

# Aspectos básicos de la inmunohistoquímica en el carcinoma de laringe

Urpegui García AM  
Abenia Ingalaturre JM  
Alfonso Collado JI  
Sancho Serrano E  
Escorial Sanz O  
Vallés Varela H

Servicio de Otorrinolaringología  
Hospital Clínico Universitario  
"Lozano Blesa". Zaragoza

## RESUMEN

Nuestro objetivo ha sido elaborar un sencillo resumen de los conceptos básicos de la inmunohistoquímica y su aplicación práctica en la clínica diaria, así como de la patología genética asociada al carcinoma de laringe. Evaluamos la expresión inmunohistoquímica de algunos marcadores relacionados con este carcinoma.

## PALABRAS CLAVE:

Inmunohistoquímica p53, Bcl-2, Retinoblastoma, Carcinoma de laringe.

## SUMMARY

*ABSTRACT: Our objective is to repon a suminary of immunohistochemjcal concepts an their practical applications in clinic, as well as genetic pathology associated in many cases of laryngeal neoplasms. Immunohistochemical expression of several markers related to laryngeal carcinomas are evaluated.*

## KEY WORDS:

*Immunohistochemical, p53, Bcl-2, Retinoblastoma, Laryngeal neoplasms.*

## Conceptos Básicos

La capacidad de los anticuerpos para unirse de manera específica con su antígeno se ha utilizado en el campo de la histopatología para detectar diversas sustancias.

Inicialmente, la primera técnica basada en estas propiedades de los anticuerpos fue la inmunofluorescencia. Los inconvenientes de este método son varios: es preciso un microscopio especial de elevado costo, no es posible utilizar grandes aumentos, puesto que disminuye la definición, ciertos tejidos presentan autofluorescencia, la emisión de fluorescencia es pasajera, lo cual impide la revisión de las piezas, y por último, es necesario que el tejido sea fresco, por lo que no es posible llevar a cabo estudios retrospectivos (1).

Las técnicas inmunohistoquímicas surgieron con el objetivo de superar las trabas de la anterior. Estas se basan en el reconocimiento de un tejido con capacidad antigénica por un anticuerpo primario, al cual se une una o varias moléculas con actividad enzimática, sobre todo la peroxidasa de rábano -técnica de inmunoperoxidasa-. Finalmente, se debe añadir al tejido una solución con el sustrato de la enzima empleada, a la vez que una sustancia cromógena, que cambiará el color al producirse la reacción entre el sustrato y el enzima. Por ejemplo, el agua oxigenada es el sustrato que reacciona con la peroxidasa en las técnicas de inmunoperoxidasa. Además de agua, en esta

reacción se libera oxígeno, el cual oxida sustancias como la diaminobencidina o el 3-amino9-etilcarbazol que se transforman en insolubles y coloreadas. Este color se visualiza fácilmente con el microscopio óptico convencional, y sirve para identificar las áreas tisulares donde se ha producido la reacción antígeno-anticuerpo.

Varias son las técnicas inmunohistoquímicas desarrolladas con el fin de aumentar la calidad del marcaje, al mismo tiempo que se intenta disminuir las tinciones inespecíficas y de fondo. A continuación se describen algunos de los métodos más comunes.

## Método directo

Es la técnica más sencilla ya que la reacción se produce entre el antígeno que se desea detectar, y el anticuerpo específico unido a la molécula de peroxidasa. La mala calidad del marcaje y la necesidad de unir cada uno de los anticuerpos a la peroxidasa, lo cual es caro y laborioso, son algunos de los inconvenientes de esta técnica.

## Método indirecto

En un primer paso se produce la reacción entre el antígeno que se desea detectar y el anticuerpo primario; la

siguiente se da entre éste y un anticuerpo secundario ligado a una molécula de peroxidasa. Esta técnica es más sensible que la anterior pero posee el inconveniente de presentar una abundante tinción inespecífica de fondo.

## Método peroxidasa-antiperoxidasa

Este método es superior a los anteriores. Consta de tres fases. En la primera, se incuba el tejido con el anticuerpo primario. Posteriormente, se aplica un anticuerpo secundario contra el primario. En la tercera y última fase, se añade a la preparación un complejo estable constituido por dos moléculas de un anticuerpo de la misma especie que el primario, unidos a tres moléculas de peroxidasa, con lo cual se consiguen tres moléculas de enzima por locus antigénico.

## Método de Avidina-Biotina-Peroxidasa

Esta técnica inmunoenzimática se basa en la alta afinidad que tiene la avidina, una glicoproteína básica, por la vitamina biotina, que es más de cien mil veces superior que la de un anticuerpo por su antígeno (1). Esta propiedad permite mejorar la intensidad del marcaje al amplificar la reacción. Después de la incubación del tejido con el anticuerpo primario, se aplica un anticuerpo secundario ligado a una molécula de biotina. Posteriormente, se incuba con un complejo constituido por moléculas de avidina y biotina conjugadas con peroxidasa, en el cual debe predominar la avidina (4:1) para que pueda unirse a las moléculas de biotina que se encuentran ligadas al anticuerpo secundario. Así, se obtienen varias moléculas de enzima por locus antigénico, ofreciendo por lo tanto, una excelente calidad de marcaje, superior en general al producido con las técnicas de peroxidasa-antiperoxidasa. Esta técnica es la más empleada y estandarizada en todos los estudios, por lo que la hemos adoptado en nuestro estudio del carcinoma de laringe.

Una variante de este método es la que utiliza estreptavidina, una proteína formada por cuatro subunidades idénticas que se pueden unir cada una a una biotina. Algunos autores afirman que este cambio puede reducir el marcaje inespecífico (2).

## Otras técnicas

La introducción de variaciones en los métodos descritos puede permitir mejorar distintos aspectos de las técnicas inmunohistoquímicas.

- Enzimas.

Además de la peroxidasa del rábano, que es la enzima más utilizada en estas técnicas, también se pueden emplear otras enzimas, como la fosfatasa alcalina o la glucosa-oxidasa. La ventaja de estos sistemas enzimáticos radica en la disminución del marcaje inespecífico por

dos motivos, según el caso: en cuanto a la fosfatasa alcalina, al utilizarse la de origen animal no interfiere con la fosfatasa alcalina presente en los vasos sanguíneos de la piel; y en el caso de la glucosa-oxidasa, debido a que los mamíferos carecen de ella.

- Doble o múltiple marcaje

Mediante esta técnica se pretende la determinación simultánea de dos o más estructuras antigénicas diferentes en la misma preparación. Para su realización, se requiere el empleo, para cada uno de los antígenos investigados, de un sistema sustrato/cromógeno distinto -si se utiliza como sistema enzimático sólo la peroxidasa- o sistemas enzimáticos diferentes como pueden ser las dos anteriormente citadas. Con esta técnica se consigue un color distinto para cada uno de los antígenos detectados, lo que permite individualizarlos adecuadamente.

## Conceptos de Biología Molecular relativos al Carcinoma de Laringe

Desde hace años, sabemos que el cáncer es el resultado de alteraciones genéticas a nivel del ADN. Al principio se pensó que estaban producidas por agentes carcinógenos físicos o químicos (3). Posteriormente se verificó la participación de virus oncogénicos insertados en el material genético (4, 5), y en los últimos años se han demostrado alteraciones cromosómicas que reflejan anormalidades en el reordenamiento genético. El desarrollo de la tecnología recombinante de los ácidos nucleicos, ha permitido descubrir la base molecular del cáncer, identificando estos genes alterados. Surge así el concepto de oncogén: gen celular normal que adquiere el potencial de transformarse mediante alteraciones en su estructura, modificaciones en la regulación de su expresión o variaciones en la función de la proteína que codifica.

Bajo la denominación de oncogenes se reúne, por tanto, un grupo heterogéneo de genes involucrados en el control de la proliferación y diferenciación celular, cuyo único punto en común es el estar asociados a la transformación maligna, siendo por lo tanto un concepto más operativo que molecular, que indica activación o alteración. Las investigaciones sobre citogenética han permitido conocer la localización cromosómica de muchos de estos genes, permitiendo establecer una relación causa-efecto entre la activación de un oncogén, la alteración cromosómica, y la enfermedad. Los protooncogenes son, por lo tanto, enemigos potenciales dentro de cada célula.

Los carcinomas del tracto aerodigestivo superior se encuadran entre las neoplasias más frecuentes, y a pesar del progreso de la cirugía, farmacología y radioterapia en el manejo de estos pacientes, alrededor del 50 % de los mismos no sobreviven a los 5 años del diagnóstico.

Por ello se impone la necesidad de identificar marcadores capaces de distinguir a los pacientes con buen pronóstico en su evolución, de los pacientes que posiblemente padecerán una recidiva tumoral, como vía a optimizar su estrategia terapéutica.

La inmunohistoquímica ha aportado importantes datos en el diagnóstico complementario de los carcinomas escamosos. En particular, el estudio de los marcadores de proliferación celular, así como de los genes implicados en la carcinogénesis pueden representar un importante complemento en la valoración del carcinoma escamoso de laringe. Dentro de los genes más frecuentemente implicados en la carcinogénesis, se encuentran el p53 y el Rb (Retinoblastoma) como genes supresores del crecimiento tumoral; y el Bcl-2 (B-cell Leukemia Lymphoma) como gen regulador de la inhibición de la muerte celular programada o apoptosis.

Podemos destacar a estos genes supresores en un apartado singular, ya que controlan la proliferación celular por supresión de genes específicos que estimulan la respuesta proliferativa. Algunas líneas de investigación sugieren que la pérdida o alteración de estos genes específicos contribuyen en la inducción del cáncer. Estas pérdidas de material genético tienen lugar en los carcinomas de laringe de forma muy frecuente (6, 7). A menudo, la función de estos genes no se limita a prevenir el cáncer, algunos de ellos controlan negativamente el crecimiento celular fisiológico, como hemos apuntado anteriormente.

Podemos decir que la mutación del gen p53 condiciona la acumulación de su proteína por aumento de su vida media, y que la elevada concentración de la misma es anormal en tejidos sanos, presentándose como un acontecimiento tumoral precoz dentro de las alteraciones implicadas en la patología neoplásica.

Un resultado inmunohistoquímico positivo es indicativo de mutación, salvo en casos falsos positivos o falsos negativos, y al ser demostrada en las células neoplásicas y pre-neoplásicas podemos considerar la evidencia de un marcador tumoral.

En algunos trabajos se ha demostrado inmunorreactividad para p53 en capas basales del epitelio y en lesiones displásicas adyacentes al tumor, lo que nos sugiere que esta acumulación proteica es un acontecimiento precoz en la patogénesis del carcinoma de laringe como ya hemos comentado anteriormente.

Establecen una fuerte controversia los trabajos que determinan por medio de secuenciación de DNA la mutación del p53 del carcinoma de laringe sin detectar acúmulo de su proteína por inmunohistoquímica y viceversa (8, 9). La mayor parte de ellos manifiestan una buena correlación entre la inmunohistoquímica y la mutación para el p53, lo que justifica el empleo de la primera en ausencia de posibilidad de secuenciación del DNA, o simplemente por ser más barato, fácil e inmediato, además de posibilitar el posterior estudio del DNA por secuenciación. Melhem (10) comenta la alta sensibilidad de la inmunohistoquímica para p53 en la detección de su mutación, destacando también su baja especificidad. Los falsos positivos se explican por la estabilización de la proteína p53 al ligarse a otros productos como el antígeno T del virus SV 40, el adenovirus E1B o la proteína mdm-2. Los falsos negativos se producen al aparecer mutaciones que destruyen la proteína imposibilitando su inmunodetección (non-sense mutations).

Estos trabajos refieren diferentes modelos de inmunotinción de p53 según el grado histológico; así, para los teji-

dos normales o con displasia leve o moderada, la inmunorreactividad de p53 se localiza en las capas basales del epitelio, mientras que en la displasia grave, la inmunotinción se distribuye de forma difusa en todas las capas del mismo (11,12,13) (Fig. 2).

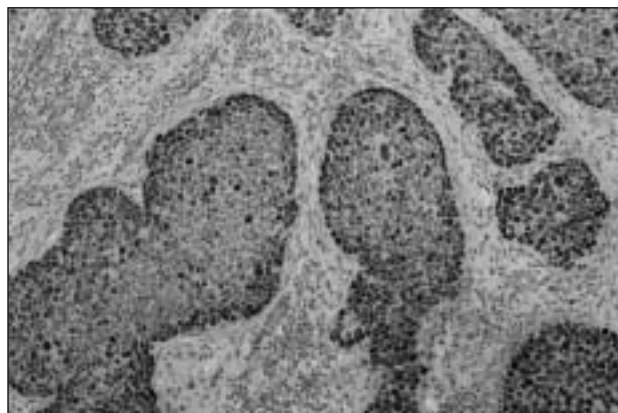


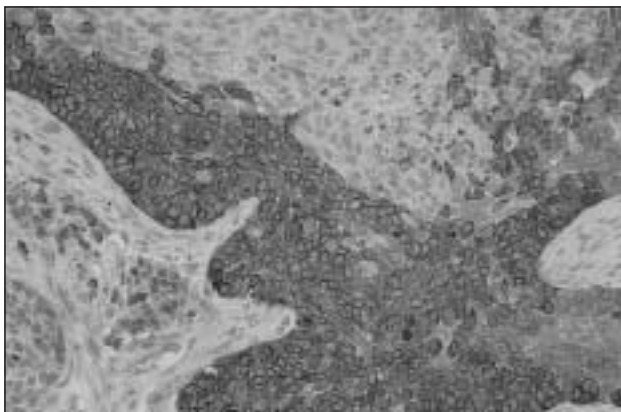
FIGURA 2: Expresión moderada de p53 en los nidos tumorales.

El gen supresor Retinoblastoma regula la proliferación celular a diferente nivel que el p53. En este sentido, su expresión se encuentra mucho menos documentada que en el caso anterior, y se advierte con mucha mayor frecuencia en tejidos sanos, ya que forma parte de la fisiología del ciclo celular durante más tiempo. Así, su expresión nos da idea de la reacción celular ante los estímulos interpretados como patológicos, activando la síntesis de proteínas supresoras del crecimiento y desarrollo tumoral.

El gen Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma), representa el primer miembro de una categoría de oncogenes cuya función principal es la de aumentar la supervivencia celular, participando así en el proceso de carcinogénesis. Constituido por tres exones estructurales, está localizado en la banda q21 del cromosoma 18 (14). Es el único oncogén ubicado en la membrana celular.

La cantidad de células que hay en los tejidos se regula por un equilibrio balanceado entre proliferación, diferenciación y pérdida celular por apoptosis. Cuando este equilibrio se pierde, aparecen alteraciones en los mecanismos de apoptosis o de diferenciación terminal, causantes de la aparición de atrofia, hiperplasia y cáncer. La apoptosis es un tipo particular de muerte celular programada que ocurre frecuentemente durante el desarrollo embrionario, en tejidos normales adultos, y en varias situaciones patológicas. No es un fenómeno pasivo, pues normalmente requiere la expresión de genes concretos, síntesis proteica y consumo de energía.

El mecanismo específico por el cual la proteína Bcl-2 prolonga la supervivencia celular es todavía un enigma. Lo que sí se ha podido comprobar es que un alto nivel de proteína Bcl-2 retarda o bloquea la muerte celular programada. La sobreexpresión de Bcl-2 se ha asociado a múltiples cambios implicados en la apoptosis, entre ellos se incluye la alteración del estado celular redox (la cual lleva a deplec-



**FIGURA 3:** Expresión de marcador Bcl-2. Obsérvese su positividad citoplasmática.

ción del glutatión y generación y acción de radicales de oxígeno), cambios en la membrana, cambios en la distribución de iones subcelulares (Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>) y rotura de la membrana mitocondrial (15) (Fig. 3).

Como vemos, la inmunohistoquímica no es la panacea en el conocimiento del cáncer, si bien nos aporta cierta información sobre el comportamiento tumoral que no debemos desestimar, ya que en ciertos carcinomas, algunos marcadores (cada día más) se pueden emplear como marcadores pronósticos de su comportamiento.

## Bibliografía

1. Doherty MJ, Russo GG, Jolly HW, Stewart KR. Inmunoenzyme techniques in dermatopathology. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 827-837.
2. True LD. Atlas of diagnostic immunopathology. 1ª ed. Philadelphia-New York: JB Lippincott Co, Gower Medical Publishing, 1990.
3. Ames BN: Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 1979; 204: 587-593.
4. Bishop JM: Viral oncogenes. *Cell* 1985; 42: 23-28.
5. Varmus LI: Retroviruses. *Science* 1988; 240: 1427-1435.
6. Somers K, Merrick, Lopez ME, Incognito L, Schlechter: Frequent p53 mutations in Head and Neck Cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 5997-6000.
7. Nees M, Homman H, Discher H, Andl T, et al: Expression of mutated p53 occurs in tumor distant epithelia of head and neck cancer patients: a possible molecular basis for the development of multiple tumors. *Cancer Res* 1993; 53: 4189-4193.
8. Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel M, Le Bihan ML, Douc-Rasy S, Duvillard P, Armand JP, Riou G: High incidence of p53 alterations (mutations, delección, overexpression) in head and neck primary tumors and metas-

tases: absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium in early oncoinvasive lesions. *Oncogene* 1995; 10: 1217-1227.

9. Bradford C, Shaobo Zhu MD, Poore J et al: p53 mutation as a prognostic marker in advanced laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg* 1997; 123: 603-609.
10. Melhem M, Law JC, El-Ashmawy et al: Assesment of sensitivity and specificity of immunohistochemical staining of p53 in lung and head and neck cancers. *Am J Pathol* 1995; 146 (5): 1170-1178.
11. Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Ronchetti D, Cesana BM, Ottaviani A, Neri A, Buffa R: Clinical relevance of p53 and bcl-2 protein over-expression in laryngeal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1998; 79 (3): 263-268.
12. Pruneri G, Pignataro L, Fracciola NS, Ferrero P, Cappacio P, Carboni N, Ottaviani A, Maiolo A, Neri A, Buffa R: p53 protein expression in laryngeal squamous cell carcinomas bearing wild-type and mutated p53 gene. *Histopathology* 1996; 28: 513-519.
13. Shin DM, Lee G, Lippmann SM et al: p53 expression: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1996; 88: 519-526.
14. Cotter E: The role of the Bcl-2 in limphoma. *Br J Haematol* 1990; 75: 449-453.
15. Kroemer G: The protooncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine* 1997; 3 (6): 614-620.

## Correspondencia

- Dr. Angel M. Urpegui García  
Avda. Gómez Laguna, 22 esc. 1 - 2.º A  
50009 ZARAGOZA