

INMUNOCITOQUÍMICA PARA LÍQUIDOS DE PLEURA Y PERITONEO

Estandarización de la técnica en el Hospital de San José

Claudia Patricia Rivera Tibambre,* Andrés Ricardo Rodríguez Romero,* Paola Andrea Oviedo Méndez* y Samanta Alejandra Velásquez Ojeda*

Resumen

El objetivo de esta investigación fue estandarizar y crear un protocolo para una técnica de inmunocitoquímica en líquidos pleural y peritoneal, procedimiento de gran utilidad como ayuda diagnóstica cuando no se sabe con certeza donde se encuentra el tumor primario. Incluye la obtención del líquido para determinar mediante el procedimiento tradicional si es positivo para malignidad, el método de procesamiento y el desarrollo de la técnica inmunocitoquímica.

Palabras clave: inmunohistoquímica, anticuerpos, antígenos, derrames pleurales y peritoneales.

Abreviaturas: Ac, anticuerpos; Ag, antígenos; DAB, diaminobenzidina; CEA, antígeno carcinoembrionario; TTF-1, factor de transcripción tiroidea; CK7, queratina.

Introducción

El origen de la técnica de inmunocitoquímica se debe al trabajo de Albert Conns llevado a cabo en 1941, cuando describió cómo marcar los anticuerpos directamente con isotiocianato de fluoresceína. Desde entonces los métodos inmunológicos son bastantes empleados en los laboratorios de histología, pero solo a finales de los años 80 se empezó a utilizar en los de citología. El fundamento de la técnica consiste en una prueba de inmunolocalización en la que se utiliza un Ac específico para localizar Ag químicos, también específicos, en las células. Este procedimiento ayuda a detectar y clasificar las células cancerosas.

La inmunocitoquímica es un método auxiliar importante para el diagnóstico citológico, de tal manera que no se puede catalogar como un procedimiento

único de prescripción. Esta es una técnica muy útil asistiendo los diagnósticos diferenciales de los tumores de mayores categorías. La interpretación cuidadosa de los resultados con un panel pequeño de Ac monoclonales junto con la morfología y la información clínica, pueden ayudar a alcanzar el diagnóstico específico.

Para la estandarización de la técnica de inmunocitoquímica fueron analizadas las siguientes variables:

1. Procesamiento del líquido.
2. Fijación del material obtenido.
3. Extensión en lámina tratada con novobond o histogrip.
4. Recuperación antigénica.
5. Uso de bloqueadores.
6. Tiempo de uso de DAB.
7. Contraste.

Fecha recibido: enero 20 de 2006

Fecha aceptado: marzo 23 de 2006

* Estudiantes de VI semestre, facultad de citohistotecnología, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud.

** Este trabajo fue realizado bajo la tutoría de la Dra. Pilar Archila, médica patóloga y directora del servicio de patología del Hospital de San José, el Dr. Juan Carlos Bonilla, médico patólogo del Hospital de San José, Mauricio Díaz Mondragón, citohistotecnólogo egresado de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud y de Merideidy Plazas quien se encargó de la asesoría metodológica.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo ya que se manipuló cada uno de los procedimientos establecidos en un protocolo guía de inmunohistoquímica proveniente de la casa comercial Novocastra y por medio de la metodología ensayo–error se logró estandarizar y crear un protocolo adecuado para la técnica de inmunocitoquímica.

Se escogieron muestras líquidas de peritoneo y pleura sospechosas de malignidad que llegaron a los laboratorios de patología del Hospital de San José y a otros hospitales, las cuales se estudiaron con coloración de hematoxilina–eosina para comprobar la presencia de malignidad en las muestras. Teniendo en cuenta que fueron líquidos de pleura y peritoneo, se escogió el siguiente panel de anticuerpos que es muy sensible para muestras de estos sitios y se encontraban disponibles en el servicio de patología del Hospital de San José: antígeno carcinoembrionario (CEA), factor de transcripción tiroidea (TTF-1), queratina (CK7), mesotelin y calretinin.

Hallazgos

En cuanto al procesamiento de la muestra, se realizó por medio de citocentrífuga, se trabajó por cinco minutos a 1.500 rpm para obtener material adecuado y morfología celular óptima. El mejor método para procesar el material líquido es en el citospín, pues así las células no muestran alteraciones morfológicas y hay ahorro de reactivos en comparación con un extendido. En cuanto a la fijación, se probaron cuatro procedimientos: alcohol al 96%, acetona, aire y calor. Se concluye que el primero es un buen medio fijador a pesar de que el número de Ag puede ser menor pero la preservación morfológica es adecuada. Para la técnica inmunoenzimática la acetona da buen resultado, pues a pesar de ser muy volátil es una sustancia inmunorreactiva, lo que ayuda a preservar los Ag y el número de los mismos.

Resultados

Se elaboraron 100 láminas, de las cuales 70 fueron ensayos y en 30 encontramos resultados favorables para la estandarización de la técnica de inmunocitoquímica, trabajando las variables que se representan en la **Tabla 1**.

Discusión

En este trabajo se quiso resaltar la importancia de estandarizar una técnica que hasta el momento en el Hospital de San José solo era posible en cortes histológicos. El proceso es sencillo porque puede efectuarse sobre la coloración de rutina sin necesidad de que el material se encuentre extendido en una lámina preparada, condición que hasta el momento era indispensable para realizarlo sobre un corte histológico. Para su ejecución se escogieron líquidos pleurales y peritoneales cuyo diagnóstico era positivo para malignidad. Como la mayoría de adenocarcinomas encontrados en estas muestras eran metastásicos, se escogieron marcadores como: CEA, calretin, mesothelin, CK7 y TTF-1.

El uso de la técnica de inmunocitoquímica en líquidos puede ser definitivamente concluyente, pues es un arma diagnóstica en los tumores metastásicos, como se ve en las **Figuras 1, 2, 3 y 4**. Además debe ser un procedimiento racional que obedezca siempre al esclarecimiento de un diagnóstico diferencial, planteado por el patólogo cuando se enfrenta a casos de difícil diagnóstico. Aunque el costo de técnicas como esta suele ser elevado, no es posible descartar esta posibilidad que es altamente sensible y específica, pues sus desventajas son muy pocas en comparación con el procedimiento realizado en cortes histológicos, ya que en este caso es necesario seguir unos parámetros específicos para obtener buenos resultados.

La tarea de los patólogos es diagnosticar neoplasias correctas para así poder escoger la terapia

Tabla I. Variables para estandarizar el proceso técnico

VARIABLE	ENSAYO	RESULTADO	RESULTADO ÓPTIMO
FIJACIÓN	Alcohol 95%	Buen método, no altera epítopes pero su número puede ser limitado.	Fijar con acetona durante 10 min es la mejor opción porque es inmunorreactiva y ayuda a la conservación de los epítopes y su número.
	Acetona	Buen método por ser sustancia inmunorreactiva y ayudar a conservar epítopes.	
	Al aire	No es recomendable para procesos inmunoenzimáticos.	
	Al calor	No es recomendable ya que altera la morfología.	
PROCESAMIENTO	Citocentrífuga por 5 min a 1.500 rpm	El número de células puede ser limitado y el gasto de reactivos alto.	El procesamiento en citospín es una muy buena opción, teniendo en cuenta su uso adecuado ya que errores en el procesamiento pueden dificultar la técnica.
	Citospín	El material se reúne en un punto con el menor gasto de reactivo y rápida evaluación del material.	
EXTENSIÓN EN LÁMINA ADHESIVA	Extensión en lámina adhesiva	El material no se desprendió, pero no influye en el proceso inmunoenzimático.	No es necesario extender el material líquido en lámina adhesiva. Usar un buen medio de fijación
	Extensión en lámina no adhesiva.	El material no se desprendió.	
SOLUCIÓN RECUPERADORA	Recuperación antigénica.	El número de epítopes es alto y facilita la marcación inmune.	La citología líquida no requiere la recuperación antigénica, pero la recuperación o no de epítopes no altera el procedimiento.
	No recuperación antigénica.	Se evidencian los epítopes y por tanto el inmunomarcaje es adecuado.	
USO DE BLOQUEADORES	Peróxido de hidrógeno de 15 a 20 min	El peróxido ayuda a bloquear la peroxidasa endógena y evitar los falsos positivos	Usar bloqueadores primarios y secundarios es importante en inmunocitoquímica pues evitan reacciones cruzadas y fondo sucio inadecuado.
	Uso de bloqueo secundario.	Bloqueadores como avidina-biotina, cashblock u otros evitaron fondo sucio que puede dar falsos positivos.	
	No uso de bloqueadores.	El fondo sucio puede ser abundante	
DAB	DAB por 5 min.	La DAB por 5 min es un tiempo excesivo causando reacciones indeseadas.	El revelador es importante teniendo en cuenta su preparación y tiempo ya que es adecuado de 1 a 2 min. Si la DAB no muestra
	DAB de 1 a 2 min.	Es el tiempo adecuado con revelados óptimos.	
CONTRASTE	Hematoxilina de Harris	Es la más usada y su tiempo adecuado es de 2 a 3 min para citología líquida.	El contraste destaca los detalles nucleares; el verde brillante siendo medio de contraste, no ayuda a resaltar estas características.
	Hematoxilina de Weigert	Esta hematoxilina puede dar contraste.	

adecuada para el paciente. Es por ello que quisiéramos aportar la estandarización de esta técnica para el mejoramiento no solo en la investigación

patológica, sino también en el uso de marcadores que pueden ser específicos y de gran ayuda diagnóstica.

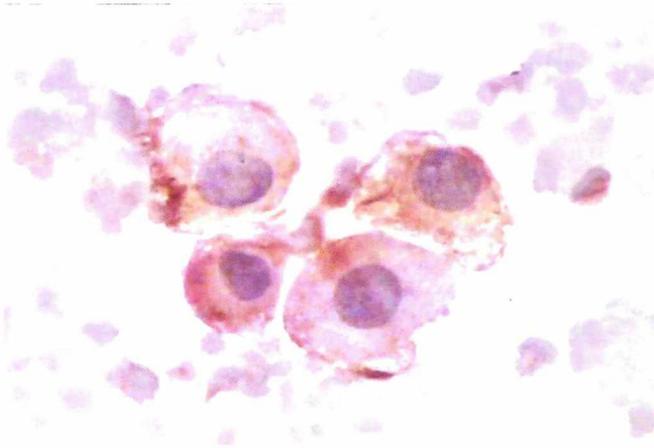


Figura 1. CEA positivo.

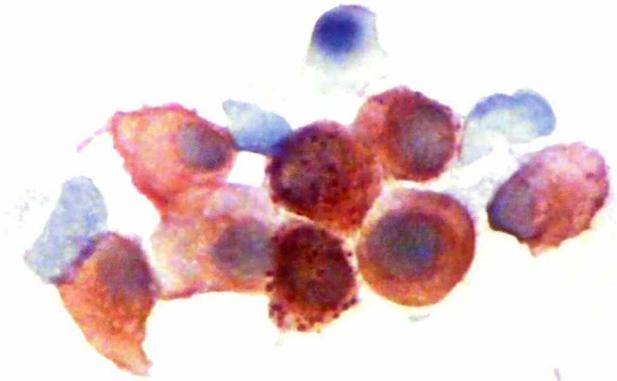


Figura 2. CK7 positivo.

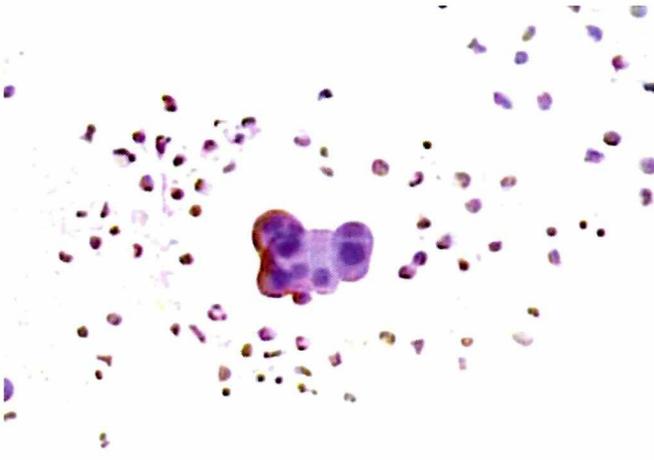


Figura 3. Mesotelin positivo sobre coloración de Papanicolaou.

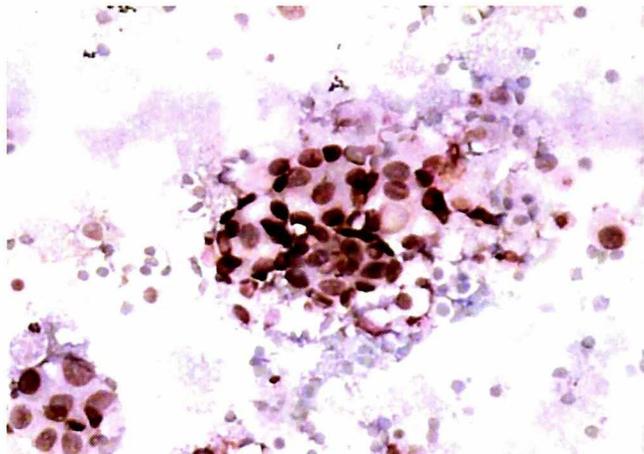


Figura 4. TTF-I positivo.

Lecturas recomendadas

- Bancroft John. Immunocytochemical techniques. En: Gamble Marilyn Theory and practice of techniques histological. 6 ed. London: Livingstone, 2002. p. 444-458.
- Bibbo Marluce. Immunocytochemistry. En: Osborn Mary Wenalncjusz Damagala. Comprehensive cytopathology. Chicago: Illinois: Saunders Company, 1991. p. 1036-1039.
- Chin Yang; Lazcano Oscar, Pierre Robert. Immunocytochemical identification of cells in serous effusions. Am. J Clin Pathol. 1987; 88: 696-706.
- Demay , Richard. Brown stains and magic markers. En: Demay, Richard. The Art and science of cytopathology. Chicago; ASCP Press, 1999. p. 16-19.
- Demay, Richard; American Society of clinical pathologists. Fluids. En: Demay, Richard. The art and science of cytopathology. Chicago: ASCP Press, 1999. p.258-315.
- Ducatman Bárbara Cibas, Edmund. Peritoneal Washings. En: Ducatman Bárbara. Cytology. 2 ed. London: Saunders Company, 2003. p. 145-85.