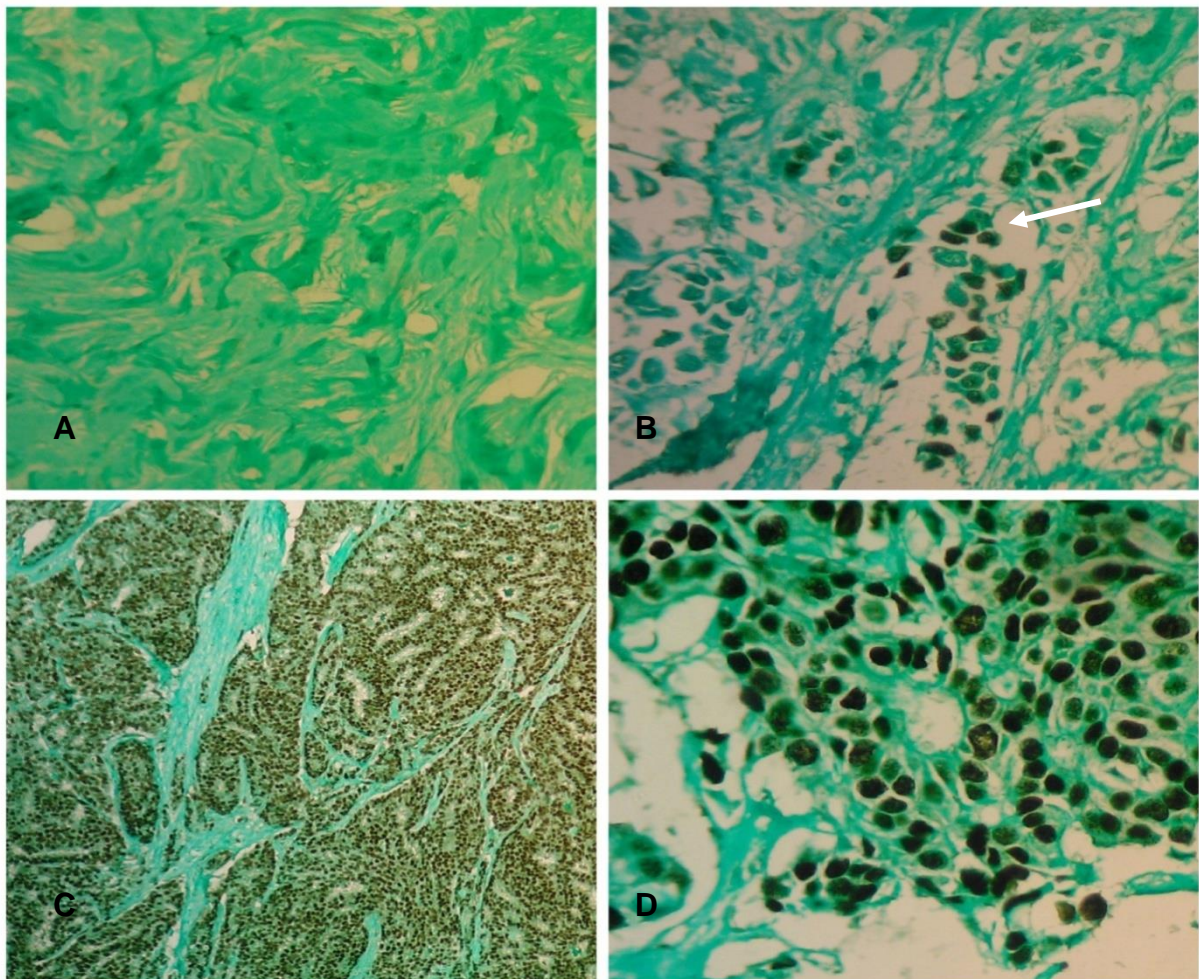
4.3.1.- Resultados HercepTest.



**FIGURA N°4.12** Resultados marcación HercepTest. A) Score 0 (10X) y 1 (B) (40x) **Negativos** para la expresión de la proteína HER2 C) Score 2: Tinción débil , esta es considerada "**ambigua**", puesto que como se observa en la fotografía no existe uniformidad en el patrón de marcación el cual además es de una intensidad muy baja (40X). D) Score 3: Tinción de membrana intensa y uniforme ( > 30% de las células). **Positiva** para la sobre-expresión de la proteína HER2 (40X).

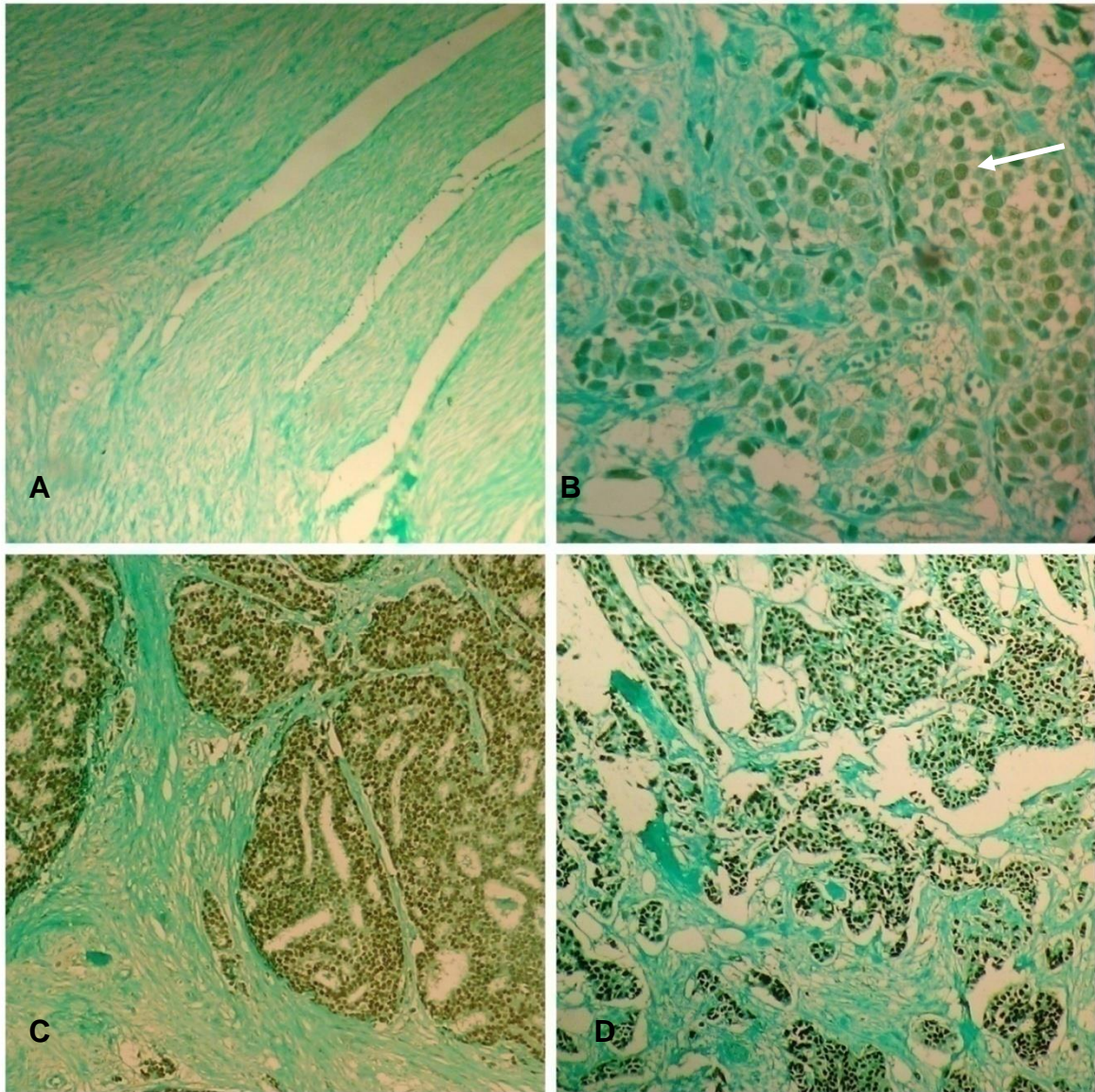
**4.3.2.- Resultados Receptores Hormonales :**

*4.3.2.1.-Progesterona.*



**FIGURA N°4.13** Resultados receptor progesterona: **Carcinoma ductal infiltrante de la mama, diversas intensidades.** A) Score 0: Fibrosis tisular, **nula** marcación B) Score 1: Pequeña agrupación de células tumorales cuyo núcleo presenta una intensidad de marcación **baja** (40X) C) Score 2: Tumoración de bordes infiltrantes (10X), compuesta por nidos sólidos y células aisladas que presentan una marcación nuclear de **moderada** intensidad (10X). D) Score 3: Nido de células tumorales que infiltran el estroma fibroso, Presentan una intensidad de marcación **alta** (40X).

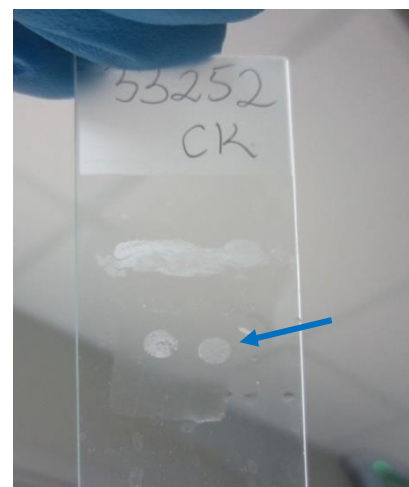
4.3.2.2.- Estrógeno.



**FIGURA N° 4.14** Resultados receptor estrógeno: **Carcinoma ductal infiltrante de la mama** **varias intensidades.** A) Score 0 : Extensa área de fibrosis tisular con **nula** marcación 10X. B) Score 1: Nidos de células tumorales cuya marcación nuclear es de **baja** intensidad 40X. C) Score 2: Tumoración de bordes infiltrantes 10X, compuesta por nidos sólidos que presentan una marcación nuclear de **moderada** intensidad. D) Score 3: abundantes nidos y cordones de células tumorales. Estas se encuentran muy compactadas y presentan un núcleo cuya intensidad de marcación es **alta** 10X.

## CAPITULO 4. RESULTADOS.

Una vez que las matrices han sido terminadas procedemos a aplicar las secciones de éstas de manera conjunta a los tejidos que se encuentran en estudio, en la medida que van llegando al Servicio.



**FIGURA N° 4.15** Placa que contiene una micromatriz control para el marcador CK (AE1-AE3) paralela al tejido en estudio.

### 4.4.- STOCK DE MICROMATRICES CONTROL.

Puesto a que obtuvimos resultados satisfactorios, en cuanto a lo que marcación respecta procedimos a estimar el número mínimo de micromatrices necesarias para cubrir la carga anual de biopsias que requieren estudio IHQ.

El número de casos en los cuales se emplearon procedimientos inmunohistoquímicos durante los últimos años se obtuvo a partir del registro “Estadísticas mensuales y Semanales” del laboratorio de anatomía patológica del Hospital Dr. Gustavo Fricke.

Desde 2007 el Servicio recibe las muestras y procesa las solicitudes de exámenes de inmunohistoquímica, siendo el análisis de antígenos relacionado con patología mamaria, la principal tarea. En el año 2011 se sumaron los casos AUGE para análisis de HercepTest provenientes del Hospital de Quilpué y en el mes de abril del año

CAPITULO 4. RESULTADOS.

2013 se comenzó a implementar la línea primaria (S100, VIM, CK AE1-AE3, LCA) como prestaciones que realiza el Servicio en cuanto al área de inmunohistoquímica.

En el cuadro siguiente se hace un desglose general de los casos totales realizados por año desde 2007 a 2012.

TABLA N°4.7 Casos totales IHQ 2007-2012.

	Nº PACIENTES	Nº Determinaciones RE / RP / HERCEPTEST	Nº Determinaciones Primera línea	total determinaciones por año	
<b>AÑO 2007</b>	89	222	no disponible	<b>222</b>	
<b>AÑO 2008</b>	162	462	no disponible	<b>462</b>	
<b>AÑO 2009</b>	120	346	no disponible	<b>346</b>	
<b>AÑO 2010</b>	141	414	no disponible	<b>414</b>	
<b>AÑO 2011</b>	Fricke 166 Hosp. Quilpue 19 total 185	Fricke = 452 Hosp. Quilpue = 19 total =	471	no disponible	<b>471</b>
<b>AÑO 2012 hasta agosto</b>	Fricke = 114 Hosp. Quilpue = 45 total = 152	Fricke = 314 Hosp. Quilpue = 45 total = 359	(disponible desde junio 2012) 22	<b>381</b>	

Fuente : *Estadísticas mensuales y semanales*. Servicio Anatomía Patológica Hospital Dr. Gustavo Fricke.

Casos Actualizados 2012

<b>AÑO 2012</b>	<b>159</b>	<b>477</b>	<b>45</b>	<b>45</b>	<b>522</b>
-----------------	------------	------------	-----------	-----------	------------

Casos realizados hasta julio de 2013 relacionados a la identificación de antígenos de la “línea primaria”.

## CAPITULO 4. RESULTADOS.

1ª LINEA IHQ
71

Con proyecciones que llegarían al 25% en el incremento de las solicitudes de prestaciones, superando los 700 casos al año.

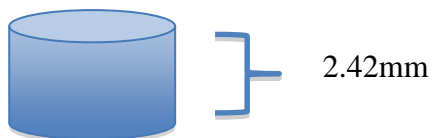
2013	PACIENTES FRICKE	EXAMENES MAMA	1ª LINEA IHQ	PACIENTES QUILPUE	EXAMENES HERCEPTEST	TOTAL EXAMENES
ENERO- JULIO	143	354	71	37	37	462

Fuente : *Estadísticas mensuales y semanales*. Servicio Anatomía Patológica Hospital Dr. Gustavo Fricke.

Este número de casos realizados año a año en el Servicio entrega información importante, ya que nos muestra que, producto de la carga de trabajo tan alta se requiere de constante supervisión de los diferentes casos y su interpretación diagnóstica. Por lo tanto la utilización de controles que garanticen la calidad de cada uno de estos diagnósticos se torna relevante, sobre todo en lo que refiere a estandarización y optimización del protocolo IHQ.

Además, permite hacer una estimación de la cantidad adecuada de tacos control que se requerirán por cada tipo de estudio IHQ, con la finalidad de mantener un stock suficiente para ir supliendo las necesidades de llevar un control cada vez que una de, estas técnicas se lleve a cabo.

Grosor de las muestras:



En promedio, el grosor de las muestras recolectadas fue de 2.42 mm de espesor, fue importante conocer este dato ya que los cortes que se realizan en inmunohistoquímica fluctúan entre los 4 a 5 micrones.

## CAPITULO 4. RESULTADOS.

Si el promedio de cada tejido alcanza los 2420 micrones, al estar incluido en parafina el numero de cortes posibles llegaría a los 605 y 484 cortes respectivamente (sin contar con la pérdida en el desgaste o en la manipulación con el micrótopo), al analizar la estadística del año 2012, el número de estudios alcanzó los 522 y el 2013 por estimaciones aumentarían a los 700, por lo que el número mínimo satisfactorio de “tacos control” seria de dos, por cada tipo de estudio (HT/RE/RP).

### **4.5.- EVALUACIÓN DE LAS MICROMATRICES CONTROL.**

Al culminar los diversos ensayos, los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un estudio que buscaba contrastar los arrojados tras la utilización del control.

El estudio contó con la participación y ayuda de dos médicos patólogos (uno de ellos jefe del servicio de anatomía patológica) y cuatro tecnólogos que se desempeñan en IHQ, quienes asignaron valor diagnóstico e interpretativo (score) al conjunto de muestras problema.

Este grupo de profesionales comprende al staff completo del servicio de anatomía patológica del Hospital Gustavo Fricke.

Es importante mencionar que para esta evaluación no se incluirá la línea primaria, puesto que en ésta sólo importa la positividad o negatividad de la muestra, sin considerar la intensidad de marcación; Por lo que solamente se tomaron en cuenta aquellos casos en donde se utilizaron controles para cáncer de mama (HR/RE/PGR), donde existe una posible mayor diferencia interpretativa entre los observadores.

## CAPITULO 4. RESULTADOS.

N° de placa
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

**FIGURA. N° 4.16** Número de casos problema. Color azul corresponde a HT, rojo a PGR y verde a E.

En primera instancia se les solicitó a los profesionales del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Dr. Gustavo Fricke encargados de realizar la interpretación y técnica habitualmente, que observaran y calificaran una serie de placas (30 en total) que además de incluir el caso problema, incluían además la micromatriz control. (Ver evaluación en anexo N° 15)

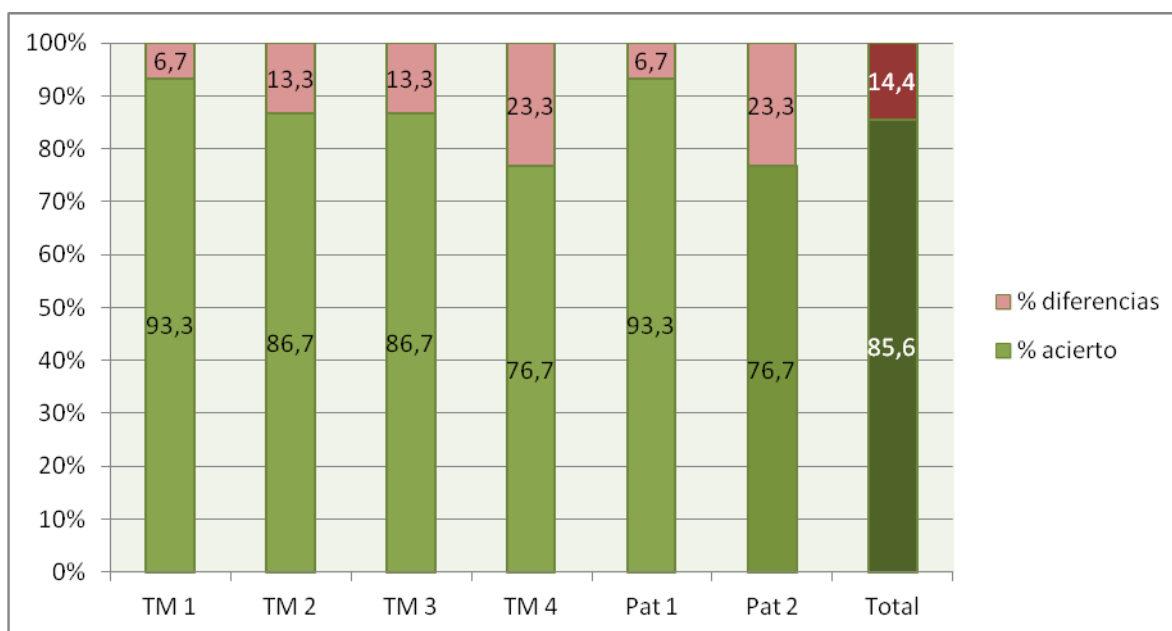
El ejercicio constaba de dos partes:

- Observación del tejido problema y asignación de score **sin previa visualización** del control.
- Observación, **primeramente**, de la matriz control, para luego volver a observar el tejido problema y asignar nuevamente el score.

A cada uno de los casos (placas) se le asignó un número, de tal manera que las intensidades de marcación obtenidas tras la evaluación pudieran ser ordenadas de acuerdo a cada caso, esto con el propósito de permitir un orden al momento de realizar el cálculo estadístico.

## CAPITULO 4. RESULTADOS.

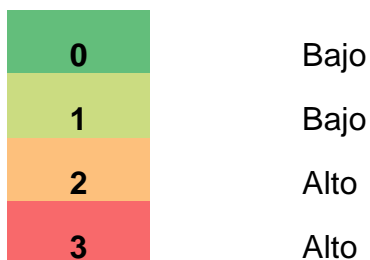
El número total de datos recopilados a partir de la interpretación los profesionales fue de 180, se compararon los resultados obtenidos por cada uno de ellos antes y después de utilizar el control, es decir, resultados c/control vs s/control. A partir de esto se desprende que 154 fueron aciertos y 26 diferencias. (Ver compilado detallado de datos en anexo N° 16)



**FIGURA N° 4.17** Gráfico observación por profesionales. *Porcentajes de aciertos y diferencias.*

En segunda instancia empleando este mismo conjunto de datos, pero esta vez teniendo como referencia solamente las diferencias entre score sin control y score con control que pasaron de leve a alta intensidad o viceversa, se logró establecer el porcentaje de resultados potencialmente relevantes en un posible cambio en el proceder tras el diagnóstico IHQ y/o tratamiento. (Ver detalle en anexo N° 17)

## CAPITULO 4. RESULTADOS.

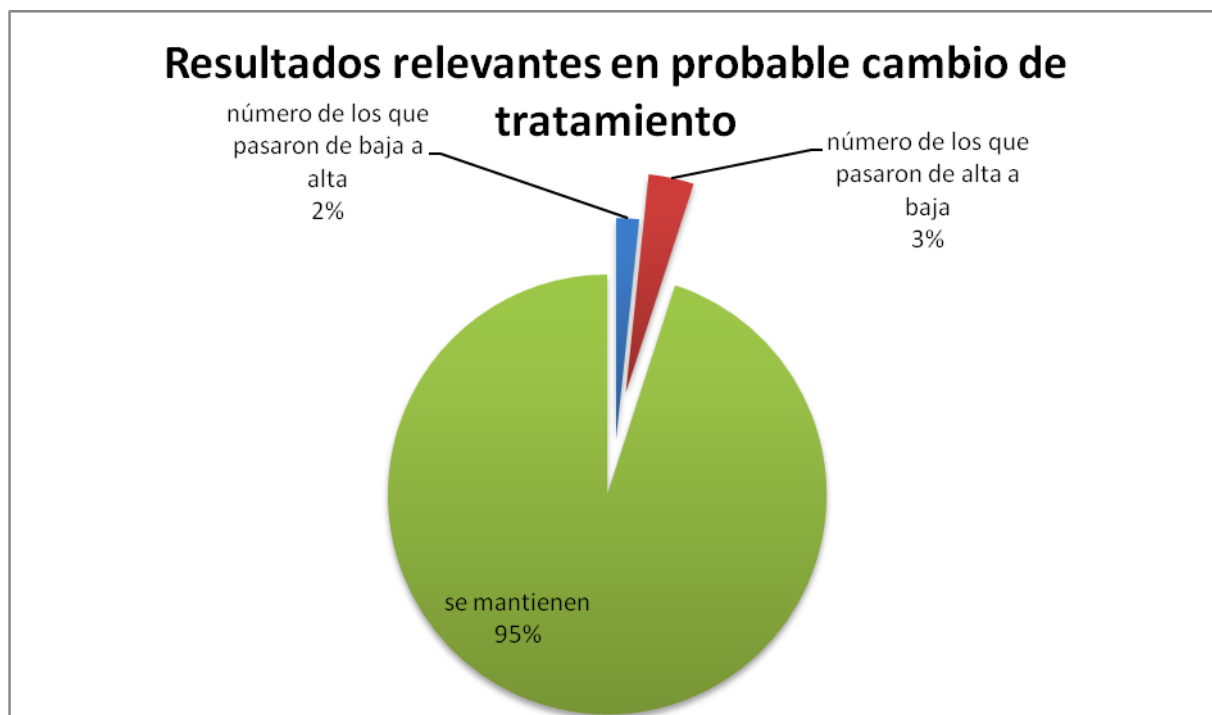


**FIGURA N°4.18** *Intensidades.* Se consideran cambios relevantes aquellos que pasen de una intensidad baja a una alta o viceversa.

**TABLA N°4.8** *Casos relevantes de cambio de intensidad o diferencias de score*

intensidad baja a alta	3	2%
intensidad alta a baja	6	3%
mantienen score	171	95%
<b>Pares totales</b>	<b>180</b>	<b>100%</b>

Un 5% del total de los casos presentó variaciones, entre los cuales, un 2% pasó a un aumento de intensidad, de leve a mayor y un 3%, en cambio, disminuyó en intensidad, pasando de alta a leve.



**FIGURA N° 4.19** Resultados relevantes en probable cambio de tratamiento.

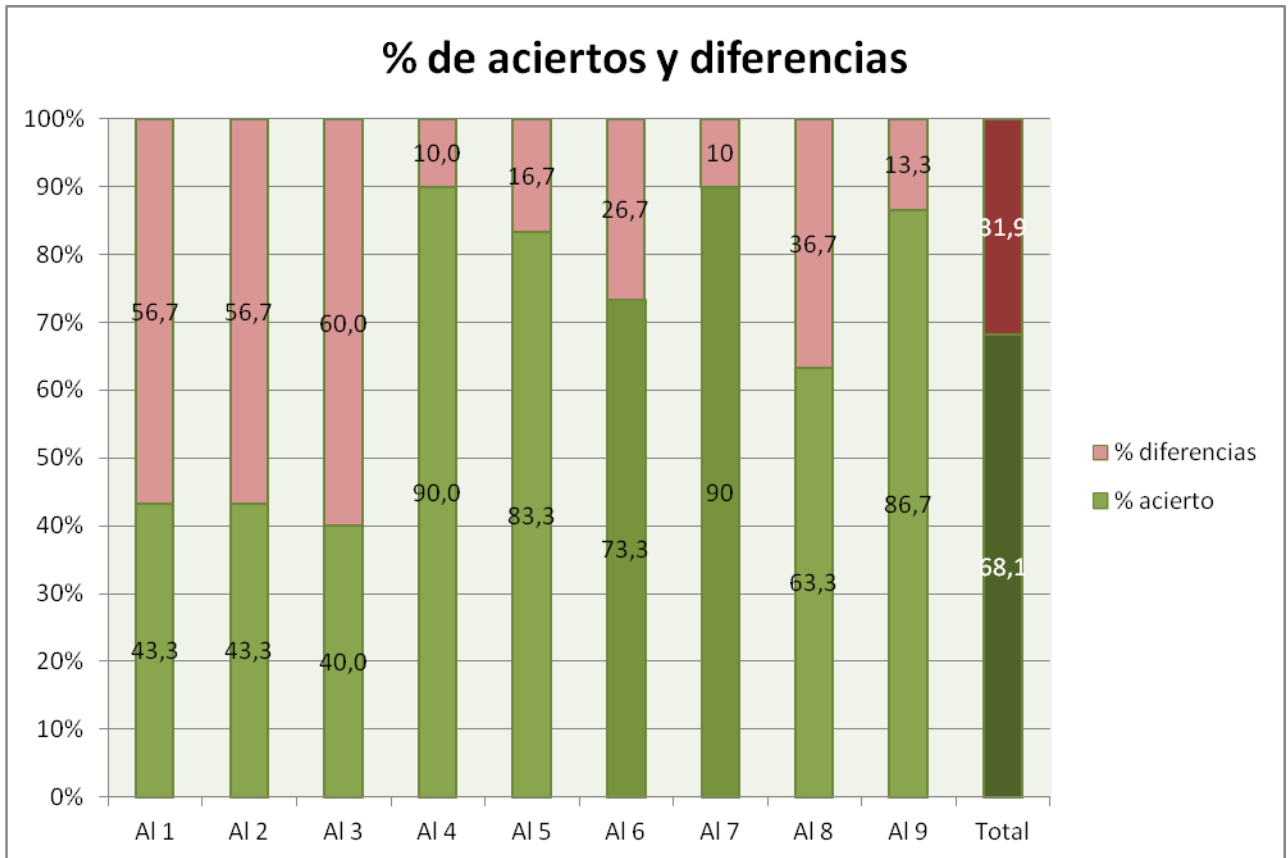
#### 4.5.1.- Evaluación de las micromatrices con alumnos de Tecnología Médica.

El grupo se conformó por alumnos de 4° y 5° año de la especialidad Morfofisiopatología y Citodiagnóstico de la Universidad de Valparaíso.

En el caso particular de los alumnos de cuarto año se exigió haber aprobado el ramo de inmunohistoquímica para poder participar del estudio.

## CAPITULO 4. RESULTADOS.

Nueve alumnos participaron en el proceso de evaluación de las placas, generando 270 datos, de los cuales 184 eran aciertos y 86 diferencias. (Ver anexo N° 18) Lo que porcentualmente se puede apreciar en el siguiente gráfico.



**FIGURA N° 4.20** Gráfico alumnos. Porcentaje de aciertos y diferencias.

No se realizó el cálculo de relevancia en posible cambio de tratamiento de sus resultados puesto que en este caso no tiene significancia diagnóstica.

## **CAPÍTULO 5:**

### **DISCUSIÓN**

Los tissue microarrays son producidos a partir de la relocalización de secciones cilíndricas específicas provenientes de diversos bloques de parafina. De esta manera muestras de tejido de diversos pacientes pueden ser ubicadas ordenadamente en un mismo portaobjetos. Esto se realiza a partir del uso de una aguja o punch de biopsias mediante el cual se obtienen estos cilindros de tejido o "cores", que posteriormente son ubicados al interior de la matriz receptora.

Puesto que el material es previamente fijado en formalina y embebido en parafina, las matrices de tejido son susceptibles a una amplia gama de técnicas, incluyendo tinciones histoquímicas, inmunológicas, ya sea con visualización cromogénica o fluorescente, e incluso a hibridación in situ (ISH incluyendo tanto ARNm y FISH).

Respecto a la fijación, representa una ventaja el hecho de que los casos problema y los tejidos que sirvieron como base para la micromatriz, fueran recolectados de un mismo laboratorio, pues el proceso de fijación es exactamente el mismo en todos los casos, lo que elimina este paso como una posible variable dentro del proceso.

Las ventajas de la utilización de esta técnica están dirigidas principalmente a que cada muestra de tejido que conforma el microarray es tratada de la misma manera frente a la aplicación de un determinado protocolo, puesto que las concentraciones de reactivos son idénticas para cada caso, así como también los tiempos de incubación, temperaturas, condiciones de lavado, y por supuesto la recuperación de antígenos, según sea el caso.

## CAPITULO 5. DISCUSIÓN.

Considerando las particulares ventajas de esta técnica, principalmente en lo que se trata de uniformidad al momento de llevar a cabo protocolos de diferente índole, pues se incluyen varias muestras en un mismo taco, es que esta investigación se enfocó principalmente en la estandarización de las técnicas inmunohistoquímicas a partir de la creación de una serie de controles que son incorporados a cada muestra de tejido que llega al servicio de anatomía patológica según corresponda.

La implementación de este grupo de controles tanto en los marcadores de utilidad en cáncer de mamas, como en los de primera línea se fundamenta en la falta de objetividad al momento de diagnóstico sobre todo en el caso de receptores hormonales y HercepTest puesto que su valoración, como ya fue mencionado con anterioridad, requiere asignar un score el cual es otorgado de acuerdo a la apreciación del observador de turno (Patólogos, Tecnólogos).

Paralelamente su utilización favorece también la validez del protocolo ya que "sirven como un control de calidad " (Moch H et al., 2001), puesto que diferentes operadores deberían obtener los mismos resultados. Esto también incluye el descarte de falsos positivos/ negativos producto de alguna falla humana en la realización de la técnica o malas condiciones de alguno de los reactivos a utilizar.

En general la confección de estas matrices es bastante simple y no se requieren de mayores recursos. En la realización de este trabajo se utilizaron materiales reciclados: el punch fue obtenido del Departamento de Dermatología tras ser usado para la toma de una biopsia dérmica, su interior fue modificado de tal manera que fuera posible introducir una varilla que permitiera obtener los cilindros y las matrices receptoras fueron elaboradas de forma manual. Por lo expuesto queda claro que no se requiere invertir grandes cantidades de recursos en la compra de kits modernos para la implementación de esta técnica, por lo que cualquier laboratorio público podría fácilmente generar sus propias matrices control de acuerdo a sus prioridades en diagnóstico y la variedad de anticuerpos que puedan poseer.

## CAPITULO 5. DISCUSIÓN.

Pese a los buenos resultados que arrojó el uso de la matriz, la facilidad con la cual se elabora y lo económico del método, existen algunas dificultades que es necesario tener en cuenta. Lo primero es la dificultad para recopilar las muestras, que se acota a lo que llegue al Servicio, si bien en el caso de la línea primaria no hubo mayor dificultad, la búsqueda de tejido mamario que arrojara diversas intensidades fue sin duda un gran problema al momento de dejar un stock, puesto que el número de casos de patología mamaria que llegaban al Servicio era demasiado bajo, y la mayoría de las veces la muestra requería ser procesada por completo debido a que la lesión era muy pequeña, por lo que no habían desechos que nos permitieran obtener material.

Otro problema es el desprendimiento. Al comenzar la investigación se recopilaron una serie de muestras sin importar la constitución de éstas, es decir, muestras con grandes áreas necróticas o con gran contenido adiposo, sobre todo en el caso de las mamas, lo que posteriormente trajo consigo el constante desprendimiento de los cortes tras la recuperación antigénica.

Además de este problema, el desgaste y la poca duración del primer stock de tacos control también es algo importante de mencionar. Debido a que son muestras pequeñas y su grosor es menor, su manejo debe ser cuidadoso, los constantes cambios de micrótopo, por ende, ángulo de corte, al momento de cortar la matriz provocaron que ésta durara menos de lo estimado producto del constante desgaste de la muestra ya que los cortes se realizaban a medida que se solicitaba el estudio. Por lo que se propone que se utilice siempre el mismo micrótopo para efectuar los cortes.

## CAPITULO 5. DISCUSIÓN.

Como solución a la dificultad para recopilar las muestras, este laboratorio cuenta con un almacén de desechos, por lo que cada 5 años se van eliminando tacos antiguos, de esta manera es que se obtuvieron grandes cantidades de muestras mamarias ya incluidas, las cuales en algunos casos su diagnóstico aún estaba en el sistema por lo que resultó más sencillo armar la micromatriz, respecto de los casos que no estaban (la mayoría) se confeccionaron varias matrices de hasta 24 tejidos en un mismo taco, las cuales fueron sometidas a IHQ para determinar la intensidad de marcación de cada cilindro y así confeccionar nuevas matrices control.

Para el problema de desprendimiento se recomienda dejar secar las placas durante 24 horas a temperatura ambiente, utilizar portas con carga, o también luego del periodo de secado a T° ambiente dejarlo en la estufa durante 30 minutos (con excepción de HT), esto favorece la adherencia del tejido y disminuye hasta cierto grado el desprendimiento, y por su puesto recolectar material de calidad con el menor contenido de grasa posible.

El desgaste rápido de las muestras es solucionable realizando múltiples cortes de la micromatriz de una sola vez que posteriormente son almacenados en el refrigerador a 4°C , para ser utilizados cuando sea necesario. Estos tienen una duración aproximada de dos meses, luego de este periodo se recomienda, utilizar cortes nuevos.

En la práctica, la favorable implementación de estas matrices se ve sustentada por los porcentajes obtenidos tras la evaluación.

## CAPITULO 5. DISCUSIÓN.

Si bien en primera instancia se esperaba que hubiese diferencias entre la interpretación de los profesionales entre sí, fue un hallazgo el hecho de que existieran también diferencias entre su propia interpretación tras el uso del control, es decir, la visualización previa del control provocó que en algunos casos los observadores cambiaran el score asignado en primera instancia. Esto se fundamenta en que el control funciona como una herramienta guía que los conduce hacia una mayor precisión diagnóstica al ser más objetiva.

Continuando con la evaluación de los profesionales, si se observan con detenimiento las tablas que contienen el conjunto de datos interpretativos (Ver anexo 16), se aprecia que en la mayoría de los casos el control provocó un aumento en el número de diferencias, esto se traduce en que la visualización previa de este sí induce cambios en la asignación del score, pues ya no están trabajando "a ciegas", lo que a futuro podría conducirlos en conjunto a una mayor uniformidad de sus diagnósticos entre sí.

En cuanto al rol de la micromatriz control en los resultados, que podrían ser relevantes en un posible cambio de proceder clínico, si bien el porcentaje obtenido es numéricamente bajo (5%), clínicamente hablando es todo lo contrario, esto debido a que hay que considerar que detrás de este porcentaje existen pacientes cuyo diagnóstico podría ser mucho más preciso, por esta misma razón es que no se considera que este porcentaje sea menor.

A partir de estos resultados se decidió llevar a cabo la prueba en alumnos donde la experiencia interpretativa es mucho menor, por lo que el rol de la micromatriz sería fundamental al momento de asignar el score. Afirmación que los resultados apoyan a cabalidad pues en ellos la medición se efectuó solamente teniendo en cuenta el control como patrón, es decir, si hubo o no diferencias diagnósticas antes y después de usarlo. Obteniendo cifras elevadas, (de los 270 datos recopilados 86 fueron diferencias) resultando en un porcentaje mucho mayor al de los profesionales 31,9 lo que era bastante esperado por la poca experiencia de los observadores. Sin embargo, a partir de esta

## CAPITULO 5. DISCUSIÓN.

cifra se puede desprender que la visualización primaria del control induce un cambio en el score que habían asignado antes de mirarlo (Ver anexo 18), acercándolos más al diagnóstico original de la biopsia empleada. (Ver Anexo 16)

Existen numerosos estudios, tanto del análisis inmunohistoquímico como de la técnica de los tissue microarrays. Sin embargo, respecto a los resultados obtenidos en el presente estudio se logró establecer una concordancia en relación a la presencia de variaciones que existen entre los diagnósticos (score) de un mismo observador para una misma muestra vista en diferentes ocasiones lo que se conoce como "variabilidad intra-observador" (J Martínez et al.,2005).

En conjunto a sus colaboradores mediante un estudio comparativo entre la cuantificación IHQ manual versus la cuantificación realizada a partir de un software de imágenes, determinaron que esta variabilidad intra-observador es especialmente significativa cuando la lectura u observación se efectúa sobre técnicas que identifican proteínas de ubicación citoplasmática y de membrana.

Lo que se desprende del estudio anteriormente mencionado es que la variación interpretativa intra-observador si bien quizás no es algo que se espera, está presente, al igual que en este estudio.

Dentro de las proyecciones de esta investigación, gracias a los buenos resultados obtenidos, es que una de las propuestas es implementar esta metodología como una herramienta pedagógica puesto que actúa como guía diagnóstico/interpretativa contribuyendo al aprendizaje del ojo inexperto, en este caso los alumnos. Además de esto también es la idea fomentar el uso de controles en todas las técnicas empleadas en el laboratorio no tan solo la IHQ, particularmente se propone también realizar pruebas futuras que permitan incorporar este tipo de controles a la Histoquímica.

## **CAPITULO 6**

### **CONCLUSIÓN.**

Los avances en la inmunohistoquímica han permitido dilucidar aquellos casos que resultan complejos al diagnóstico morfológico y dentro de este ámbito es que la aplicación de controles significó un avance importante en la optimización de los protocolos inmunohistoquímicos, en su monitorización y en la evaluación de los distintos anticuerpos utilizados para determinar aquellas patologías que se presentaron en el servicio de anatomía patológica y que requerían de un estudio de antígenos específicos.

La utilización de controles se hizo especialmente importante para asegurar que, a la hora de realizar un estudio, como la determinación de la estirpe celular con la “línea primaria” o la presencia o ausencia de receptores estrogénicos en patología mamaria, las variables externas que pudiesen generar algún tipo de falencia en la interpretación final se reduzcan

Gracias al trabajo realizado se lograron obtener controles para los distintos estudios, tanto en la línea primaria, donde se buscaba una marcación positiva y negativa, como para el estudio de patología mamaria, donde la búsqueda fue de mayor complejidad debido a los problemas mencionados en las páginas previas a este capítulo. A pesar de esto, se logró obtener de manera satisfactoria variados tejidos con sus respectivas intensidades de marcación nuclear y citoplasmática para receptores y Hercept según correspondía.

Ya en funcionamiento la matriz fue versátil. Se pudo buscar la más correcta localización de los cilindros en el bloque de parafina para obtener el mejor corte que permitió ubicar el control lo más cercano al tejido en estudio, y a la vez utilizando la misma “gota”, con el consecuente ahorro de reactivo, lo que también nos aseguró que ambos cortes recibían el mismo tratamiento en el procedimiento inmunohistoquímico, eliminando las variables de manipulación en una posible identificación de antígenos falso positivo o negativo.

El desarrollo de la matriz resultó ser simple, pudiendo hacerse en un corto tiempo y utilizando los implementos presentes en el laboratorio de anatomía patología del Hospital Gustavo Fricke. Posterior a la determinación y obtención de los mejores controles, se comenzó a elaborar un número de tacos control suficiente para mantenerlos almacenados y así se utilizaron cada vez que un caso problema, tanto de línea primaria como de patología mamaria, llegaban al servicio.

El análisis de la interpretación se logró con la aplicación de un cuestionario y un pool de placas. Estas fueron visualizadas por un grupo de profesionales y otro grupo de alumnos por separado. Fueron evaluados solamente con los casos de patología mamaria, en donde existía esta asociación de criterios de la marcación.

Al obtener los resultados de la evaluación que buscaba comparar el análisis visual del tejido con y sin el control, obtuvimos que esta variación fue positiva e incidía potencialmente en los cambios de la observación interpretativa, lo que nos lleva a concluir que la matriz control que acompaña al tejido en estudio fuese valorada como un medio de apoyo visual objetivo en la identificación de las diferentes intensidades (Score), dentro del tejido problema.

El control demostró ser útil al momento de objetivar la interpretación, ya que posee las características suficientes como para llegar transformarse en una buena herramienta de evaluación en el ámbito del laboratorio propiamente tal, permitiendo analizar el desempeño de la técnica IHQ, evaluar la calidad de los reactivos y su operatividad, dimensionar las variaciones interpretativas que puedan existir en un mismo equipo de trabajo y poder así aunar esfuerzos futuros que se dirijan a homogenizar el diagnóstico en los casos donde existan variaciones importantes.

Fuera del laboratorio se perfila como un método didáctico y evaluativo para alumnos que estén cursando la mención, con el fin de dar apoyo en el criterio diagnóstico en formación.

Al resumir el trabajo realizado, las micromatrices de control elaboradas demostraron ser un implemento de fácil construcción, muy económicos y eficientes a la hora de optimizar y estandarizar los procesos inmunohistoquímicos; No tan sólo corroborando una marcación óptima frente al tejido, sino también como ayuda objetiva para orientar la visualización de las distintas intensidades presentes en los estudios de patología mamaria y verificar el estado de los anticuerpos, los medios de revelado o estudiar si su funcionalidad se adapta a los requerimientos del servicio de anatomía patológica del Hospital Gustavo Fricke.

## BIBLIOGRAFÍA

Álvarez L. (ed) . *Anticuerpos monoclonales : Realidades y perspectivas*. Editorial Complutense, S.A 2004 ; 2 : 20 - 29 ; 3 : 51.

Armengol JA., Miñano FJ.,(eds). *Bases experimentales para el estudio del sistema nervioso*. Universidad de Sevilla 1995 ; 75- 86.

Arnaiz A., Regueiro, JM., López L. *Inmunología*. Editorial Complutense 1995 ;4 : 44.

Anticuerpos Monoclonales y Policlonales. Producción y Purificación. Aplicaciones. Disponible en <http://ucmfarmaciadatos.netai.net/segund0/Inmunologia/fity/19.pdf>

Balaton AL., Coindre JM., Collin F y cols. *Recommendations for the immunohistochemical evaluation of hormone receptors on paraffin sections of breast cancer. Study Group on Hormone Receptors using Immunohistochemistry FNCLCC/ADAQAP National Federation of Centres to Combat to Cancer/French Association for Quality Assurance in Pathology*. Ann Pathol 1996; 16: 144- 148.

Bankfalvi CR., Navabi H., Bier B. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. J Pathol 1994; 174: 223- 228.

Battifora, H. *The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing*. Lab Invest 1986; 55: 244-248.

Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J.L. *Bioquímica* (6° Edición). W.H . FREEMAN AND COMPANY, New York and Basingstoke 2008;33: 951-952.

Biopur s.r.l. 2007 . Disponible en <http://www.biopur.com.ar/ihqtec.htm>

Blanco FJ., Cañete JD., Pablos JL (eds) *Monografías SER : Técnicas de investigación básica en reumatología*. Editorial Panamericana SA, 2007 ;11: 205

Boenisch T. *Métodos inmunohistoquímicos de Coloración*; 3ra. ed. Dako Corp.; 2002

Bosman FT., de Goeij AF., Rousch M. *Quality control in immunocytochemistry: Experiences with the estrogen receptor assay*. J Clin Pathol 1992; 45: 120 - 124.

Buchwalow IB & Böcker W. *Inmunohistochemistry: Basics and Methods*. Springer - Verlag Berlin Heidelberg 2010.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. *Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma*. Lab Invest 2000; 80: 1943-1949.

Ceccotti L., Sforza R. (eds). *El diagnóstico en clínica estomatológica*. Editorial Médica Panamericana S.A. 2007 ; 9 : 79- 83.

Coll J. *Técnicas de diagnóstico en virología*. Díaz de Santos 1993; 3: 65.

Corominas JM., Munné A., Serrano S., Lloreta J., Nogueroles A., Prieto VG. *Utilidad de las microondas en el laboratorio de Anatomía Patológica*. Patología 1987; 20: 288-294

Elias JM. Grown AM., Nakamura RM & cols. *Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission*. Am J Clin Pathol 1989 ; 92: 836-843

Elias JM: *Immunohistopathology. A practical approach to diagnosis*. ASCP Press, Chicago. 1990.

Fejzo MS, Slamon DJ. *Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA and proteins*. Am J Pathol 2001; 159: 1645-1650.

Fernández PL, Nayach I, Fernández E y cols. Tissue macroarrays (“macrochops”) for gene expression análisis. *Virchows Arch* 2001; 438: 591-594.

Finstad CL., Yin BW, Gordon CM & cols. *Some method suitable for different antibodies on human brain tissue stored for several years in formaldehyde fixative.* *J Neurosci Methods* 1997; 72: 197-207.

García del Moral R. *Manual de laboratorio de anatomía patológica.* Mc Graw - Hill / Interamericana de españa , S.A 1993.

García F. *Fundamentos de inmunobiología.* Universidad Nacional Autónoma de México 1997 ; 7 : 256- 260.

García JM<sup>a</sup>. , Colom FM<sup>a</sup>. , Pérez SM<sup>a</sup>. , Belso E., Del Castillo L., Gómez D. *Técnico Especialista en Anatomía Patológica. ( Vol. II).* Osakideza Servicio Vasco de Salud. MAD,S.L 2006;18:89.

Gillett CE., Springall RJ, Barnes DM y col. *Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study.* *J Pathol* 2000; 192: 549-553.

Golub ES. *Base celular de la respuesta inmunológica: Un enfoque de la inmunobiología.* (2° Edición). Editorial Reverté, S.A 1987 ; 4 : 244.

Gómez E., Del Mar Blanco M., Domenech A. *Manual de Inmunología Veterinaria.* Prentice Hall 2007.

Grown AM., De Wevwe N., Battifora H. *Microwave - based antigenic unmasking: Revolutionary new technique for routine immunohistochemistry.* *Appl Immunohistochem* 1993; 1 : 256- 266.

Herman GE., Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: The new era of quality control*. Biotech Histochem 1991; 66: 194-199.

Hsu F.D., Nielsen T.O., Alkushi A & cols. *Multiple-tumor tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry laboratories*. Lab Invest 2002; 82: 333A (Abstract #1386).

Hyatt M.A. . *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron Microscopy* . Springer 2002.

Ingraham JL., Ingraham CA. *Introducción a la microbiología*. Editorial Reverté, S.A 1998 ; 17 : 411 - 412.

Jaramillo J. *El cáncer : Fundamentos de oncología*. Universidad de Costa Rica 1991; 5 : 55-66.

Janeway CA., Jr P.T., Walport, M., Shlomchik, M.J. . *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5ª edición). Garland Publishing 2001.

John D., Bancroft, Gamble M. (eds). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier Health Sciences 2008, 25 : 527.

Kelley WN. *Medicina interna*. (2ª Edición). Editorial Médica Panamericana, S.A 1993 ; 147 : 985.

Koneman E., Winn W., Allen S., Janda W., Procop G., Schrenckenberger P., Woods G. *Diagnóstico microbiológico*. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. España 2006; 3 : 113-114.

Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A & cols. *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nature Med 1998; 4: 844-847.

Kuennen Bousmeester V., Van Loenen P., De Bruin EM y cols. *Quality control of immunocytochemical staining of effusions using a standardized method of cell processing*. Acta Cytol 1996; 40: 475-479.

Leong ASY., Milies J., Duncis CG. *Antigen preservation in microwave irradiated tissues. A comparison with formaldehyde fixation*. J Pathol 1988; 156 :275- 282.

Lin F & Prichard J. (eds) .*Handbook of practical immunohistochemistry: Frequently asked question*. Springer Science + Business Media 2011; 6 : 45-46.

Litman GW., Rast JP., Shablott MJ., et al. *Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire*. Mol. Biol. Evol 1993; 10 (1): 60–72.

Lorente Garín JA., Lloreta Trull J., Allepuz Losa C., Plaza Mas L., Rioja Sanz LA., Gelabert Mas A. *Desarrollo de un microarray tisular (TMA) para el estudio inmunohistoquímico del patrón de expresión molecular en el cáncer de próstata (parte 1)*, Actas Urológicas Españolas 2006; 30 (1): 25-32.

Martínez J et al. *Análisis cuantitativo de técnicas inmunohistoquímicas. Mejora de resultados mediante aplicación de software de análisis de imágenes digitales*. 2005. Disponible en <http://www.conganat.org/7congreso/PDF/285.pdf>

Martínez RP., Piña OA., Soto DA & García R. *Histological and Immunohistochemical Comparison of Tissue Samples Processed by the Conventional Technique or the Acetone Simplified Method*. Int. J. Morphol., 29(2):575-80, 2011.

Merseburger AS., Young DY., McLeod DG. & cols. *Evaluation of whole-mount prostate derived tissue arrays by immunostaining of p53 and bcl-2 proteins to predict prostate cancer recurrence*. Lab Invest 2002; 82: 175A (Abstract #727).

Mighell AJ., Navabi H., Jasani B. *Role of calcium chelation in high - temperature antigen retrieval at different pH values*. J Pathol 1997; 182: 233-237.

Miller K., Auld J., Jessup E., Rhodes A., Ashton-Key M. *Antigen unmasking in formalin-fixed routinely processed paraffin vas-embedded sections by pressure cooking: A comparison with microwave oven heating and traditional method.* *Advanced in Anatomic Pathol* 1994; 173: 1-9.

Moch H., Schraml P., Bubendorf L. & cols. *High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma.* *Am J Pathol* 1999; 154: 981-986.

Moch H, Kononen J, Kallioniemi O. *Tissue Microarrays: What Will They Bring to Molecular and Anatomic Pathology?*. *Adv Anat Pathol* 2001; 8: 14-20.

Mollison PL. *Transfusión de sangre en medicina clínica.* Editorial Reverté, S.A 1987 ; 6 : 280.

Momose H., Metha P., Battifora H. *Antigen retrieval by microwave irradiation in lead thiocyanate. A comparison with protease digestion retrieval.* *App immunohistochem* 1993;1 : 77-82.

Montaño RF. & Romano. E.L. *Anticuerpos monoclonales y su aplicación en hematología.* *Interciencia* 1995 ; 20(4): 194 - 203.

Montero C. *Manual teórico práctico de técnicas inmunohistoquímicas.* Universidad Autónoma de San Luís Potosí 1998 ; 2 : 15 -21.

Montoya HH. *Microbiología Básica para el área de la salud.* (2ªEdición). Editorial Universidad de Antioquia 2008 ; 5 : 127-128.

Moss AJ., Dalrymple GV., Boyd CM. *Radioinmunoensayo práctico.* Editorial Reverté, S.A 1982; 1 : 14.

Muñoz J., García X. *Fisiología: Células , órganos y sistemas*. Fondo de Cultura Económica 1998; 4 : 256 -257.

Nocito A., Bubendorf L., Tinner ,E.M. & Cols. *Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade*. J Pathol 2001; 194: 349-357.

Norton AJ., Jordan S., Yeomans P. *Brief high - temperature heat denaturation (pressure cooking). A simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues*. J Pathol 1994; 173: 371- 379.

Obermann E C.; Marienhagen J.; Stoehr R.; Wuensch PH. & Hofstaedter, F. *Tissue microarray construction from bone marrow biopsies*. BioTechniques, 39(6):822-6, 2005.

Packeisen J.; Buerger H.; Krech R. & Boecker W. *Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry*. J. Clin. Pathol., 55(8):613-5, 2002.

Pardo Mindán J., Panizo A., Martínez L. *Valoración del sistema de polimeros de dextrano EnVision (PDE) en la detección inmunohistoquímica*. Rev Esp Patol 1988 ; Vol. 31 (1) : 9-16.

Parham P. *Inmunología*. (2º edición). Editorial Médica Panamericana 2006; 2 : 39-42.

Packeisen J.; Korsching E.; Herbst H.; Boecker W. & Buerger H. *Demystified Tissue microarray technology*. Mol. Pathol., 56(4):198-204, 2003.

Perkel JM. *Tissue microarrays: advancing clinical genomics*. The Scientist 2002; Vol 16: 28 Oct.

Peña Martinez Jose, "Inmunología en Línea", (fecha), disponible en la web : <http://www.inmunologiaenlinea.es>

*Revista Chilena de Cirugía*. Sociedad de Cirujanos de Chile 1997; 49 (4) : 442-444.

Riera Velasco. *Técnicas de inmunohistoquímica, estandarización y control de calidad en inmunohistoquímica. Problemas de fijación y procesamiento de los tejidos: la recuperación antigénica como solución*. ESP PATOL 1999 Vol. 32. N° 4

Rimm DL. *Impact of microarray technologies on cytopathology*. Acta Cytol 2001; 45: 111-4.

Roche Farma, S.A 2013. Disponible en [www.roche.es/portal/roche-spain/inmunohistoquimica](http://www.roche.es/portal/roche-spain/inmunohistoquimica)

Rodak BF. (ed) *Hematología fundamentos y aplicaciones clínicas*. Editorial Médica Panamericana 2005 ; 29 : 406-407.

Roitt I. *Inmunología : Fundamentos* . (11 ° Edición). Editorial Médica Panamericana 2008 ;6 : 204.

Rojas O. *Inmunología ( de memoria)*. 3° edición. Editorial Panamericana, S.A 2006 ; 7 : 189 -190.

Rubin MA., Dunn R., Strawderman M. & cols. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. Am J Surg Pathol 2002; 26: 312-319.

Suurmeijer AJH., Boom ME. *Notes to the application of microwave for antigen retrieval in paraffin and plastic tissue sections*. Eur J Morphol 1993; 31: 144-150.

Suurmeijer AJH. *Optimizing immunohistochemistry in diagnostic tumors pathology whit antigen retrieval*. Eur J Morphol 1994; 32 (Suppl.2-4): 325- 330.

Schraml P., Kononen J., Bubendorf L. & cols. *Tissue microarrays for gene amplification*

*surveys in many different tumor types. Clin Cancer Res 1999; 5: 1966-1975.*

Shergill I S., Freeman A. & Mundy A R. *Tissue microarrays in urology. BJU Int., 94(1):22-5, 2004.*

Stephan JP, Schanz S., Wong A. & Cols. *Development of a frozen cell array as a high-throughput approach for cell-based analysis. Am J Pathol 2002; 161: 787-797.*

Shi SR., Key ME., Kalra KL. *Antigen retrieval in formalin fixed, paraffin-embedded tissues, an-enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem 1991; 39: 288-294.*

Van de Rijn, M. & Gilks C B. *Applications of microarrays to histopathology. Histopathology, 44(2):97-108, 2004.*

Valpuesta JM. *A la búsqueda del secreto de la vida : Una breve historia de la biología molecular. Editorial Hélice 2008.*

Vilches N., Barboza O., Garza R., Ancer J., Flores J P. *Aplicaciones prácticas de la inmunohistoquímica en la patología de la glándula mamaria. Patología Rev Latinoam 2010;48(3):194-203 .*

Wan WH., Fortuna MB, Furmanski P. *A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. J Immunol Methods 1987; 103: 121-129.*

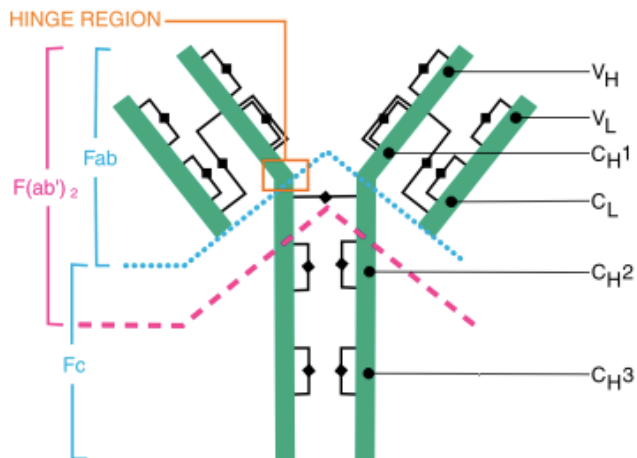
Wang H.; Wang H.; Zhang T. & Fuller G N. *Tissue microarrays: applications in neuropathology research, diagnosis, and education. Brain Pathol., 12(1):95-107, 2002.*

Wang L, Deavers MT, Malpica A y cols. *Tissue macroarray: a simple and cost-effective method for high throughput studies. Lab Invest 2002; 82: 346 (Abstract #1443).*

# ANEXO.

## Anexo N° 1

*Inmunoglobulina: Estructura en forma de Y.*

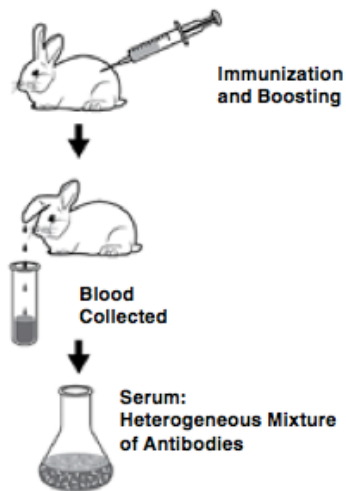


Fuente: IHC Staining Methods, Fifth edition.

## Anexo N° 2

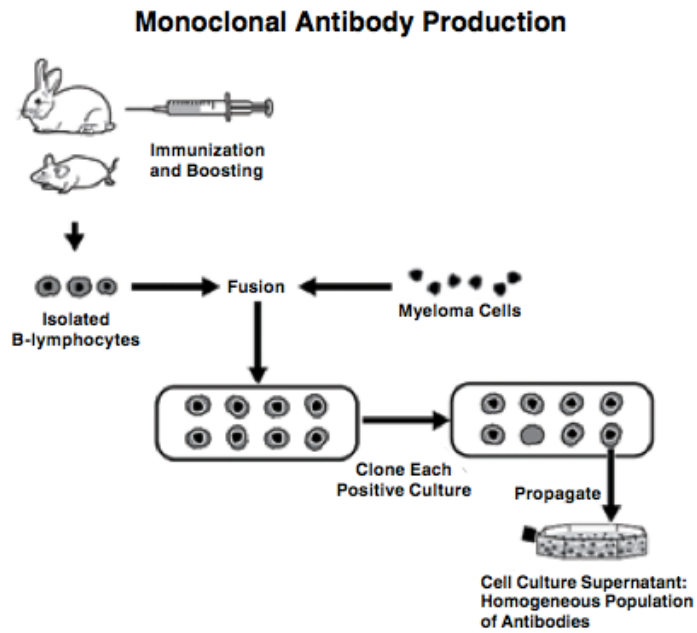
*Producción de anticuerpos policlonales*

### Polyclonal Antibody Production



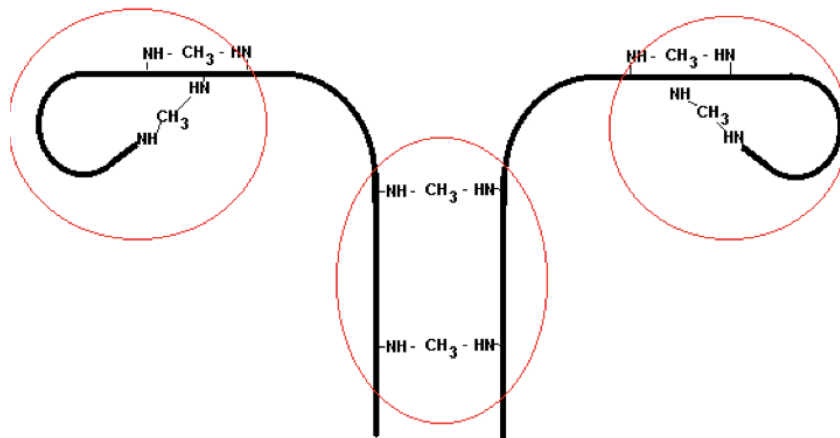
### Anexo N° 3

*Producción de anticuerpos monoclonales.*



### Anexo N° 4

*Fijación con formalina de una estructura proteica.*



## Anexo N° 5

*Tissue microarrays.*



## Anexo N° 6

*Kit de anticuerpos utilizados:*

*Marcadores útiles en cáncer de mama: HercepTest y Receptores hormonales.*

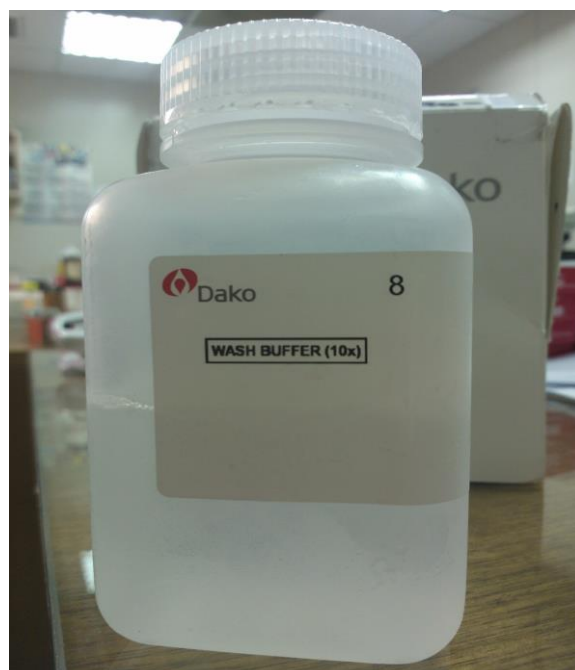
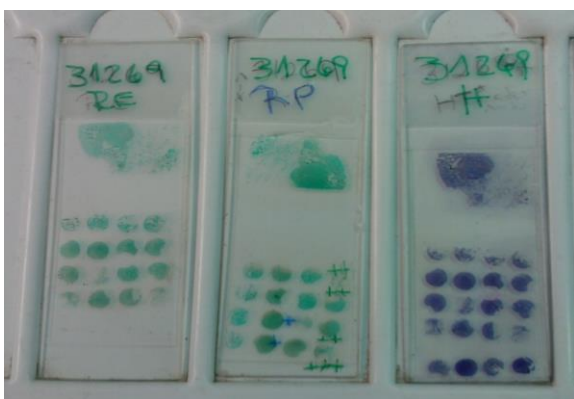


Línea primaria.



## Anexo N° 7

*Implementación básica para IHQ.*

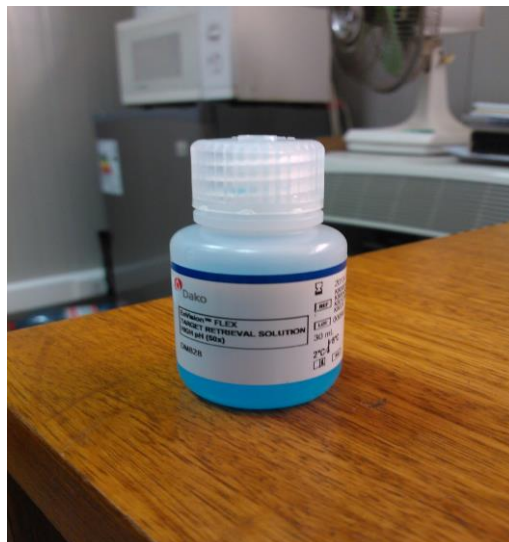
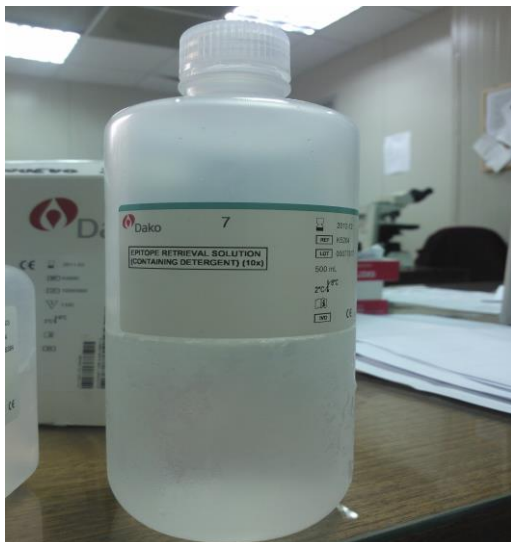


## Anexo N°8

### *Recuperación antigénica.*



### *Solución recuperadora.*



# Anexo N°9

Sistemas de visualización.



## ANEXO N° 10

*Cromógeno.*



## Anexo N° 11

*Materiales para procesamiento de rutina.*







## ANEXO N° 12



### PROCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA POLIMERO

- 1.Desparafinar hasta el H20 \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 2.Recuperación en olla de pascal \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 3.H2O 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 4.Bloqueo de la peroxidasa 10' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 5.Lavado H2O destilada 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 6.PBS 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 7.Bloqueo de la proteína específica 5' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- NO LAVAR
- 8.Anticuerpo primario 20' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 9.Lavado PBS 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 10.Post primario 20' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 11.Lavado PBS 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 12.Detección del polímero 20' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 13.Lavado PBS 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 14.DAB 7' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 15.Lavado PBS \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 16.Hematoxilina 5' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 17.Virar \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 18.Montar \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

# ANEXO N° 13



## PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA RECEPTORES HORMONALES

- 1. Recuperación Ag \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 2. H2Od \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 3. BloqueoPeroxidasa 10' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 4. H2Od / PBS \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 5. Ac 1° x 20' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 6. PBS \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 7. Ac 2° x 20' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 9. H2Od \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 9. Cromógeno x 10' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 10. H2Od \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 11. Tinción de contraste \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Contraste utilizado:.....

### RESULTADOS:

Placa N°	Ac:	Ac:	Ac:

FECHA:.....

TM:.....

# ANEXO N° 14



## PROTOCOLO HERCEPTEST

Dilución de Wash buffer y recuperador antigénico de 1:10, no reutilizable.

1. Recuperación Ag 40'+20' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
2. Wash buffer x 5' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
3. Bloqueo Peroxidasa 5' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
4. H2O<sub>2</sub> 2' / wash buffer 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
5. Ac 1° x 30' / control (-) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
6. Wash buffer 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
7. Ac 2° x 30' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
8. Wash buffer 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
9. DAB x 10' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
10. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> x 2' \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
11. Contraste hematoxilina \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

### RESULTADOS:

Placa N°	Ac:	Ac:	Ac:

FECHA:.....

TM:.....

## ANEXO N° 15

Evaluación de intensidades de marcación en casos de patología mamaria pertenecientes al Hospital Gustavo Fricke.

Se solicita al los participantes que en primera instancia observen el tejido en estudio sin considerar los controles. Posteriormente volver a observarlo pero esta vez mirando primero la matriz control. Para cada una de estas etapas señalar de manera individual los respectivos score (0, +, ++, +++) en cada uno de los marcadores a evaluar (HT,RE,RP). **Llenar solo recuadro en blanco**

1º Observar sólo el tejido (**s/control**) y dar Score.

2º Observar el tejido + los controles (**c/control**) y dar Score.

N° Caso	HT s/control	RE s/control	RP s/control	HT c/control	RE c/control	RP c/control
34223						
34175						
34103						
34049						
34041						
34039-1						
34039-2						
33951						
33773						
33698						
33691						
33685						
33667						
33626						

32017						
31851-1						
31577						
31306-2						

## ANEXO N° 16

### Conjunto de datos profesionales

Casos		Patólogo 1		TM 1		TM 2		TM 3		TM 4		Patólogo 2	
n° de caso	n° asociado placa	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c
1	34103-1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
2	33773-1	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3
3	33698-1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3
4	33691-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3
5	33685-1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3
6	33667-1	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	2
7	33626-1	2	2	0	0	2	1	1	1	1	1	2	3
8	32017-1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
9	34223-2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
10	34175-2	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2
11	34103-2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3
12	34049-2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3
13	34041-2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	3	3	3
14	34039-1-2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2
15	34039-2-2	0	0	0	0	2	2	1	1	0	0	0	0
16	33773-2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
17	33698-2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3
18	33691-2	3	3	1	1	1	1	1	0	0	3	3	3
19	33685-2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	3	3
20	33667-2	3	3	2	3	3	3	3	3	2	2	3	3
21	33626-2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3
22	31851-1-2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
23	31306-2-2	1	1	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1
24	34175-3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	2	3
25	34041-3	3	3	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2
26	33951-3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
27	33773-3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1
28	33691-3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	0	3	2
29	33685-3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
30	31577-3	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1

s/c	sin control
c/c	con control
Dif c.	Diferencia con Control

Compilado diferencias profesionales.

TM 1	TM 2	TM 3	TM 4	Pat 1	Pat 2
Dif c.	Dif c.	Dif c.	Dif c.	Dif c.	Dif c.
0	0	0	0	0	-1
0	0	0	0	0	0
0	0	0	-1	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	-1	0	0	1
0	1	0	0	0	-1
0	0	0	0	0	0
0	-1	0	0	0	0
-1	0	0	0	1	0
0	0	0	-1	0	0
0	0	0	-1	0	0
0	0	0	-1	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	-1	0	-1
0	0	1	0	0	0
0	0	1	-3	0	0
0	0	0	0	0	0
-1	0	0	0	0	0
0	0	-1	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	-1
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	2	0	1
0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	1	1

Número de diferencias	2	4	4	7	2	7	26
Número de aciertos (exactos)	28	26	26	23	28	23	154
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>180</b>
% acierto	93,3	86,7	86,7	76,7	93,3	76,7	85,6
% diferencias	6,7	13,3	13,3	23,3	6,7	23,3	14,4
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

# ANEXO N° 17

## Compilado Intensidades.

Casos		Patólogo 1		TM 1		TM 2		TM 3		TM 4		Patólogo 2	
n° de caso	n° asociado placa	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c
1	34103-1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
2	33773-1	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3
3	33698-1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3
4	33691-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3
5	33685-1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3
6	33667-1	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	2
7	33626-1	2	2	0	0	2	1	1	1	1	1	2	3
8	32017-1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
9	34223-2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
10	34175-2	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2
11	34103-2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3
12	34049-2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3
13	34041-2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	3	3	3
14	34039-1-2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2
15	34039-2-2	0	0	0	0	2	2	1	1	0	0	0	0
16	33773-2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
17	33698-2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3
18	33691-2	3	3	1	1	1	1	1	0	0	3	3	3
19	33685-2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	3	3
20	33667-2	3	3	2	3	3	3	3	3	2	2	3	3
21	33626-2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3
22	31851-1-2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
23	31306-2-2	1	1	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1
24	34175-3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	2	3
25	34041-3	3	3	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2
26	33951-3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
27	33773-3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1
28	33691-3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	0	3	2
29	33685-3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
30	31577-3	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1

0	Bajo
1	Bajo
2	Alto
3	Alto



# ANEXO N° 18

Compilado datos alumnos.

Casos		AI 1		AI 2		AI 3		AI 4		AI 5		AI 6		AI 7		AI 8		AI 9	
n° de caso	n° asociado placa	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c	s/c	c/c
1	34103-1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
2	33773-1	1	2	1	2	2	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	3	3	3
3	33698-1	1	1	1	1	1	3	2	2	1	1	3	3	2	2	3	3	2	3
4	33691-1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	3	1	1	1	1	1	1	2	2
5	33685-1	3	2	3	2	2	3	2	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3
6	33667-1	2	1	2	1	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3
7	33626-1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2
8	32017-1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
9	34223-2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
10	34175-2	3	2	3	2	2	3	3	3	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2
11	34103-2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3
12	34049-2	3	2	3	2	2	3	2	3	2	2	3	3	3	2	2	3	2	3
13	34041-2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2
14	34039-1-2	1	1	1	1	2	3	2	2	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
15	34039-2-2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
16	33773-2	1	0	1	0	3	2	3	3	1	1	0	0	1	1	2	2	1	1
17	33698-2	2	1	2	1	3	2	3	3	2	2	2	2	3	2	3	3	3	3
18	33691-2	3	3	3	3	2	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
19	33685-2	3	2	3	2	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3
20	33667-2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	2	2	2	3
21	33626-2	2	3	2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3
22	31851-1-2	2	1	2	1	2	3	2	2	2	1	2	2	2	2	2	3	2	2
23	31306-2-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	34175-3	3	2	3	2	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	1	2
25	34041-3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2
26	33951-3	2	3	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
27	33773-3	2	3	2	3	2	3	3	3	3	3	0	0	1	1	2	3	2	2
28	33691-3	3	2	3	2	3	3	3	3	1	1	2	3	2	3	3	3	3	3
29	33685-3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
30	31577-3	2	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1	0	2	2	2	1	1	1

AI 1	AI 2	AI 3	AI 4	AI 5	AI 6	AI 7	AI 8	AI 9
Dif c.	Dif c.	Dif c.	Dif c.	Dif c.	Dif c.	Dif c.	Dif c.	Dif c.
-1	-1	0	0	0	-1	0	0	0
-1	-1	-1	0	0	-1	0	-1	0
0	0	-2	0	0	0	0	0	-1
0	0	0	0	-1	0	0	0	0
1	1	-1	-1	0	0	0	0	0
1	1	-1	0	0	0	0	-1	0
1	1	0	0	0	-1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	1	0	0	0
1	1	-1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	-1	0	0	0
1	1	-1	-1	0	0	1	-1	-1
0	0	0	0	0	1	0	1	0
0	0	-1	0	0	0	0	-1	0
0	0	-1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	1	0	0
0	0	1	1	0	0	0	1	0
1	1	-2	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	-1
-1	-1	0	0	1	0	0	0	0
1	1	-1	0	1	0	0	-1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	-1
0	0	-1	0	0	0	0	-1	0
-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0
-1	-1	-1	0	0	0	0	-1	0
1	1	0	0	0	-1	-1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	-1	1	0	1	0

Número de diferencias	17	17	18	3	5	8	3	11	4	86
Número de aciertos (exactos)	13	13	12	27	25	22	27	19	26	184
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>270</b>
% acierto	43,3	43,3	40,0	90,0	83,3	73,3	90,0	63,3	86,7	68,1
% diferencias	56,7	56,7	60,0	10,0	16,7	26,7	10,0	36,7	13,3	31,9
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>