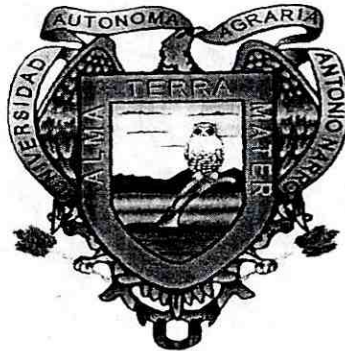


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO HERRAMIENTA DE
DIAGNÓSTICO EN MEDICINA VETERINARIA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ZULMA CRISTINA CONSTANTINO VÁZQUEZ

ASESORA:

MVZ EP. MARIA HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO HERRAMIENTA
DE DIAGNÓSTICO EN MEDICINA VETERINARIA**

MONOGRAFÍA

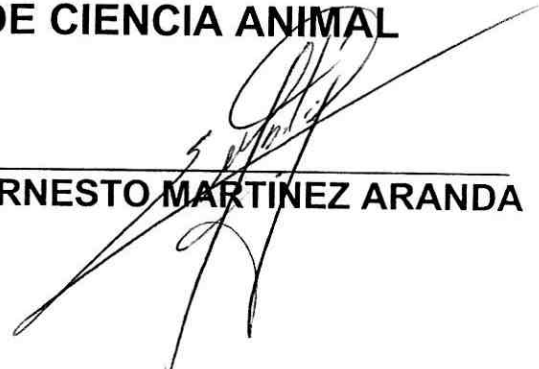
APROBADO POR EL COMITÉ

PRESIDENTE DEL JURADO



M.V.Z. E.P. MA. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**

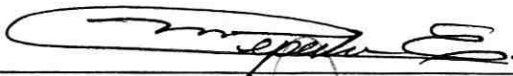


M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO HERRAMIENTA DE
DIAGNÓSTICO EN MEDICINA VETERINARIA



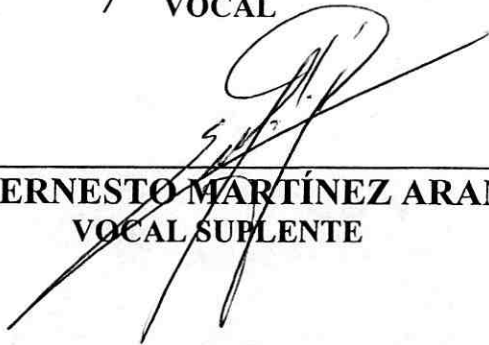
M.V.Z. E.P. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE
PRESIDENTE



M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
VOCAL



M.V.Z. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO
VOCAL



M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
VOCAL SUPLENTE

Agradecimientos:

A Dios por darme el don de la existencia y la sabiduría.

A mi Alma Terra Mater por su abrigo en mi estancia a lo largo de la carrera.

A mis padres Maria del pilar, Héctor Rodríguez e Isabel por haberme formado en su hogar lleno de dicha, amor, y por su apoyo incondicional.

A mi pequeñita América que sin saber es mi motor de inspiración para continuar mi camino.

A mis hermanos Erika, Héctor y Erick por haberme apoyado y haber compartido lo que para mi es el mejor de los hogares.

A mi esposo Pedro por su amor y comprensión.

A mis amigos Juana Isaura, Minerva, Carlos, Guadalupe, Diana, Eloy, Luzareli, Miguel, Julio por brindarme su amistad y apoyo.

A la MVZ EP. Maria Hortensia Cepeda Elizalde por su tiempo, comprensión y paciencia durante toda mi formación académica

Y a todos los profesores por haberme brindado su conocimiento.

A todos muchas gracias.

Dedicatoria:

*A mi pequeña América por ser la luz que ilumina mi sendero
y por ser mi motivo más grande de superación.*

*A mi tía Isabel Vásquez Fernández por haber creído en mí y
crearme como una hija.*

INDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- ANTECEDENTES.....	4
III.- DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	5
IV.- REQUERIMIENTOS DE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	6
V.- ANTICUERPOS UTILIZADOS EN INMUNOHISTOQUÍMICA.....	7
VI.- MÉTODOS PARA LA ELABORACIÓN DE LA TÉCNICA DE IHQ.....	8
a. Peroxidasa antiperoxidasa.....	10
b. Complejo Avidina Biotina Peroxidasa.....	11
VII.- ADHESIVOS PARA LAMINILLAS.....	13
VIII.- TIPOS DE FIJADORES UTILIZADOS EN INMUNOHISTOQUÍMICA.....	14
a. Paraformaldehído.....	14
b. Fijador de Bouin.....	15
c. Fijadores de Cloruro de mercurio.....	15
d. Fijador de Zenker.....	15
IX.- TIEMPO DE FIJACIÓN	15
X.- RECUPERACIÓN DE ANTÍGENOS OCULTOS O DAÑADOS POR SOBRE FIJACIÓN.....	16
XI.- MONTAJE DE LAMINILLAS.....	16
XII.- VENTAJAS DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA.....	17
XIII- DESVENTAJAS DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA.....	18
XIV- UTILIDAD DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA.....	18

A. IDENTIFICACIÓN DE AGENTES INFECCIOSOS COMO SON VIRUS, BACTERIAS, HONGOS Y PARÁSITOS	19
a.- Diarrea viral bovina (DVB).....	19
b.- <i>Neospora caninum</i>	20
c.- Detección de la bacteria <i>Campylobacter fetus venerealis</i> .	20
d.- Detección de la proteína crónica (PrP).....	20
e.- Detección y caracterización del virus de influenza A y B...21	
f.- Detección de Tricomoniasis.....	21
g.- Localización de <i>Áscaris suum</i>	21
B.- APLICACIONES DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA AL DIAGNÓSTICO DE LOS PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS CUTÁNEOS.....	22
C.- DIAGNOSTICO DIFERENCIAL EN PATOLOGÍA ONCOLÓGICA.....	22
D.- DETECCIÓN DE CÉLULAS TIROTROPAS O PRODUCTORAS DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE LA GLÁNDULA TIROIDES (TSH).....	24
A.- DETERMINACIÓN DE LA ESTIRPE HISTOLÓGICA DE NEOPLASIAS.....	24
XV- CUADRO 1.....	26
ALGUNAS TÉCNICAS DE IHQ PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS.....	26
XVII.- POSIBILIDADES DE QUE SE ALTEREN LOS RESULTADOS Y DAR FALSOS POSITIVOS.....	27

XVIII.- POSIBILIDADES DE QUE SE ALTEREN LOS RESULTADOS Y DAR FALSOS NEGATIVOS.....	27
XIX.- IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUIMICA.....	29
LITERATURA CITADA.....	32

I. INTRODUCCIÓN

Las tinciones de inmunohistoquímica (IHQ) se basan en la detección de **antígenos** en células y tejidos, mediante **anticuerpos** específicos marcados con una **enzima**, que cuando se expone a su sustrato en presencia de un **cromógeno**, el sitio de reacción antígeno-anticuerpo se puede visualizar a través del microscopio óptico (Vanda y Valero., 1997)

Dada la situación epidemiológica que exhiben las enfermedades es necesario disponer de pruebas diagnósticas que permitan emprender las medidas de control y prevención.

Hay casos en el que el diagnóstico no puede ser realizado mediante serología, porque a veces se ha presentado la muerte del paciente y no se dispone del suero, existe el fracaso del aislamiento viral, en ello solo queda la opción del diagnóstico retrospectivo (que es el que se basa en el historial clínico).

Las diferencias de sensibilidad, especificidad, capacidad de utilización a gran escala, etc. son algunos de los conceptos más importantes a la hora de seleccionar una u otra técnica.

Las siguientes técnicas son aquellas que presentan las mayores posibilidades para llevar a cabo estudios serológicos a gran escala y pueden ser realizados sin necesidad de grandes medios técnicos (Sánchez, 2000).

ELISA:

Se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa) de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológico como enzimático. Al estar uno de los componentes (antígeno anticuerpo) insolubilizados sobre la placa la reacción antígeno anticuerpo quedará inmobilizado y por lo tanto podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del

sustrato, que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro (Sánchez, 2002).

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA O WESTERBLOT:

Es una técnica inmunoenzimática que se utiliza para la detección de anticuerpos específicos. Se recomienda cuando no hay que estudiar un gran número de sueros o para analizar sueros dudosos por otras técnicas (Chávez, 2000).

SERONEUTRALIZACIÓN:

Este método está considerado de referencia para cualquier estudio serológico, pues es el que más se correlaciona entre la respuesta "in vitro" y la respuesta "in vivo". En esta prueba se puede valorar la capacidad que tienen los anticuerpos presentes en un suero problema para neutralizar la actividad biológica de un antígeno. Esta prueba es más laboriosa requieren de cultivos celulares, esterilidad, además de ser más lentas que las anteriores, sin embargo son altamente específicas y sensibles y se consideran las pruebas de referencia en el caso de los virus (Chávez 2000).

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA O INMUNOPEROXIDASA.

Según se utilice son técnicas que relacionan la especificidad de la histología (pueden ver la célula y comprobar que la reacción inmunológica se produce en un sitio específico) y la sensibilidad de las técnicas inmunológicas. Estas técnicas utilizan normalmente cultivos celulares (primarios o de líneas estables) infectados con el virus o la bacteria sobre la que se desea comprobar si hay o no anticuerpos en el suero problema; si hay anticuerpos se unirán a las células infectadas pero no a las no infectadas, (especificidad histológica observable). La unión se visualiza tras la adición de un conjugado antiinmunoglobulina marcado con isocianato o con peroxidasa y posteriormente la observación al microscopio de fluorescencia o convencional, respectivamente (Chávez, 2003).

Este trabajo tiene por objeto principal hablar sobre la inmunohistoquímica (IHQ), debido a que goza de gran aceptación mostrando resultados satisfactorios, factibles y rápidos un menor costo y la preservación del tejido y por ende de los antígenos.

La inmunohistoquímica se empieza a desarrollar cuando a Coons, se le ocurrió añadirle fluoresceína a las moléculas del anticuerpo y observar los cortes de los tejidos en el microscopio con luz ultravioleta. Esta técnica se utiliza en la actualidad sobre todo en los cortes de riñón, piel y en nódulos linfáticos (Pichardo, 2000; León *et al.*, 2000). Usando las técnicas de inmunoperoxidasa es posible identificar al menos un sitio antigénico en tejidos procesados y embebidos en parafina, con esto se da un gran paso debido a que se puede demostrar un amplio rango de componentes antigénicos en tejidos, lo cual hace más específico el diagnóstico del patólogo quirúrgico (Pichardo, 2000).

Las técnicas se dividen dependiendo del anticuerpo a utilizar en:

- Monoclonal o policlonal
 - Material disponible (fresco o congelado fijado en formalina)
 - Antígenos a estudiar de superficie o membrana.
- (González, 2000; Mahiques, 2003).

Por lo antes expuesto, estamos consientes de que la inmunohistoquímica es un arma poderosa que nos ayuda a resolver múltiples problemas de diagnóstico (Pascual, 2002).

Ejemplo:

- Diagnóstico de enfermedades autoinmunes,
- Determinación de la estirpe histológica de neoplasias (Vanda y Valero., 1997).
- Detección de agentes infecciosos como son virus, bacterias hongos y Parásitos (Vanda y Valero., 1997).
- Diagnóstico diferencial en patología oncológica (Puig, 2003).
- Detección de la proteína priónica (PrP) (Pascual, 2002).

II.- ANTECEDENTES

La patología nació como ciencia alrededor del año 1856 con la publicación del primer libro de histopatología en el año de 1860 por Rudolf Virchow el cual se basa en 20 lecturas en la que demuestran por vez primera que es posible establecer el pronóstico y el diagnóstico en diferentes estados de una enfermedad, estudiando cuidadosamente células y tejidos a través del microscopio (Pichardo, 2000). A partir de entonces la literatura de la anatomía crece rápidamente y se convierte en la Anatomía patológica los investigadores utilizan el microscopio para definir y redefinir viejas enfermedades ya diagnosticadas corroborando solamente los diagnósticos dados con anterioridad. Para el diagnóstico específico en patología quirúrgica, la microscopía pura a nivel de microscopía de luz no resultó ser el método ideal, consecuentemente se recurrió a la histoquímica y a la microscopía electrónica, con la cual se logró gran avance en la identificación de cambios específicos y de estructuras características. No obstante en la patología persistió aún la necesidad de otros métodos que apoyaran con el diagnóstico, posteriormente nació la inmunohistoquímica conforme se encontró que muchos antígenos característicos de tejidos normales, enfermos y de agentes causales de las enfermedades podían ser detectados objetivamente por medio de anticuerpos específicos. Como los complejos antígeno anticuerpo son invisibles se necesitó marcarlos para hacerlos aparentes a la microscopía (Pichardo, 2000).

Debido a la necesidad de desarrollar técnicas de tinción que fueran todavía más específicas, Coons y colaboradores en 1941, desarrollaron la técnica de inmunofluorescencia que es un método basado en la unión específica entre antígeno-anticuerpo utilizando anticuerpos marcados con un elemento visible que es el isotiocianato de fluoresceína. Sin embargo, la inmunofluorescencia solo tiene un pequeño impacto sobre el diagnóstico y la práctica de la patología quirúrgica, ya que se dificulta el método en materiales procesados y embebidos en parafina, esta técnica solamente se puede llevar cabo en tejidos congelados a diferencia de la inmunohistoquímica se utilizan enzimas que incluyen: la peroxidasa, la glucosa

oxidasa y la fosfatasa alcalina que al unirse a diversos substratos logran demostrar los sitios antigénicos (Pichardo, 2000; Rodríguez, 1997).

La inmunohistoquímica se empieza a desarrollar cuando a Coons, se le ocurrió añadirle fluoresceína, a las moléculas del anticuerpo y observar los cortes de los tejidos en el microscopio con luz ultravioleta. Esta técnica se utiliza en la actualidad sobre todo en los cortes de riñón, piel y en nódulos linfáticos (Pichardo, 2000; León *et al.*, 2000).

La inmunohistoquímica nace formalmente en 1974 cuando Taylor y Buns ganaron el premio Nobel de medicina al demostrar que usando las técnicas de inmunoperoxidasa era posible identificar al menos un sitio antigénico en tejidos procesados y embebidos en parafina. Con esto se da un gran paso debido a que se puede demostrar un amplio rango de componentes antigénicos en tejidos lo cual hace más específico el diagnóstico del patólogo quirúrgico (Pichardo, 2000).

III.- DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Una de las técnicas de inmunohistoquímica más empleada es la inmunoperoxidasa (Vanda *et al.*, 1997).

Permitiendo la identificación sobre muestras titulares o citológicas de distintas líneas de diferenciación y funcionamiento celular. (Puig 2003, Sanz 2002). Mediante la reacción inmune clásica, se determina la presencia de antígenos o anticuerpos, si se quiere detectar el antígeno específico se debe tener como elemento conocido el anticuerpo correspondiente y viceversa (Pascual, 2002; Montoya, 1991; Puig, 2003; Sanz, 2002) es decir, en incubar el antígeno que queremos detectar frente a un anticuerpo y mediante un sistema de amplificación junto con el empleo de un sistema de revelador, esta técnica puede ser visualizada al microscopio óptico (González, 2000; Pascual, 2002).

La IHQ se basa en la afinidad entre antígenos y anticuerpos. Esta afinidad se debe a la atracción de las fuerzas entre moléculas causando su unión, siendo ésta más fuerte y específica, creando así un complejo antígeno anticuerpo. Esto sucede porque una parte de la molécula del antígeno tiene un sitio específico en donde se une al anticuerpo se le conoce como determinante antigénica o epítope, este tipo de anticuerpo tiene la propiedad de formar complejos solamente con los antígenos que estimulan su producción. Esta especificidad es fundamental en las técnicas de inmunohistoquímica. Sin embargo, aunque cada molécula de anticuerpo se une a su epítope específico puede darse el caso que dos proteínas similares puedan reaccionar con un mismo antígeno, ocasionando una reactividad cruzada, lo cual ocurre cuando los sitios antigénicos de ambas tienen en común una secuencia de aminoácidos siendo ésta generalmente muy corta. Esta reactividad cruzada es algunas veces una fuente de confusión en la interpretación de la inmunohistoquímica ya que no es detectada por los controles usualmente utilizados (Pichardo, 2000).

IV.- REQUERIMIENTOS DE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Estas técnicas requieren, no obstante, una metodología y disciplina de laboratorio muy distinta a la del laboratorio clásico de anatomía patológica (León, *et al.*, 2000) Es fundamental disponer de una amplia batería de anticuerpos que permitan trabajar con paneles amplios, protocolizados y actualizados, el panel inicial de estudio, debe diseñarlo el patólogo en función de la clínica y del estudio morfológico previo. Siempre que sea posible debe incluir distintos anticuerpos para cada una de las líneas de diferenciación que se investigan. Además es muy importante que el personal técnico y médico deban estar específicamente entrenado en el manejo evaluación de los distintos anticuerpos y disponer de información apropiada acerca de su sensibilidad y especificidad del método de evaluación de resultados y de su trascendencia clínica. Su interpretación debe efectuarse siempre conjuntamente con el contexto clínico y los hallazgos morfológicos (Puig, 2003).

Estas técnicas necesitan de controles internos o paralelos, usualmente positivos y negativos. El control negativo se obtiene realizando la misma técnica,

pero con omisión del paso de incubación con anticuerpos primarios. Existen sistemas automatizados que permiten la tinción de un gran número de casos simultáneamente con la ventaja de pasos definitivos y estandarización de las variables usadas con costo relativamente bajo y en mucho menor tiempo (González, 2000).

V.-ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LA TÉCNICA DE IHQ

Las técnicas de inmunohistoquímica han contribuido a mejorar el diagnóstico y pronóstico en los casos de neoplasias, en tales técnicas destaca el anticuerpo Ki-67, el cual detecta un antígeno nuclear que se expresa en las células que entran al ciclo celular proporcionando una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido (Briones, 2002).

Existen diversos tipos de técnicas cuya indicación dependerá del anticuerpo a utilizar

- Monoclonal (TAB250, CB11 y 4D5) o policlonal (AO485) (Florentino2002).
- Material disponible, debe ser fresco o congelado fijado en formalina.
- Antígenos a estudiar de superficie o membrana
(González, 2000; Mahiques, 2003).

Durante muchos años se han utilizado en estos ensayos, anticuerpos policlonales que permitan obtener una alta sensibilidad diagnóstica, pero tienen limitaciones en su especificidad (Montoya, 1991).

Hoy se recurre, a pesar de su mayor costo, a anticuerpos monoclonales que incrementan la especificidad pero con pérdida de sensibilidad, se ha iniciado el uso de mezclas al anticuerpo monoclonal que incluyen especificidades para los determinantes antigénicos más comunes. Con ello se logran niveles muy altos de sensibilidad y especificidad (Montoya, 1991). Utilizando anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia o con peroxidasa frente a los diferentes linfocitos porcinos, se puede valorar la situación de estas células en cualquier tejido incluso utilizando dos anticuerpos monoclonales cada uno frente a una población linfocitaria distinta y cada uno marcado con una enzima diferente (doble marcaje) peroxidasa fosfatasa alcalina, se puede estudiar dos poblaciones celulares a la vez de cualquier

tejido, con el fin de agotar aquellos anticuerpos primarios ya caducados y por consiguiente, reducir costos en las técnicas de inmunohistoquímica, hemos investigado si con dichos viales, la calidad de la inmunotinción era satisfactoria. En algunos países actualmente existen leyes que prohíben la utilización de anticuerpos caducados en inmunohistoquímica; no obstante existen estudios que como el nuestro demuestran que los resultados pueden ser satisfactorios aun usando dichos reactivos. De todas formas recomendamos métodos alternativos como la congelación de dichos viales o su conservación en congelador una vez mezclados con glicerol (Yebra, *et al* 2002).

VI.- MÉTODOS PARA LA ELABORACIÓN DE LA TÉCNICA DE IHQ

Estos métodos inmunohistoquímicos han añadido una nueva dimensión a la práctica de la histopatología, facilitando la demostración de un amplio rango de componentes de células y tejidos, aún cuando el principio es el mismo, existen diferentes variaciones en la técnica de inmunohistoquímica siendo éstas las principales:

❖ **Método directo**

En él, el anticuerpo específico contra la sustancia que se quiere detectar está marcado con partículas detectables al microscopio.

❖ **Método indirecto**

En él, la señal del anticuerpo se amplía realizando sucesivas capas de anticuerpo o marcadores como son: Método de peroxidasa (HRP), Método de Peroxidasa – antiperoxidasa (PAP), Método de Avidita Biotina (ABC) (Pichardo, 2000).

La reacción antígeno anticuerpo más utilizada son: las de inmunoperoxidasa y la técnica inmunoenzimática de la biotina – avidita (Rodríguez, 1997; León *et al.*, 2000). La peroxidasa tiene algunas ventajas sobre los otros métodos, siendo estas el no dar falsos positivos, debido al tamaño del polímero, que no es tan grande como

los otros métodos, evitando con ello la tinción a fondo o peroxidasa endógena. En cuanto a su especificidad es muy semejante a otros (Pichardo, 2000).

En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas peroxidasa, fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul) capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. (Pichardo, 2000).

Para el estudio de antígenos de superficie se recomienda la fijación en acetona y cortes congelados. Para los antígenos citoplasmáticos es mejor la fijación en formalina e inclusión en paraplast o parafina. (González, 2000). El uso adecuado de las técnicas de inmunoperoxidasa es crucial para un diagnóstico correcto su efectividad es buena si se usan recaudos necesarios de control de calidad, sin embargo son procesos complejos con grandes posibilidades de error (Santa, 2002). Las inmunotinciones han sido de gran ayuda en medicina veterinaria e investigación (Vanda y Valero., 1997).

La inmunoperoxidasa, requiere de un conjunto relativamente más concentrado, permite obtener resultados rápidos equivalentes en cuanto a sensibilidad a cualquier otra técnica y con un mínimo de costo en lo relativo a equipamiento, además de la posibilidad de observar los resultados al microscopio óptico durante el periodo largo (Riverón *et al.*, 2003).

Además permite identificar los marcadores de membrana de las células tumorales. Se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro, estas técnicas son útiles para formular el diagnóstico histopatológico tradicional, pero su especificidad no es absoluta (Mahiques, 2003).

Permitiendo la precisión del tipo histológico de un tumor al identificar los antígenos citoplasmáticos o de superficie de las células neoplásicas, es posible también la identificación de los productos de oncogenes y de genes supresores de

tumores con anticuerpo monoclonal. Eventualmente, se estima que contribuyen al diagnóstico precoz a la formulación de diagnóstico más precisos y a la respuesta del tratamiento. (González, 2000) esta técnica utiliza normalmente cultivos celulares (primarios o de líneas estables) infectados con el virus o la bacteria sobre la que se desea comprobar si hay o no anticuerpos en el suero problema tras la incubación con el suero problema, si hay anticuerpos se unirán a las células infectadas pero no a las no infectadas (especificidad histológica observable). La unión visualiza la adición de un conjugado antiinmuglobulina marcado con isocianato con peroxidasa y la posterior observación al microscopio (Sánchez 2000).

Estos cargadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien directamente a otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A (González, 2000).

Para llevar acabo la técnica Peroxidasa – antiperoxidasa se llevan a cabo los siguientes pasos:

a. Peroxidasa antiperoxidasa

- 1.- Desparafinar las laminillas en la estufa a 60 °C por 30 minutos, ponerlas en xilol (dos tinas, 10 minutos) y luego en alcohol absoluto y alcohol al 95%.
- 2.- Enjuagar en agua o en buffer salino (ph 7.5) (5 minutos).
- 3.- Incubar en metanol absoluto y H₂O₂ al 3% durante 5 minutos para bloquear la peroxidasa endógena.
- 4.- Lavar con agua destilada y/o buffer salino de fosfato (PBS) (5 minutos)
- 5.- Incubar con suero normal de la especie en donde se produjo el anticuerpo secundario para bloquear la reactividad inespecífica de antígenos titulares de (10 a 30 minutos).
- 6.- Descantar el exceso de suero.
- 7.- Colocar sobre el corte unas gotas del anticuerpo primario (a la dilución recomendada) e incubar en una cámara húmeda (por 20 a 60 minutos, a temperatura ambiente).

- 8.- Lavar con PBS (5 a 10 minutos).
- 9.- Incubar con el anticuerpo secundario (20 a 30 minutos).
- 10.- Lavar con PBS (5 a 10 minutos).
- 11.- Colocar unas gotas del complejo PAP (método peroxidasa – antiperoxidasa), el anticuerpo debe diluirse al momento de usarse, ya que la solución es inestable (Incubar de 20 a 30 minutos).
- 12.- Lavar con PBS (5 a 10 minutos).
- 13.- Incubar con diamobencidina (cromógeno) con H₂O₂ al 30 % (sustrato de peroxidasa). Al reaccionar, se libera el oxígeno, el cual oxida a la diaminobencidina y colorea la reacción. Un revelado aduado toma de 10 a 15 minutos.
- 14.- Lavar en agua destilada para detectar la reacción.
- 15.- Contrastar con hematoxilina de Harris o verde metilo para obtener una tinción nuclear, deshidratar de manera ordinaria y montar con resina.

(Vanda y Valero.,1997).

b. Complejo Avidina Biotina Peroxidasa

Esté método aprovecha la gran afinidad que tiene la avidina para unirse a cuatro moléculas de biotina, por lo cual usa un anticuerpo primario, uno secundario conjugado con biotina y el complejo de tres peroxidasa unidas a avidita.

La técnica es similar a la descrita para el método peroxidasa - antiperoxidasa hasta el paso numero 8. Si el tejido posee biotina endógena deberá bloquearse esta actividad.

- 1.- Desparafinar las laminillas en la estufa a 60 °C por 30 minutos, ponerlas en xilol (dos tinas, 10 minutos) y luego en alcohol en absoluto y alcohol al 95 %.
- 2.- Enjuagar en agua o en buffer salino (ph 7.5) por 5 minutos.
- 3.- incubar el metanol absoluto y H₂O₂ al 3 % durante 5 minutos para bloquear la peroxidasa endógena.
- 4.- Lavar con agua destilada y buffer salino de fosfato por 5 minutos.
- 5.- Incubar con suero normal de la especie en donde se produjo el anticuerpo secundario para bloquear reactividad inespecífica de antígenos titulares de 10 a 30 minutos.

- 6.- Descartar el exceso de suero.
- 7.- Colocar sobre el corte unas gotas e incubar en una cámara húmeda por 20 a 60 minutos a temperatura ambiente.
- 8.- Lavar con PBS de 5 a 10 minutos.
- 9.- incubar con el anticuerpo secundario biotinado (universal) diluido en PBS conteniendo suero bloqueador (10 – 30 minutos).
- 10.- lavar en PBS (5 minutos).
- 11.- incubar con la solución del complejo avidina – biotina – peroxidasa de 5 a 30 minutos, la solución es aún más intensa si se emplea estreptavidina en lugar de avidina.
- 12.- Lavar en PBS 5 minutos.
- 13.- incubar con la solución sustrato de peroxidasa que contiene el cromógeno (H=2 con diaminobencidina) y vigilar la reacción para detenerla cuando se obtenga la intensidad del color deseado.
- 14.- Lavar con agua destilada para obtener la reacción.
- 15.- Contactar con hematoxilina acuosa de Harris o verde metilo, par obtener una tinción nuclear, deshidratar de manera ordinaria y montar con resina.

(Vanda y Valero., 1997).

Esta reacción se ha hecho visible utilizando reveladores que dan color, los más comunes son la diamino bencidina DAP que produce un color café y la amino etil carbazole AEC la cual tiñe de color rojo. Heras y Cols desarrollaron para la compañía DAKO (California, EEUU) un nuevo sistema de detección en inmunohistoquímica que llamaron “*Envisión*” basado en un polímero conjugado con la enzima peroxidasa y anticuerpos secundarios. Este método tiene mayor sensibilidad y menos tinción de trasfondo (León *et al.*, 2000).

VII.- ADHESIVOS PARA LAMINILLAS

Es posible y en ocasiones necesario (especialmente en histoquímica, inmunohistoquímica e hibridación in situ), agregar un adhesivo a los portaobjetos antes de montar los cortes en ellos.

Pueden utilizarse con moderación:

Albúmina de huevo de Mayer:

50 ml de clara de huevo + 50 ml de glicerina + un granito de timol o fenol; se guarda en el refrigerador y se aplica una capa delgada a la laminilla antes de usarla. No deben emplearse si se tripsinizarán los tejidos, por que se digiere con la tripsina.

Baño en gelatina / alumbre de cromo: 3 g de gelatina + 0.5 g de sulfato potásico de cromo (alumbre) + cbp 1 litro de agua destilada. Se calienta el agua a 60 °C, se disuelve la gelatina con agitación y se añade lentamente el sulfato potásico de cromo. Se pueden añadir unos pocos cristales de timol como preservador. Se filtra cuando aún está caliente o tibio. Las laminillas se remojan en la solución tibia, se sacuden, se secan al aire en posición vertical y se almacenan hasta usarse.

Baño en solución acuosa de 0.5% a 15% de pegamento de caseína a 60 °C, seguido de secado al aire libre de polvo.

Baño en soluciones de poli- L-lisina seguida al aire

Laminillas comercialmente cubiertas con silano o poli-L-lisina, preparadas especialmente para inmunohistoquímica e hibridación in situ.

Interesantemente, el secar los cortes recién montados sobre los portaobjetos en un horno o sobre una plantilla caliente a 60 centígrados por 30 minutos permite que se derrita la parafina y los cortes se peguen al vidrio.

En vez de cubrir los portaobjetos con adhesivos, puede añadirse gelatina y/o pegamento de caseína al agua de la tina de flotación de tejidos que deberá descartarse cada día (Vanda y Valero., 1997).

VII.-TIPOS DE FIJADORES UTILIZADOS EN INMUNOHISTOQUIMICA.

La fijación ideal para IHQ sería aquella que por una parte endurezca el tejido lo suficiente para permitir la inclusión en parafina para realizar los cortes y por otra

parte cause el mínimo de cambios en las proteínas. Entre los fijadores menos agresivos y que más se aconsejan para hacer IHQ están:

Paraformaldehído al 2%.

Acetona (improntas y frotis).

Fijador de sublimado – formalina.

Fijador de Zenker.

Fijador de Bouin.

Las improntas fijadas en acetona pueden almacenarse a 20 °C por varios meses. El fijador de Bouin puede ser un buen fijador para inmunohistoquímica de algunos antígenos. La formalina con cloruro de mercurio ha sido empleada como fijador para la demostración de inmunoglobulinas en cortes, pero requiere que se eliminen los cristales de cloruro de mercurio de los cortes antes de hacer el proceso de inmunohistoquímica (Vanda y Valero., 1997).

a. Paraformaldehído.

Para inmunohistoquímica se pueden fijar las muestras en solución de paraformaldehído al 2 %, mientras que en la biología molecular (hidratación y PCR in situ) se pueden utilizar paraformadehído al 4%, en ambos casos disuelto en amortiguador de fosfatos (PBS) (Vanda y Valero.,1997).

b. Fijador de Bouin

Es un excelente fijador para los tejidos blandos. Es particularmente útil para fijar muestras del aparato reproductor, (especialmente el testículo), También se emplea para el sistema nervioso central (medula ósea) y por su gran capacidad de coagular proteínas en tejido con edema severo. Otro uso característico de este fijador es la demostración de cuerpos de inclusión virales intracelulares. Por su rapidez se emplea como fijador rutinario en algunos laboratorios pues permite incluir las piezas el mismo día de la necropsia.

Las características indeseables de este fijador son su costo, su tendencia a lisar eritrocitos y su propensión a formar hematina ácida, por lo que debe evitarse su

empleo en tejidos con hemorragias o congelación. No debe emplearse para fijar cortes de riñón (Vanda y Valero., 1997).

c. Fijadores de Cloruro de mercurio

Se utilizaba frecuentemente en fijadores para el sistema nervioso central, especialmente en los casos de rabia, pues permite distinguir los cuerpos de negri con la tinción de Mann (Vanda y Valero., 1997).

d. Fijador de Zenker.

Es especial para fijar pequeñas piezas de hígado y bazo. El tiempo requerido de fijación permite una excelente tinción posterior del núcleo celular y fibras conectivas, por lo que se recomienda cuando desean realizar tinciones tricrómicas. Una ventaja que tiene es la penetración pobre en el tejido por lo que los tejidos a fijar no deben lavarse con agua corriente por varias horas y no se deben conservar las piezas fijadas en esta solución. No se recomienda su uso en secciones congeladas. (Vanda y Valero., 1997)

IX.-TIEMPO DE FIJACIÓN

Es importante recordar que los tejidos no deben ser sobre fijados ya que esto causará deterioro de los determinantes antigénicos. En la mayoría de los casos se recomienda un tiempo de fijación no mayor de 12 horas, 6 horas sería un buen tiempo después del cual se incluirán en parafina (Vanda y Valero., 1997).

X.-RECUPERACIÓN DE ANTÍGENOS OCULTOS O DAÑADOS POR SOBRE FIJACIÓN

Cuando existe un poco antígeno intacto o se teme que esté dañado por la fijación con formaldehído y no pueda ser detectado, puede emplearse:

- Algunos de los recuperadores de antígenos comerciales.
- Incubación por 20 a 40 minutos en solución de ácido cítrico 0.01 pH 6.90 a 95 °C.
- Enzimas proteolíticas: tripsina, proteinasa K, pronasa y pepsina.

La tripsinización usualmente es con tripsina al 0.1% disuelta en un amortiguador Tris salino de ph \approx 8 con 0.1% de cloruro de calcio. Los cortes desparafinados e hidratados se colocan en esta solución de tripsina a 37 °C de 10 a 60 minutos.

La pepsina al 0.4% se disuelve en ácido clorhídrico 0.01 N.

La solución de proteasa de 0.05% a 0.1% en solución de amortiguador Tris 0.5, para asegurar una buena exposición a soluciones de enzimas, se usarán 250 ml para un máximo de cinco laminillas tratadas en solución con agitación continua.

El exceso de tratamiento con enzimas proteolíticas daña la morfología celular y puede causar que los cortes se desprendan de las laminillas por lo que conviene usar adhesivos y/o incluir varios cortes de cada caso (Vanda y Valero., 1997).

XI. MONTAJE DE LAMINILLAS

Cuando no pueden emplearse soluciones alcohólicas ni disolventes del tipo de xilol para montar los cubreobjetos (por ejemplo cuándo se emplea EAC o cloronaftol), es posible emplear glicerina en solución amortiguada de fosfatos y sellar las orillas de los cubreobjetos con barniz de uñas transparente. También es factible emplear gelatina glicerol, que al secarse adherirá firmemente el cubreobjetos al portaobjetos.

Otra posibilidad es emplear medios de montaje hidrosolubles de los que existen comercialmente disponibles. Cuando se emplea AEC debe evitarse que permanezcan burbujas de aire atrapadas en las laminillas montadas par que no se oxiden (Vanda y Valro.,1997).

XII.- VENTAJAS DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA:

a. Esta técnica, si bien, requiere de un conjugado relativamente más concentrado, permite obtener resultados rápidos, equivalentes en cuanto a sensibilidad a cualquier otra técnica con un mínimo de costo en lo relativo a equipamiento, además la posibilidad de observar los resultados al microscopio óptico durante un periodo largo, (Sánchez, 2001; Larisa *et al.*, 2003).

b. Se estima también que su rendimiento es mayor pero su uso debe ser controlado, y realizada por técnicos experimentados y sus resultados deben interpretarse en el contexto de los hallazgos histopatológicos y clínicos (González, 2000).

c. En la actualidad estas técnicas son de gran utilidad para conocer las poblaciones afectadas en las diferentes infecciones víricas y llevar a cabo estudios de patogenia. (Sánchez, 2001).

d. Pueden utilizarse en tejidos procesados en formol y embebidos en parafina aunque lo ideal es trabajar con improntas frescas o cortes de congelación, ya que los fijadores pueden desnaturalizar proteínas o “enmascarar” los determinantes antigénicos ocasionando que la reacción sea débil o escasa (Rodríguez, 1997; Pichardo, 2000).

e. Las técnicas inmunohistoquímicas enzimáticas permiten una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable puede ser evaluada con microscopio de luz. El material así estudiado puede archivar por años sin pérdida de la intensidad de la reacción. (Rodríguez, 1997; González, 2000).

XIII.- DESVENTAJAS:

a. Presencia de reacción inespecífica especialmente cuando se utilizan anticuerpos policlonales (González, 2000).

b. Presencia de “background” o tinción de fondo especialmente con técnicas de complejos avidina–biotina (ABC) algunos de los reactivos son potencialmente neoplásicos, como por ejemplo el cromógeno diaminobenzidina por último esta técnica requiere estandarización y un estricto control de calidad. (González, 2000).

c. Uno de los problemas actuales con estas técnicas no es la técnica en sí, sino la interpretación de los resultados pueden ser manual o automatizada o la posibilidad

de acceder a los numerosos anticuerpos existente. Sus resultados disminuyen a nivel aceptable (González, 2000).

d. Cambios pequeños en la secuencia de aminoácidos o en la glicosilación de proteínas puede ser suficiente para que un anticuerpo que reconoce una molécula determinada en tejidos de humano no reconozca a la proteína correspondiente del canindeo, bovinos u otras especies. Por ejemplo: los antisueros usuales para la proteína S100, que son muy útiles para identificar tejido de origen neuroectodérmico en humanos, no funciona en tejidos de perro, como tampoco lo hacen los anticuerpos contra antígeno leucocitario común y contra subclases de linfocitos de humanos para marcar subpoblaciones de células linfoides de animales. Deben utilizarse anticuerpos específicos para cada especie animal. Por lo tanto, no debe asumirse que todos los anticuerpos contra determinantes antigénicos de una especie reconocerán las células de otras especies (Vanda y Valero., 1997).

XIV.- UTILIDAD DE LA INMUNOHISTOQUIMICA

Las inmunotinciones han sido de gran ayuda en medicina e investigación y se han empleado para:

- A.** Identificación de agentes infecciosos como virus, bacterias, parásitos y hongos.
- B.** Aplicación de la inmunohistoquímica al diagnóstico de los procesos linfoproliferativos cutáneos.
- C.** Detección de células tirotropas o productoras de la hormona estimulante de la glándula tiroides.
- D.** Clasificación de los diferentes subtipos de linfocitos.
- E.** Diagnóstico de enfermedades autoinmunes.
- F.** Determinación de la estirpe histológica de neoplasias.
- G.** Diagnóstico diferencial en patología oncológica.

A. IDENTIFICACIÓN DE AGENTES INFECCIOSOS COMO VIRUS, BACTERIAS, PARÁSITOS Y HONGOS.

Estas técnicas han sido de gran importancia para el estudio de la patogenia de varias enfermedades infecciosas del ganado porcino, así pudiéndose estudiar las poblaciones linfocitarias porcinas que estaban o no afectadas por el virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) en diferentes órganos, (Sánchez, 2001)

Otra de las enfermedades que diagnostica la IHQ en cerdos es a PRRS (síndrome reproductivo y respiratorio porcino) detectando antígenos en tejidos fijados en formaldehído utilizando diferentes sistemas de marcado y métodos de detección.

Las muestras de elección para ésta técnica se utilizan las tonsilas y el pulmón, Es muy importante señalar el tipo de fijador, el tiempo de fijación y el método utilizado para realizar la técnica por que pueden influenciar en los resultados (Chávez, 2003).

a.- Diarrea viral bovina (DVB).

La inmunolocalización del antígeno de diarrea viral bovina (DVB) en células epiteliales de la epidermis, folículos pilosos, bulbos pilosos, glándulas cutáneas, histiocitos y músculo liso, indujeron a detectar el virus en muestras de pelo mediante la técnica de inmunohistoquímica y compararla con la inmunohistoquímica en biopsias de piel para poder evaluar su utilidad en el diagnóstico rutinario de bovinos con el fin de contar con un método de diagnóstico rápido, práctico y seguro que permita la identificación con una sola muestra de pelo.

Se encontró inmunoreactividad para el antígeno de DVB en muestras de bulbos pilosos y que hubo concordancia con la inmunohistoquímica en biopsias de piel, está técnica laboriosa que consume tiempo, necesita mayor numero de reactivos y no permite el análisis simultaneo de numerosas muestras, se recomienda que se diagnostica la enfermedad por medio de la técnica de inmunohistoquímica en biopsias de piel como método de preferencia (Lértora, 2003).

Para el diagnóstico de DVB se utiliza la prueba de inmunoperoxidasa es más rápida y sensible comparando con el aislamiento viral para la detección del antígeno del DVB en tejidos frescos o fijados en formalina. Esta imagen permite además observar la arquitectura del tejido y por lo tanto las lesiones histológicas que pudieran estar presentes (Rivera, 2000).

b.- Detección de la bacteria *Neospora caninum*.

Se realizan sobre tejidos fetales, SNC, corazón, y músculos retrooculares. La inmunohistoquímica detecta específicamente los parásitos alojados en distintos tejidos del feto, su sensibilidad es alterada por las características de las muestras pero su especificidad es alta (Combessies, 2000).

c. Detección de *Campylobacter fetus venerealis*

La inmunohistoquímica es una técnica que permite la detección de microorganismos no solo en muestras clínicas frescas sino también en materiales procesados para realizar cortes histológicos. Se utilizó en forma conjunta con la metodología de rutina, con el objetivo de detectar la presencia de la bacteria en el útero y área cervicovaginal de las vaquillonas durante el periodo embrionario. Esta técnica también nos permite registrar en las imágenes las formas de espiral adheridas a la mucosa del aparato reproductor.

Esta técnica demuestra ser una alternativa útil tanto para el estudio de la inmunopatogenia en modelos experimentales, como herramienta para el diagnóstico a partir de diferentes muestras clínicas (Catena, 2003).

d.- Detección de la proteína criónica (PrP).

Es un marcador empleado como herramienta para realizar el diagnóstico definitivo de estas enfermedades neurodegenerativas. Su presencia se puede observar mediante técnicas de inmunohistoquímica y bioquímica (Pascual, 2002). Otra técnica requieren de material fresco lo cual disminuye su uso debido a la capacidad infectiva de la proteína criónica (Pascual, 2002)

e.- Detección y caracterización del virus de Influenza A y B.

Con el objetivo de identificar en forma rápida los virus de influenza, se estudiaron 148 muestras de pacientes con sintomatología compatible con la entidad, se inocularon los exudados nasofaríngeos e incubados durante una noche a 37 °C. El medio fue eliminado y las células fueron lavadas con buffer fosfato salino posteriormente fijadas en metanol y los antígenos virales detectados por la técnica de inmunoperoxidasa mediante un pool de anticuerpos monoclonales contra influenza encontrándose con resultados favorables, recomendando su utilización (Oropeza, 1998).

f. Detección de Tricomoniasis

El diagnóstico de tricomoniasis se basa en el historial clínico, los inicios de aborto precoz, el retorno repetido de calor después del servicio o la irregularidad del estro. El diagnóstico definitivo deberá ser establecido por identificación de microorganismo en la placenta, el contenido estomacal del feto abortado, los lavados uterinos, el exudado biométrico o el moco vaginal pero como el feto abortado no presenta lesiones macroscópicas o microscópicas específicas la identificación del microorganismo es requisito indispensable para la consecución del diagnóstico, podemos utilizar la técnica de inmunohistoquímica con empleo de un anticuerpo monoclonal, se pueden utilizar sobre placenta o pulmón fetal impregnados en parafina y fijados en formalina, esta técnica también se puede utilizar si el tejido ha sufrido una fuerte autólisis (Caballero, 2002).

g. Localización de *Áscaris suum* por medio de inmunohistoquímica

En la actualidad hay un enorme desconocimiento de la localización antigénica del material parasitario procedente de *A. suum* tanto de adultos, larvas, como proteínas aisladas en los tejidos del hospedador, cuyo asentamiento podría provocar una serie de alteraciones patológicas en los diferentes órganos, por este motivo

tratamos de visualizar mediante la técnica de inmunohistoquímica encontrando efectividad y sensibilidad (Frontera, 2003).

B.- APLICACIONES DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA AL DIAGNÓSTICO DE LOS PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS CUTÁNEOS

La inmunohistoquímica ha permitido un papel fundamental en el diagnóstico y clasificación de las neoplasias hematológicas en general, incluyendo lógicamente a los linfomas cutáneos. Continuamente se están describiendo nuevos anticuerpos que permiten reconocer nuevos marcadores de estirpe celular, aplicables al diagnóstico hematopatológico. Muchos de estos anticuerpos pueden utilizarse en tejido fijado en formol e incluso en parafina, lo que ha facilitado enormemente el diagnóstico de rutina, disminuyendo la necesidad de trabajar con tejido congelado, la inmunohistoquímica se utiliza para:

- 1.- Diagnóstico diferencial de los linfomas con neoplasias de otras estirpes celulares.
- 2.- Diagnóstico diferencial entre procesos linfoproliferativos benignos y malignos.
- 3.- Identificación de otros aspectos como antígenos de proliferación y proteínas específicas de determinados tipos de linfoma (Laborda ,2000).

C.- DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN PATOLOGÍA ONCOLÓGICA.

Las técnicas de inmunohistoquímica desempeñan un papel fundamental para definir el fenotipo molecular del tumor complementado en ocasiones con estudios del genotipo en busca de mutaciones, traslocaciones, amplificaciones genéticas y otras anomalías. En Patología oncológica, además de los parámetros morfológicos clásicos, es cada vez más importante disponer del perfil molecular de la neoplasia incluyendo factores de pronóstico y de predicción de respuesta al tratamiento.

La inmunohistoquímica es una herramienta muy útil en el diagnóstico de la mayoría de las neoplasias y ha sido ampliamente utilizada en la clasificación más recientemente y en la determinación de las líneas de diferenciación de algunos tipos

de tumores. Al igual que en cualquier otra técnica diagnóstica, tiene errores y fallos que dependen mucho de la metodología empleada y de su control de calidad de la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos específicos para prevenir errores en la interpretación. La IHQ ha sido muy importante en el diagnóstico de los tumores de partes blandas por causa de la heterogeneidad de estas lesiones.

Creemos que esta técnica constituye una ayuda pero no sustituye a la microscopía óptica de rutina y que un patólogo experimentado puede diagnosticar con exactitud casi todos los tipos de tumores. Sin embargo, la IHQ es extremadamente importante para el diagnóstico de algunos tipos de tumores de partes blandas, que debido a su similitud morfológica pueden ser erróneamente clasificados.

A continuación se enumeran algunas aplicaciones en la patología oncológica:

- Estudio de metástasis de origen desconocido.
- Clasificación de neoplasias indiferenciadas: (Carcinomas, vs Linfoma. y vs Melanoma).
- Adenocarcinoma vs Mesotelioma.
- Carcinoma neuroendocrino vs Linfoma vs Adenocarcinoma.
- Carcinoma escamoso pseudosarcomatoso vs Sarcoma.
- Melanoma vs Enfermedad de Paget vs Bowen.
- Tumor de Merkel vs Tumor anexial cutáneo vs Sarcoma.
- Carcinoma de próstata vs Carcinoma de vejiga.
- Glioma vs Linfoma.
- Seminoma vs Carcinoma embrionario.
- Clasificación de tumores de partes blandas.
- Clasificación de tumores de ovario.
- Carcinoma de tiroides vs paratiroides.
- Carcinoma medular de tiroides vs Carcinoma folicular.
- Neoplasias endocrinas. Estudio del perfil hormonal (hipófisis, páncreas, gastrointestinal) (Puig, 2003).

D.- DETECCIÓN DE CÉLULAS TIROTROPAS O PRODUCTORAS DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE LA GLÁNDULA TIROIDES (TSH).

En el desarrollo de la adenohipófisis, las células productoras de TSH se identifican en los fetos a partir de la 13 semana como se deduce de los estudios inmunohistoquímicos realizados usando anticuerpos monoclonales anti - TSH.

Estas técnicas permiten diferenciar con bastante precisión los diferentes tipos de células adenohipofisarias, en la actualidad han sido duplicadas con notables ventajas por las técnicas de inmunohistoquímica que en la mayoría de los casos no han hecho mas que confirmar los resultados obtenidos con ellas, La combinación de técnicas inmunohistoquímicas y de análisis de imágenes, permitiendo "cuantificar" los niveles hormonales hipofisarios obteniéndose resultados que en la mayoría de los casos son suposibles a los obtenidos por métodos analíticos (Valle *et al*, 2003).

E.- DETERMINACIÓN DE LA ESTIRPE HISTOLÓGICA DE NEOPLASIAS.

La inmunohistoquímica ha sido aplicada para el estudio de neoplasias epiteliales de canino y felino mostrándose como una herramienta para el diagnóstico de neoplasias en Medicina Veterinaria (Briones, 2002; Cruz, 2003).

Esta técnica constituye una ayuda pero no sustituye a la microscopia óptima de rutina y que un patólogo bien experimentado puede diagnosticar con exactitud casi todos estos tipos de tumores, sin embargo, la inmunohistoquímica es extremadamente importante para el diagnóstico de algunos tipos de tumores de partes blandas que debido a su similitud morfológica, pueden ser clasificados erróneamente, es también muy útil para diferenciar otras neoplasias tales como el melanoma, carcinoma o linfoma (Cruz, 2003).

Para llegar al diagnóstico de ciertas neoplasias en ocasiones se requiere realizar varias inmunotinciones con diversos anticuerpos, y el diagnóstico se realiza al integrar los resultados positivos y negativos. El mesotelioma es positivo a citoqueratina puede serlo o no al antígeno epitelial de membrana y a la vimetina, pero debe ser consistentemente negativo para el antígeno carcinoembrionario (Rodríguez, 1997). Además de contar con utilidad diagnóstica en identificación de

diferenciación y de marcadores pronosticadores de neoplasias (marcadores tumorales), ejemplo, es posible la identificación de los productos de oncogenes y de genes supresores de tumores con anticuerpos monoclonales especialmente contra c-erbB2, bcl-2, bcl2, p21, Rb1 y p53 (Mahiques, 2003).

Al igual que cualquier otra técnica diagnóstica tiene errores y fallos que dependen mucho de la metodología empleada y de su control de calidad, de la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos empleados de una apropiada fijación de los tejidos y del empleo de un panel de anticuerpo específico para prevenir errores de interpretación (Cruz, 2003).

XV.- CUADRO 1

ALGUNAS TÉCNICAS DE IHQ PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS.

ANTÍGENO A DETECTAR	CÉLULA QUE MARCA
actina músculo – específica	Células musculares y mioepiteliales, pericitos
Antígeno carcino embrionario (CEA)	Células de origen glandular excepto glándulas sebáceas Neoplasias epiteliales malignas secretoras de mucina
Antígeno de membrana epitelial (EMA)	Células de origen epitelial y mesotelial
Antígeno leucocitario Común (LCA)	leucocitos
Citqueratina	Epitelio queratinizado y no queratinizado, células mesoteliales. Para diferenciar tumores epiteliales de los neuroectodermo
Cromogranina	Células de naturaleza neuroendocrina
Desmina	Músculo liso y estriado
Enolasa Neurona específica (ENE)	Neuronas, células de Schwann, médula adrenal y células del neuroectodermo
Factor VIII	Endotelios y megacariocitos
HMB45	Melanoma (tirosinasa)
Inmunoglobulinas (cadenas ligeras Kappa y lambda)	Células plasmáticas, linfomas B, sarcoma inmunoblastico.
Lisosoma, muramidasa	Macrófagos o histiocitos
Mioglobina y tropomiosina	Músculo estriado
Pan B	Linfocitos B
Pan T (CD 4, CD8 etc.)	Linfocitos T
Proteína Ácida glio fibrilar (GFAP)	Astrositos normales y neoplásicos.
Sinaptofisina	Células de origen neuroectodérmico, neuronas y nervio periférico
Vimentina	Células mesenquimales, fibroblastos, cuadroblastos, osteoblastos y macrófagos.

(Vanda y Valero, 1997)

XVI.-POSIBILIDADES DE QUE SE ALTEREN LOS RESULTADOS Y DAR FALSOS POSITIVOS.

- 1.- No deben emitirse diagnósticos basados en reacciones que solo se observan en los bordes del tejido, ni en las zonas desgarradas por melladuras de la cuchilla del micrótomo.
- 2.- Los restos de tejido necrosado o autolisado, zonas de hemorragia y células apachurradas pueden adsorber en forma inespecífica los anticuerpos resultado como positivo a muchos anticuerpos. Solo debe considerarse la tinción de células viables.
- 3.- Algunas moléculas como la proteína A del *Staphylococcus* pueden unirse a la porción Fe de los anticuerpos primarios utilizados.
- 4.- Si se utiliza inmunoperoxidasa endógena presente en muchos tejidos, Igualmente si se usa inmunofosfatasa puede ser necesario bloquear la fosfatasa endógena con levamisol.
- 5.- Los cortes excesivamente gruesos pueden tener tinción inespecífica.
- 6.- Los macrófagos pueden tener antígenos que han fagocitado de otras células.
7. – El exceso de adhesivos para cortes (especialmente albúmina y gelatina) pueden causar que los anticuerpos se peguen a la laminilla en forma inespecífica (Vanda y Valero., 1997).

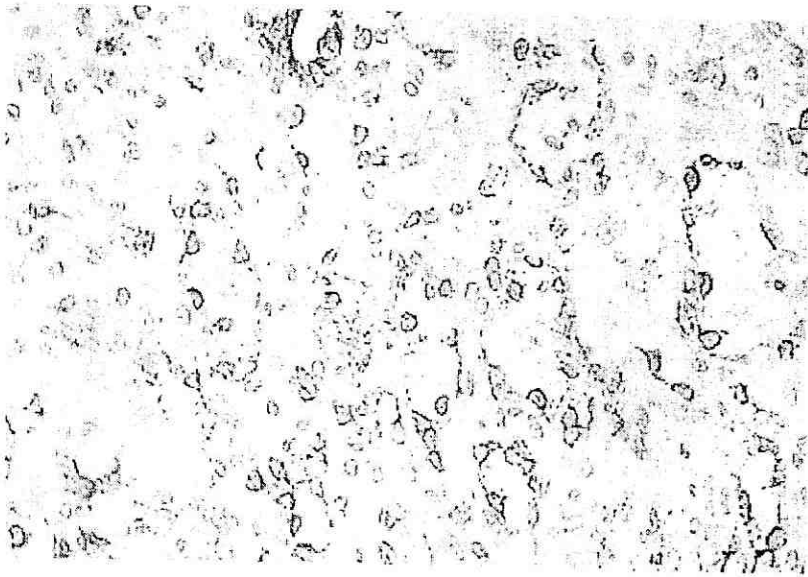
XVII.- POSIBILIDADES DE QUE SE ALTEREN LOS RESULTADOS Y DAR FALSOS NEGATIVOS.

- 1.- Si se altera el orden de los pasos en las técnicas, estas no funcionarán. Igual puede pasar si se omiten pasos.
- 2.- Si las soluciones amortiguadas contienen azida de sodi (como preservador) no funcionará la peroxidasa.
- 3.- Si la cantidad de agua oxigenada en la solución de sustrato es muy baja o muy alta, no se desarrollará adecuadamente la reacción.
- 4.- Si el tejido no se fijó adecuadamente el antígeno se “lavará”.
- 5.- Si el tejido se sobrefija, los antígenos pueden desnaturalizarse o “enmascararse”

- 6.- Si se emplearon temperaturas excesivamente altas los antígenos pueden desnaturalizarse.
- 7.- Si el tejido se seca al evaporarse los reactivos colocados sobre la laminilla teñirán adecuadamente. Para evitar esto deben emplearse cámaras húmedas en las incubaciones prolongadas.
- 8.- Cuando no se retira el exceso de solución de enjuague, los reactivos siguientes se diluyen (especialmente el suero bloqueador que diluye al anticuerpo primario).
- 9.- Si se usan cromógenos con productos coloreados hidrosolubles (AEC, rojo nuclear o cloronaftol) no pueden usarse alcoholes ni xilol en la tinción de contraste ni en el montaje del cubreobjetos, porque disolverían el producto coloreado.
- 10.- Los tejidos sobre calentados en las tinas de parafina en los cortes pueden cubrir las proteínas a identificar.
- 11.- Los restos de parafina en los cortes pueden degradarse rápidamente a temperatura ambiente.
- 12.- La potencia de los antisueros almacenados disminuye con el paso del tiempo.
- 13.- Algunos anticuerpos monoclonales son particularmente inestables y tienen una vida de anaquel muy corta, aún en ultra congelación a -60° centígrados.
- 14.- Las congelaciones y descongelaciones repetidas de muestras y reactivos generalmente disminuyen en la intensidad de la reacción.

Todo esto enfatiza la importancia de llevar un control de calidad en las técnicas de laboratorio e incluir en laminillas testigos en cada lote de IHQ (Vanda y Valero., 1997).

XVIII.-IMÁGENES UTILIZADAS EN INMUNOHISTOQUIMICA



Utilizando la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal frente al Factor VIII, se delimitan los endotelios vasculares. LSAB x 200 (Sánchez, 2001)



Con técnica inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal anti CD31, se delimitan los endotelios vasculares y muchas de las células intersticiales en mayor proporción que frente a FVIII. LSAB x.200 (Sánchez, 2001)

LITERATURA CITADA

1. **Catena M., Soto P., Echeverría H., Monteavaro C. y Mazalli A. 2003.** Detección de *campylobacter fetus venerealis* mediante inmunohistoquímica en el tracto reproductor de hembras bovinas infectadas experimentalmente.
<http://www.exopol.com>
2. **Calderón M., Muñoz J., Venegas F. y Araya N. 2002.** El anticuerpo monoclonal Ki-67 como elemento de valor diagnóstico y pronóstico en neoplasias mamarias caninas.
<http://www.scielo.cl/scielo.php?script=arttext&pid=so716>
3. **Chávez E. 2003.** Técnicas diagnósticas para el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS)
<http://www.ergomix.com/nuevo/prueba/areadeporcicultura1.asp>
4. **Combessies M. G. 2003.** *Neospora caninum* un importante causal de aborto bovino.
<http://azul.com.ar/laboratorio/article.php?sid=23>
5. **Cruz M. J., Martínez I., Caballero A. y Pérez L. 2003.** Análisis del término histiocitoma fibroso maligno pleomórfico.
http://www.infomed.sld.cu/revistas/onc/voll5_1_99/onc02199.html.
6. **Fresno F. M. 2002.** Experiencia en la determinación de Her-2/neu con la técnica Herceptest.
<Http://conganat.uninet.edu/conferencias/COO3/>.
7. **Frontera E. 2003.** Localización inmunohistoquímica de antígenos de *Ascaris suum*.
<http://www.congresocbta.unam.mx/MV10.html>
8. **González B. S. 2003.** Técnicas Anatómopatológicas.
http://www.med.uchile.cl/otros/dra_ancic/capitulo17.html.
9. **González B. S.a. 2001.** Inmunohistoquímica.
http://med.uchile.cl/otros/dra_ancic/capitulo17.html.
10. **Laborda R. M; 2000.** Aplicaciones de inmunohistoquímica al diagnóstico de los procesos linfoproliferativos cutáneos.
http://www.grupoaulamedica.com/web/archivos_rojos/revistas_actual.cfm.
11. **Ledesma D. 2002.** Tricomoniasis.
http://www.oie.int/esp/normes/mmanualo/E_00026.html.

12. León C. R., Plata J. y Cordero B. M; 2003. Aplicaciones de inmunohistoquímica.
<http://www.colvet.cienc.vet>
13. Lértora J. 2003. Inmunohistoquímica en bulbos pilosos para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con diarrea viral bovina.
<http://www.selectinos/news/display.hpl/uurd>.
14. Mahiques M. A. 2003. Inmunohistoquímica.
<http://www.arturomahiques.com/histologia.htm.inmunohistoquimica>.
15. Montoya F. 1991. Procedimientos modernos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.
http://www.medina.udea.edu.co/iatreia/vol_04%20.
16. Oropeza F. S., Rodríguez P. D., Goyenechea H. A., Hernández E. B. y González M. Z. 1998. Detección y caracterización rápida de los virus de influenza A y B en secreciones nasofaríngeas mediante el método de inmunoperoxidasa.
http://www.infomed.sld.cu/revistas/mtr/vol50_1_98/mtr08198.htm.
17. Pascual I. G. 2002. Técnicas de inmunohistoquímica en las enfermedades por priones. <http://plazasol.uson.mx/hge/revistas/cuatro.htm>.
18. Pichardo B. R. 2000. Los estudios de inmunohistoquímica en el departamento de Anatomía Patológica de Médica Sur.
<http://www.elportalmedico.com.mx/boletines>.
19. Puig X. 2003. Inmunohistoquímica
<http://www.histopat.es/html/histopat/pag22>.
20. Rivera G. 2000. Distribución del virus de la diarrea viral bovina en tejidos de un bovino persistentemente infectado.
<http://www.visionveterinaria.com/articulos/18.html>
21. Riverón R. L., Álvarez M. D., Pérez H. E., Noa R.E., Rubial B. I. y Delgado D. I. 2003. Empleo de la técnica de inmunoperoxidasa en la detección de gp41 en cultivos celulares infectados.
http://www.infomed.sld.cu/revistas/hih/voll3_1_97/hih6a197.html.
22. Vanda C.B. y Valero E. G. 1997. Memorias del curso de inmunohistoquímica. Congreso de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios. AC. México, 1997.

23. **Sánchez J. V.** 2001. Como se estudian las células.
<http://www.inia.es/cieex/segun4.html>
24. **Sánchez J. V.** 2003. Como se estudian las inmunoglobulinas.
<http://www.inia.es/cieex/QUINTO1.html>.
25. **Sánchez A. M.** 2001. imágenes.
<http://www.uninel.edu/zape/pat/casos/001/>
26. **Santa J. C.** 2002. Inmunohistoquímica tumoral cutánea.
<http://www.seap.es/reuniones/almagro2000/scruz/inmuno.htm>
27. **Sanz E. J.** 2002. De patología celular a la molecular.
<http://www.inia.es/cieex/segun4.html>.
28. **Sitjar M.** 2002. Algunas de las patologías digestivas más frecuentes del ganado porcino y que aparecen especialmente en el periodo de tiempo que sigue al destete.
http://www.colvet.es/infovet/abr00/ciencias_v/articulo_1.html
29. **Valle E. y Vega A. J.** 2003. Las células tirotropas o productoras de la hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH).
<http://www.uninet.edu>.
30. **Vécino E.** 2002. Técnica de inmunohistoquímica.
<http://www.uninel.edu/zape/pat/casos/001/andujar>
31. **Yebra F., Fernández J. A. Ortiz R., Gómez C. y Fuente A.** 2002. Efectividad de anticuerpos caducados en Técnicas de inmunohistoquímica.
<http://conganat.uninet.edu/IVCVHAP/COMUNICACIÓN-E>.