

Artículos originales

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA A.B.C. EN GANGLIO LINFÁTICO POR CONGELACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE LINFOMAS

Denis Calderón Ardila*, Carlos Saavedra**, Sandra Quijano***, Oscar Orozco****

Resumen

Los linfomas ocupan el quinto lugar en frecuencia entre todas las neoplasias diagnosticadas y tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología, lo que demuestra un alto índice de morbilidad y consecuente mortalidad. Es así como surge la idea de realizar un estudio cuidadoso y profundo con los ganglios linfáticos por congelación, que permita la investigación, clasificación y diagnóstico preciso de los linfomas. Para esto, fueron seleccionados 45 casos del año de 1995 en los que se realizó la valoración de la técnica de inmunoperoxidasa A.B.C como apoyo diagnóstico, observándose que en 84% el material de inmunotipificación apoyó el diagnóstico y en 16% de los casos no ayudó.

Introducción

El ganglio linfático, por su gran contenido linfocitario y escaso tejido fibroconectivo, es uno de los órganos más difíciles de preservar, pues experimenta una lisis muy rápida, por lo cual es de vital importancia la manipulación adecuada del mismo y del procedimiento a seguir para obtener un diagnóstico preciso (1). Los ganglios linfáticos son estructuras definidas, de forma oval y de un tamaño que varía entre algunos milímetros y 1 ó 2 cm de diámetro. Tienen una consistencia blanda y al corte su superficie es blanco-grisácea; están rodeados por una cápsula de tejido conjuntivo desde la que se extienden las trabéculas, de longitud variable, hacia el interior del ganglio.

El propósito de este estudio es estandarizar el método de inmunoperoxidasa A.B.C en ganglio linfático por congelación, para fines diagnósticos, de investigación y seguimiento de los linfomas. Para la verificación de este estudio se tomaron los primeros 45 casos estudiados en el laboratorio de patología del Instituto Nacional de Cancerología, durante el segundo semestre de 1995.

Hoy las técnicas inmunohistoquímicas tienen gran importancia en campos como la medicina y la investigación. Estos métodos son utilizados para detectar antígenos celulares o tisulares mediante reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Puesto que utilizan una enzima como trazador o mar-

cadador, para visualizar el lugar de la reacción Ag-Ac se añade al final de ésta, el sustrato de la enzima, más una sustancia denominada cromógeno. El producto de éste interacción, a su vez, sobre el cromógeno dando lugar a un precipitado insoluble y coloreado. Como trazadores pueden emplearse distintas enzimas; la utilizada en este estudio es la peroxidasa, gracias a importantes características que explican su uso (2).

Entre ellos cabe destacar el hecho de ser una molécula pequeña que permite la unión del anticuerpo a sitios adyacentes a esta; su fácil obtención y purificación; la poca cantidad de la misma presente en los tejidos normales, de tal modo que es fácil el bloqueo de la actividad endógena (excepto en aquellos especímenes que presentan gran número de células sanguíneas).

Materiales y métodos

Las biopsias de ganglio fueron remitidas al laboratorio de anatomía patológica inmediatamente después de la obtención, transportadas en un contenedor seco a -4°C sobre una base de hielo y sobre una gasa estéril humedecida en suero salino.

En el laboratorio la biopsia fue registrada, designándosele un número y posteriormente se realizó una descripción macroscópica para luego fraccionarla en dos partes iguales.

Una vez tomadas las citologías directas del material, una de ellas se coloreó con Wright y las otras fueron utilizadas para coloraciones citoquímicas. Una de las mitades del ganglio linfático se fraccionó en finas láminas, que fueron fijadas en formol tamponado y la otra mitad se congeló

*Departamento de Patología, Hospital de San José.

**Departamento de Patología y Hematología, Instituto Nacional de Cancerología.

***Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia.

en nitrógeno líquido y posteriormente a -80°C para luego realizar cortes por congelación en el crióstato a 3 micras, tras la inclusión en una gota de medio de imbibición líquido (Tissue-Tek II O.C.T). Una vez obtenidos los cortes se capturaron directamente de la superficie de la cuchilla empleando un portaobjetos previamente impregnado con un adhesivo (Organoxilano: Amino-propil-trietoxilano) marca sigma.

Con el fin de realizar el análisis histopatológico fue coloreada una lámina con hematoxilina-eosina y las demás fueron utilizadas para la estandarización de la técnica inmunoperoxidasa A.B.C. Para este estudio se utilizó el kit de vector para inmunoperoxidasa (3).

Después de fijar las láminas en una solución de acetona fría por 5 minutos y lavarlas con P.B.S (fosfato de sodio monobásico y dibásico 0,01 M, cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,4), se secaron y colocaron en la cámara húmeda para adicionar la solución metanol-peróxido (inhibe peroxidasa endógena) por media hora. Luego del lavado con P.B.S por 5 minutos, pasaron a la cámara húmeda donde se les agregó suero normal de caballo (como un bloqueo adicional) por 30 minutos.

Después, fue eliminado el exceso de suero y secado el tejido para incubar con el anticuerpo primario (monoclonales marca Dako) durante una hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos utilizados fueron: (Población linfoide T: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, Precursores: CD10, TdT. Población mieloide (granulocitos/monocitos): CD13, CD14, CD33. Población linfoide B: CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, KAPPA, LAMBDA. Antígenos de activación linfocitaria: CD25, CD30, HLA-I es un monoclonal de la A.T.C.C. (*American type cell culture*) WG32. Células hematopoyéticas: CD45 (4).

Tras el lavado con P.B.S por 5 minutos y la incubación con el anticuerpo secundario (anti-ratón biotinado) por 30 minutos, se volvió a lavar con P.B.S por 5 minutos y a incubar durante una hora con el complejo A.B.C (Avidina-biotina-peroxidasa). El paso siguiente fue lavado adicional con P.B.S, revelado con D.A.B (Diaminobencidina 1 mg/ml) + peróxido de hidrógeno a 0.3% por 5 minutos, para terminar lavando con agua corriente y proceder al contraste, mediante incubación en sulfato de cobre a 0,5% por 5 minutos.

Fueron realizados varios lavados con agua corriente, para aplicar contraste con hematoxilina por 5 minutos, lavado, pase por agua amoniacal, de nuevo lavado y deshidratación en alcoholes a 90, 95 y 100% por 2 minutos en cada uno, para finalizar aclarando en xilol, antes del montaje y la visualización al microscopio, donde se observaron los lugares con inmunotinción positiva de color pardo negruzco y los lugares con inmunotinción negativa de color azul (Figura 1).

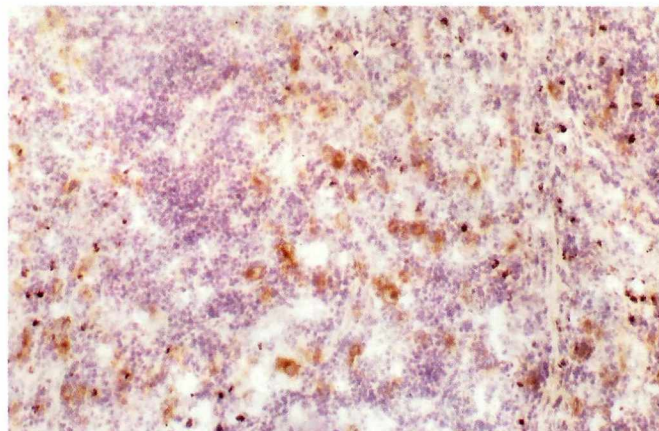


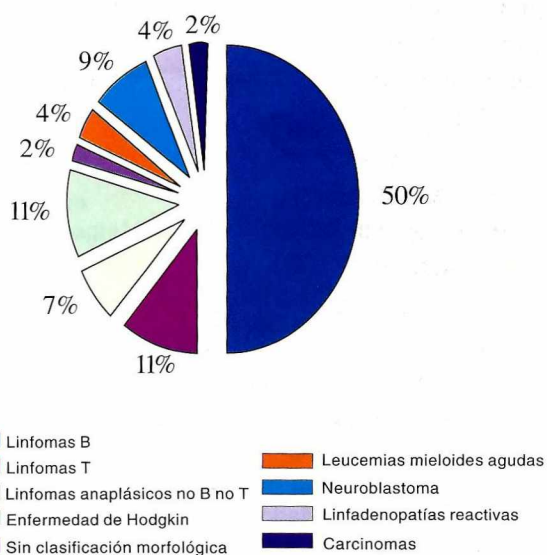
Figura 1: Imagen histológica de biopsia de ganglio linfático (20x) que muestra el resultado de la técnica de inmunoperoxidasa-ABC. En este caso se trata de un linfoma anaplásico, positivo para CD30.

Como controles de la expresión de estos marcadores fueron utilizados cortes de amígdala normal, tratados con la misma técnica (5,6).

Resultados

El material de inmunofenotipo apoyó el diagnóstico en 38 casos (84%) y en 7 casos no ayudó (16%) debido a la calidad del corte y al fondo.

De los 45 casos estudiados se identificaron 22 linfomas B (50%); 5 linfomas T (11%); 3 linfomas anaplásicos no B no T (7%); 5 enfermedad de Hodgkin (11%); 1 sin clasificación morfológica (2%); 2 leucemias mieloides agudas o sarcomas granulocíticos (4%); 4 linfadenopatías reactivas (9%); 3 tumores metastásicos (6%); 2 carcinomas y 1 neuroblastoma (Figura 2)



El análisis de 430 marcadores en los 45 casos, permitió la clasificación inmunológica de un grupo de lesiones ganglionares (Tabla).

Discusión

La distribución de lesiones a pesar de la muestra tan pequeña, está, en términos generales, de acuerdo con lo descrito previamente en Colombia y abre la posibilidad de un diagnóstico más preciso en el trabajo rutinario de patología del Instituto Nacional de Cancerología, en el área de ganglio linfático.

Tabla

Distribución de pacientes según la clasificación inmunológica de las lesiones ganglionares	
Clasificación	N
Linfoma B centro folicular.	
Grado citológico I (Difuso)	4
LNH de centro folicular.	
Grado citológico I (Difuso)	1
Leucemia mieloide aguda con componente monocítico	1
Linfoma T periférico	1
Linfoma linfoblástico T	2
Hiperplasia de predominio paracortical	1
EH. Esclerosis nodular grado I	4
Linfoma B linfocítico	1
Linfoma cutáneo de células T	2
Linfoma anaplásico	2
LNH difuso de celularidad mixta.	
Grado intermedio de malignidad	1
Linfoma B difuso de célula grande	6
Linfoma B del centro folicular.	
Grado citológico II (Difuso)	2
Hiperplasia mixta	2
Neuroblastoma	1
Adenocarcinoma metastásico	1
EH en recaída	1
Linfoma B centrofolicular	1
Linfoma B de bajo grado asociado a mucosas	1
Sarcoma granulocítico	1
Linfoma B semejante a Burkitt	1
Linfoma B linfoplasmocitario polimórfico	1
Compromiso por linfoma anaplásico	1
Neoplasia linfoproliferativa B	1
Linfadenopatía reactiva	1
LNH B difuso de célula grande	1
Carcinoma indiferenciado	1
Linfoma B no subclasificable	1
Linfoma B linfoblástico	1
Total	45

De los marcadores considerados hay un resultado favorable al utilizar CD2, CD3, CD7, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD13, CD33, CD4, CD8, CD19. Por otra parte, no fueron favorables CD10, CD14 y no fue posible estandarizar Kappa y Lambda (7, 8).

Los resultados obtenidos indican que esta técnica contribuye a la realización de un mejor diagnóstico de los diferentes tipos de linfomas, ayudando a un mejor y efectivo tratamiento de la lesión en los pacientes que ingresan a la institución.

Conclusiones

Este trabajo permitió la estandarización de la técnica de inmunotipificación en el Instituto Nacional de Cancerología, en particular respecto a la recepción del ganglio linfático, el transporte y el almacenamiento en nitrógeno líquido de forma rutinaria.

El esquema empleado hizo posible obtener tejidos por congelación para ser estudiados con un grupo mínimo de anticuerpos monoclonales.

De esta manera, es posible la clasificación inmunofenotípica de un grupo de lesiones ganglionares, en particular de los linfomas.

Referencias

1. Cotran R. Patología estructural y funcional. 4ª ed. Madrid: Mc. Graw-Hill; 1990: 741-94.
2. Magrath I T. Malignant non-Hodgkin's lymphoma in children. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 1987: 477.
3. Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic and cytologic working classification of acute leukemia. Cancer genet. Cytogenet, 1988.
4. Garcia R. Laboratorio de anatomía patológica. Madrid: Mc Graw-Hill; 1993: 343-48, 356-65, 614-28.
5. Bancroft J. Manual of histological techniques. New York: Churchill Livingstone; 1984: 195-203.
6. Prophet E. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas armadas de los Estados Unidos de America (AFIP). Washington. 1995; 69-72, 253-261.
7. Burkitt G. Histología funcional. 2ª ed. Barcelona: Editorial JIMS; 1987: 161-71.
8. Ross y Romrell. Histología. Texto y atlas a color. 2ª edición Panamericana. 302, 304, 310-313.