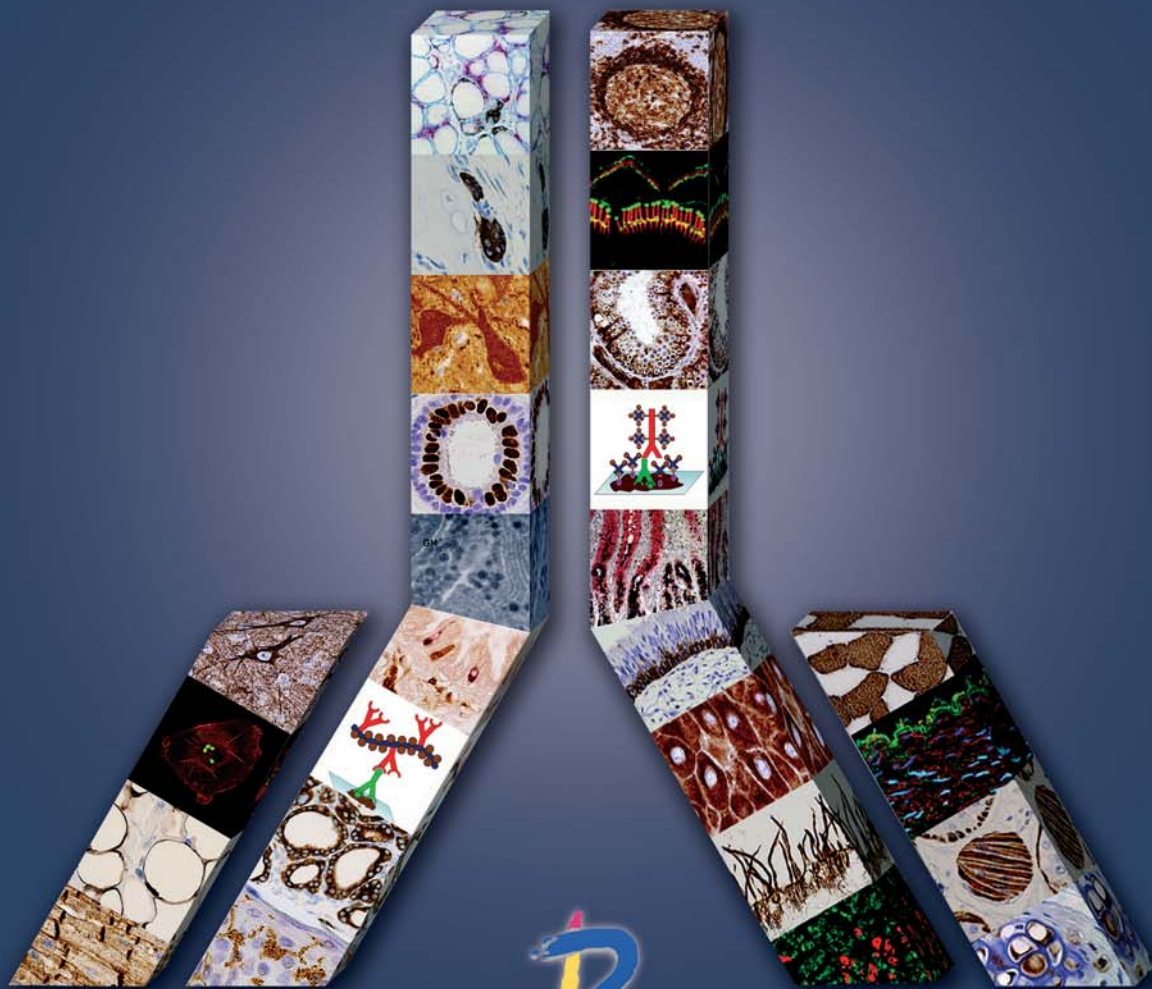


Inés Martín-Lacave
Tomás García-Caballero

ATLAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Caracterización de células,
tejidos y órganos normales



**INÉS MARTÍN-LACAVE
TOMÁS GARCÍA-CABALLERO**

ATLAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Caracterización de células, tejidos y
órganos normales



Autores

INÉS MARTÍN-LACAVE

Catedrática de Histología
Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica
Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla

TOMÁS GARCÍA-CABALLERO

Catedrático de Histología
Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela
Patólogo Responsable del Laboratorio de Inmunohistoquímica y Dianas Terapéuticas
Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

Colaboradores

ANDRÉS BEIRAS IGLESIAS

Catedrático de Histología, Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela
Jefe de Sección de Microscopía Electrónica, Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

JULIA BUJÁN VARELA

Catedrática de Histología, Departamento de Especialidades Médicas
Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares

MARYSSA CANUEL

Research Associate, Department of Anatomy and Cell Biology
McGill University, Montreal, Quebec, Canada

MANUEL DE MIGUEL RODRÍGUEZ

Profesor Titular de Histología, Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica
Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla

BEATRIZ FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

Facultativo Especialista de Área, Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

JOSÉ M. FERNÁNDEZ SANTOS

Profesor Titular de Histología, Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica
Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla

MÁXIMO FRAGA RODRÍGUEZ

Catedrático de Anatomía Patológica, Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses
Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela
Facultativo Especialista de Área, Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

ROSALÍA GALLEGO GÓMEZ

Profesora Titular de Histología, Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela

LUCÍA GARCÍA-CABALLERO

Doctora en Odontología, Colaboradora de la Unidad de Pacientes Especiales, Departamento de Estomatología
Universidad de Santiago de Compostela

CARLOS R. MORALES

Professor of the Department of Anatomy and Cell Biology
McGill University, Montreal, Canada, H3 2B2

GÉRARD MOREL

Directeur de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
Université Claude Bernard-Lyon 1, F69622 Villeurbanne cedex, France

KAWTAR RAGHAY

Becaria Postdoctoral, Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela
Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
Université Claude Bernard-Lyon 1, F69622 Villeurbanne cedex, France

JAVIER REGADERA GONZÁLEZ

Catedrático de Histología, Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

JOSÉ C. UTRILLA ALCOLEA

Profesor Titular de Histología, Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica
Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla

El poder transmitir información clara y útil sobre los pormenores de los métodos de inmunotinción y sus resultados en varios tipos celulares y tejidos es un cometido que requiere la combinación de esfuerzo y conocimiento. Inés Martín-Lacave y Tomás García-Caballero nos ofrecen una obra de características especiales que redundará en beneficio práctico para todos aquellos que confrontan la necesidad de caracterizar una función o localizar un producto celular usando técnicas inmunohistoquímicas. Dicho objetivo se enriquece con la participación de varios colaboradores que suman su experiencia en forma sólida y visualmente atractiva en cada uno de los capítulos. El *Atlas de Inmunohistoquímica* logra su objetivo de ofrecer al lector un complemento valioso a los atlas de Histología y los de Inmunopatología existentes. El material se presenta en tres partes y veinte capítulos. La primera parte presenta con detalle los métodos aplicables a la microscopía óptica y electrónica. El lector se beneficiará de su lectura porque encontrará en forma esquemática los principios técnicos así como las ventajas y obstáculos que cada método de inmunotinción brinda. Todos aquellos interesados en determinar la localización de antígenos en células y tejidos normales y anormales encontrarán en la segunda y tercera parte una ayuda práctica valiosa. No sólo las imágenes son de alta calidad técnica sino que también poseen un valor estético y de elegancia que invita a su examen detallado. De gran valor son las citas bibliográficas que acompañan a cada capítulo. Las mismas expanden las posibilidades futuras de usar marcadores adicionales que no se incluyen en el Atlas. Los anatomopatólogos encontrarán en esta obra la ayuda necesaria para identificar el origen embriológico y tisular o la naturaleza de una alteración patológica con la ayuda de la inmunohistoquímica. Histólogos, fisiólogos y anatomopatólogos podrán expandir en sus laboratorios e ilustrar en sus aulas de enseñanza detalles de estructura así como a la vez establecer un puente de comunicación entre la localización de un antígeno y su función. Finalmente, el contenido de este Atlas se ha organizado para hacerlo útil al estudiante, de manera que vaya de los temas mas simples a los mas complejos en términos de organización y estructura de células y tejidos. Así, en la Segunda Parte del Atlas se incluyen los tejidos básicos y en la Tercera Parte los diversos sistemas y aparatos. En resumen, el Atlas de Inmunocitoquímica representa una contribución bienvenida y largamente esperada que cumple su objetivo de enriquecer la Histología e Inmunopatología por su contenido de gran valor didáctico y práctico.

ABRAHAM L. KIERSZENBAUM, MD, PhD
Professor and Chair
Department of Cell Biology and Anatomy
The Sophie Davis School of Biomedical Education
The City University of New York
New York, NY. USA

El *Atlas de Inmunohistoquímica* de Inés Martín Lacave y Tomás García-Caballero, pioneros en la Inmunohistoquímica española, es también pionero en la literatura médica. Ha hecho falta conocer bien los resultados de la inmunohistoquímica en patología antes de que alguien tomase la decisión, como han hecho los autores, de abordarla en células, tejidos y órganos normales. Este Atlas es una referencia, no solo para la histología, sino que lo va a ser también para la patología. En un momento histórico de la medicina, en el que predomina el conocimiento molecular, la morfología ha perdido el misterio, éste reaparece en lo molecular, pero queda camino por hacer en la morfología. Sin quitarle ninguna importancia a la biología molecular, el tejido normal y patológico, sobre el que asienta la enfermedad, es tan complejo, especialmente en los procesos neoplásicos, que necesita un conocimiento panorámico que solo técnicas como la inmunohistoquímica, de carácter morfológico, proporcionan por su posibilidad global de entender la patología de los sistemas, por delante del conocimiento puramente molecular. Los estudios genómicos han aportado mucho, pero tal vez menos de lo que se esperaba por la dificultad de su integración. Parte de la clave del conocimiento de la biología y la patología perdura en las proteínas, que se abordan muy bien con herramientas como la inmunohistoquímica, que indirectamente permite identificar cambios a nivel genético. El inmunofenotipo que nos da la inmunohistoquímica nos lleva de la alteración molecular a la morfología. Esta filosofía la recoge este Atlas, que se estructura en capítulos de caracterización subcelular, tisular y orgánica, dando una visión global del cuerpo humano y sirviendo de base para comprender su patología. Dentro de su excelencia, destaca el cuidado metodológico, tanto en la descripción como en las imágenes, que son demostrativas y de muy alta calidad. La metodología comprende, no solo técnicas cromogénicas, sino los marcadores de fluorescencia, y va desde la microscopía óptica a aspectos puntuales de microscopía electrónica. El Atlas es un exponente de la rigurosidad en el método de los autores, de su capacidad docente, de su vocación por la histología, pero también de su inquietud y conocimiento de la patología.

El Atlas es útil para estudiantes, investigadores y patólogos, y para todos aquellos clínicos o básicos comprometidos con la biomedicina. Es de fácil lectura, tanto para su estudio como para su consulta, pues predomina en todo él una estructura didáctica y la información adecuada. Esperamos que sobre esta base, y con el mismo diseño, el próximo paso de los autores sea un Atlas de Inmunohistoquímica en Patología, campo sobre el que ya es cierto que existen precedentes, pero una aportación de los autores sería muy novedosa por su singular comprensión de la morfología y patología de los sistemas, lo que demuestran en este Atlas innovador, que enriquece la Histología, la Patología y la Medicina.

JERÓNIMO FORTEZA VILA
Profesor de Histología y Anatomía Patológica. Universidad Católica de Valencia
Profesor *Ad Honorem*. Universidad de Santiago de Compostela

Introducción



Tradicionalmente, los diferentes tipos celulares que configuran los tejidos se han identificado por su “aparición” microscópica tras el empleo de técnicas de tinción clásicas, como son la Hematoxilina-Eosina o las diversas técnicas especiales. No obstante, con la introducción de la inmunohistoquímica, no solo ha aumentado de modo considerable el número de células que pueden ser visualizadas de forma específica, sino que, también, se ha obtenido nueva información sobre su distribución, frecuencia e interrelaciones.

De hecho, la inmunohistoquímica es una metodología que ha revolucionado el panorama científico, pues permite la identificación *in situ* de cualquier tipo de proteína respetando el contexto morfológico. Hasta ahora se han publicado diversos libros que tratan sobre los fundamentos y técnicas inmunohistoquímicas, así como sobre su utilización como herramienta diagnóstica en Anatomía Patológica. No obstante, que nosotros sepamos, no existe un solo texto que aborde las posibilidades que tiene la inmunohistoquímica en Histología para la identificación precisa de los distintos componentes tisulares en el contexto de un individuo sano, siendo éste el propósito fundamental de esta obra.

Para alcanzar dicho objetivo, en los tres primeros capítulos de este libro se actualizan los fundamentos de las técnicas inmunohistoquímicas y su aplicación a la microscopía óptica (Capítulo 1); los diferentes métodos de inmunotinción múltiple (Capítulo 2), así como el marcaje ultraestructural de antígenos (Capítulo 3), todo ello ilustrado con más de 100 esquemas originales en color de gran calidad.

La lectura de las dos columnas en que se disponen los capítulos ha de hacerse en horizontal: la de la izquierda constituye el texto principal, y la de la derecha aporta comentarios, imágenes y esquemas ilustrativos.

En el Capítulo 4, se muestran los variados patrones de tinción que exhiben los antígenos a nivel tisular para, a continuación, pasar a describir con detenimiento los distintos marcadores a nivel subcelular (Cap. 5). Los restantes quince capítulos abordan de forma sistemática la identificación precisa de los diferentes componentes que integran los tejidos, órganos, aparatos y sistemas del cuerpo humano mediante una descripción exhaustiva de los marcadores inmunohistoquímicos específicos. Para una mejor comprensión, estos capítulos se han organizado de modo que la relación de elementos histológicos y sus correspondientes marcadores se sitúa en la columna izquierda de cada página, mientras que la columna derecha se reserva para las más de 900 microfotografías en color ilustrativas de los marcadores que consideramos más útiles para identificar cada tipo celular, empleando los anticuerpos más habitualmente utilizados en los Servicios de Anatomía Patológica. Se trata, pues, de aportar una verdadera “guía visual” que permita el reconocimiento microscópico específico de los diferentes tipos celulares que constituyen los distintos órganos y tejidos humanos, algo de gran utilidad tanto con vistas a la docencia, como a la investigación o a la asistencia.

Como decíamos, en nuestra opinión este libro cubre el vacío que existe hoy día entre los textos que tratan exclusivamente de la metodología inmunohistoquímica y aquellos otros que sólo acometen su aplicación al diagnóstico histopatológico. El empleo de la inmunohistoquímica en el diagnóstico requiere un conocimiento previo de los distintos marcadores que nos permiten identificar las células normales, para poder así solicitar e interpretar adecuadamente la inmunohistoquímica en patología quirúrgica. Esperamos que este atlas contribuya a la formación de los MIR de Anatomía Patológica y sirva también como libro de consulta para los especialistas. Además, este libro es un excelente complemento a los Atlas de Histología clásicos utilizados en la enseñanza de esta materia, ya que aporta no solo una mayor información sobre la identificación específica de los distintos tipos

celulares, sino también una calidad de imágenes histológicas equiparables, como mínimo, a las obtenidas mediante la aplicación de los métodos tricrómicos clásicos. Asimismo, este atlas constituye una obra de referencia para todos aquellos profesionales que, procediendo de áreas ajenas a la morfología microscópica, tengan que enfrentarse a la identificación específica de determinadas células o tejidos en sus diversas investigaciones, ya sean biólogos celulares, fisiólogos, anatómicos, bioquímicos, etc.

Un gran valor añadido a este *Atlas de Inmunohistoquímica* es la recopilación en un CD de todos los esquemas y microfotografías mostrados a lo largo de la obra, que suman un total de 1.045 imágenes inéditas de gran resolución. Hay que precisar que los aumentos que aparecen en los pies de figura a lo largo del texto corresponden al objetivo del microscopio que se ha utilizado para la adquisición de las fotografías. Este compendio de ilustraciones puede ser de gran utilidad para los profesores de la asignatura de Histología de las distintas titulaciones en donde se imparte (Medicina, Biología, Veterinaria, Odontología, Farmacia, Enfermería, Fisioterapia, Podología, etc.), así como para la enseñanza de la metodología inmunohistoquímica y de la valoración de los resultados, imprescindible en la formación de los Técnicos Superiores de Anatomía Patológica.

Por último, es necesario aclarar que con esta obra hemos tratado de sistematizar de la forma más pedagógica posible la caracterización de las células, tejidos y órganos en estado de normalidad mediante métodos inmunohistoquímicos. Para ello ha sido fundamental una revisión minuciosa de la literatura científica que emplea dicha metodología y la dilatada experiencia profesional de los autores. El objetivo como se comprenderá era muy ambicioso y difícil de acotar. Por ello se habrán cometido omisiones que rogamos que el lector especialista en determinado tema sepa comprender y disculpar. Con el avance ininterrumpido de la inmunohistoquímica aparecen continuamente nuevos marcadores y diferentes localizaciones para los ya conocidos. Los autores se comprometen a seguir completando la labor aquí iniciada para posteriores ediciones. Por todo ello, se agradecerán encarecidamente todas aquellas sugerencias o nuevas aportaciones que consideren oportunas hacer los lectores de la presente obra pues, no cabe duda, que contribuirán a la mejora futura de la calidad de la misma.

INÉS MARTÍN-LACAVE (ilacave@us.es)

TOMÁS GARCÍA-CABALLERO (tomas.garcia-caballero@usc.es)

Abreviaturas

A

| | | | |
|----------|---|--------|--|
| ABC | Complejo avidina-biotina (método del) | IFsI | Inmunofosfatásico indirecto (método) |
| AEC | 3-Amino-9-etilcarbazol | IGal | Inmunogalactosidásico (método) |
| Ac | Anticuerpo | IGo | Inmunoglucosaoxidásico (método) |
| Ag | Antígeno | IGoI | Inmunoglucosaoxidásico indirecto (método) |
| APAAP | Fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina (método de la) | IPx | Inmunoperoxidásico (método) |
| AQP | Acuaporina | IPxI | Inmunoperoxidásico indirecto (método) |
| BCIP | <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i> | Ig | Inmunoglobulina |
| BSA | Albúmina sérica bovina | IHQ | Inmunohistoquímica |
| CARD | <i>Catalysed Reported Deposition</i> | LB | Lámina basal |
| CK | Citoqueratina | LSAB | Biotina-estreptavidina marcada (método de la) |
| CIN | 4-Cloro-1-naftol | NBT | <i>Nitroblue tetrazolium</i> |
| CSA | <i>Catalysed signal amplification</i> | NF | <i>New Fushin</i> |
| Cy | Cianina | PAAF | Punción aspiración con aguja fina |
| DAB | Tetraclorhidrato de 3,3' diaminobencidina | PAP | Peroxidasa anti-peroxidasa (método del complejo) |
| EDTA | Tampón tris-etilendiamino tetraacético | PAS | Periodic Acid-Schiff |
| EGTA | Tampón etilenglicol tetracético | PBS | Tampón fosfato salino |
| EPOS | <i>Enhanced Polymer One-Step staining</i> | PLP | Paraformaldehído-lisina-periodato |
| EV | EnVision (método) | Px | Peroxidasa |
| FB | <i>Fast Blue</i> | RCA | <i>Rolling circle amplification</i> |
| Fig | Figura | RER | Retículo endoplasmático rugoso |
| FR | <i>Fast Red</i> | RT-PCR | PCR a tiempo real |
| Fsa | Fosfatasa alcalina | SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína | SSC | <i>Standard saline citrate</i> |
| Go | Gluocosa oxidasa | TBS | Tampón tris salino |
| H.Harris | Hematoxilina de Harris | TRICT | Isotiocianato de tetrametilrodamina |
| HIER | Recuperación de epitopos inducida por calor | TMA | Micromatrices tisulares |
| HIS | Hibridación <i>in situ</i> | TSA | <i>Tiramide signal amplification</i> |
| HPV | Papilomavirus humano | Vol | Volumen |
| IEz | Inmunoenzimático (método) | | |
| IF | Inmunofluorescencia | | |
| IFs | Inmunofosfatásico (método) | | |

| | |
|-----------------------|------|
| AUTORES | IX |
| PRÓLOGO | XI |
| INTRODUCCIÓN | XV |
| AGRADECIMIENTOS | XVII |
| ABREVIATURAS | XIX |

PRIMERA PARTE: MÉTODOS

CAPÍTULO 1: TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Tomás García-Caballero, Rosalía Gallego y Gérard Morel

| | |
|--|-----------|
| 1. Bases conceptuales en inmunohistoquímica | 3 |
| 1.1. Definición | 3 |
| 1.2. Antígeno | 4 |
| 1.3. Anticuerpo | 5 |
| 2. Preservación y procesamiento de las muestras | 16 |
| 2.1. Tipos de muestra | 16 |
| 2.2. Fijación | 17 |
| 2.3. Congelación | 23 |
| 2.4. Procesamiento en parafina | 25 |
| 2.5. Sección mediante vibratomo | 27 |
| 3. Recuperación antigénica | 29 |
| 3.1. Concepto | 29 |
| 3.2. Recuperación enzimática | 29 |
| 3.3. Recuperación térmica | 30 |
| 4. Métodos de detección | 35 |
| 4.1. Métodos de conjugación | 36 |
| 4.2. Método del puente | 36 |
| 4.3. Método del complejo peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) | 37 |
| 4.4. Método de la fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina (APAAP) | 40 |
| 4.5. Método del complejo avidina-biotina (ABC) | 42 |
| 4.6. Método de la biotina-estreptavidina marcada (LSAB) | 43 |
| 4.7. Métodos de polímeros | 44 |
| 4.8. Métodos de amplificación | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 5. Problemas y controles | 49 |
| 5.1. Problemas | 50 |
| 5.2. Controles positivos | 56 |
| 5.3. Controles negativos | 58 |
| 5.4. Controles de calidad..... | 60 |
| 6. Estandarización y avances | 61 |
| 6.1. Fases en la estandarización | 61 |
| 6.2. Automatización | 63 |
| 6.3. Micromatrices tisulares..... | 64 |
| 6.4. <i>Chips</i> de inmunotinción múltiple..... | 68 |
| 6.5. Histoides o falsos tejidos | 68 |
| 7. Cuantificación | 68 |
| 7.1. Variables..... | 69 |
| 7.2. Sistemas de puntuación (<i>score</i>) | 70 |
| 7.3. Análisis de imagen..... | 70 |
| 7.4. Cuantificación de la inmunofluorescencia | 72 |
| Bibliografía | 73 |

CAPÍTULO 2: MÉTODOS DE INMUNOTINCIÓN MÚLTIPLE

Inés Martín-Lacave y Rosalía Gallego

| | |
|--|------------|
| 1. Introducción | 81 |
| 2. Doble inmunohistoquímica | 81 |
| 2.1. Anticuerpos específicos obtenidos en distintas especies..... | 82 |
| 2.2. Anticuerpos específicos obtenidos en la misma especie..... | 85 |
| 2.3. Cromógenos..... | 92 |
| 3. Demostración de más de dos antígenos por inmunohistoquímica | 93 |
| 4. Combinación de la inmunohistoquímica con otras técnicas de tinción | 94 |
| 4.1. Doble tinción de inmunohistoquímica con carbohidratos | 94 |
| 4.2. Doble tinción de inmunohistoquímica con TUNEL | 95 |
| 4.3. Doble tinción de inmunohistoquímica con hibridación <i>in situ</i> (HIS)..... | 96 |
| 5. Inmunofluorescencia múltiple | 96 |
| 5.1. Introducción..... | 96 |
| 5.2. Anticuerpos específicos obtenidos en distintas especies..... | 99 |
| 5.3. Anticuerpos específicos obtenidos en la misma especie..... | 100 |
| 5.4. Fluorocromos | 102 |
| Bibliografía | 104 |

CAPÍTULO 3: MARCAJE ULTRAESTRUCTURAL

Gérard Morel y Kawtar Raghay

| | |
|---|------------|
| 1. Introducción | 109 |
| 2. Herramientas para el marcaje ultraestructural | 110 |
| 2.1. Partículas de oro coloidal..... | 111 |
| 2.2. IgG conjugada..... | 111 |

| | |
|---|------------|
| 2.3. Otros conjugados | 111 |
| 2.4. Propiedades de la IgG conjugada en la reacción inmunocitoquímica | 112 |
| 2.5. Controles de la IgG conjugada..... | 112 |
| 3. Fijación | 112 |
| 4. Método post-inclusión..... | 114 |
| 4.1. Fijación | 115 |
| 4.2. Preparación tisular | 115 |
| 4.3. Inmunomarcaje | 117 |
| 4.4. Iconografía | 120 |
| 5. Método pre-inclusión | 121 |
| 5.1. Principio..... | 121 |
| 5.2. Fijación | 122 |
| 5.3. Preparación tisular | 122 |
| 5.4. Inmunomarcaje | 123 |
| 5.5. Iconografía | 128 |
| 5.6. Modificación del método pre-inclusión | 128 |
| 6. Método sin inclusión | 133 |
| 6.1. Principio..... | 133 |
| 6.2. Fijación | 133 |
| 6.3. Congelación | 134 |
| 6.4. Realización de cortes ultrafinos | 135 |
| 6.5. Inmunomarcaje | 136 |
| 6.6. Iconografía | 139 |
| 7. Comparación de los tres métodos..... | 139 |
| 7.1. Sensibilidad..... | 139 |
| 7.2. Preservación morfológica | 140 |
| 7.3. Resolución | 140 |
| 7.4. Especificidad..... | 140 |
| 7.5. Factibilidad | 141 |
| 7.6. Coste | 141 |
| 8. Marcaje múltiple..... | 141 |
| 8.1. Inmunomarcaje múltiple..... | 141 |
| 8.2. Inmunomarcaje e hibridación <i>in situ</i> | 145 |
| Bibliografía | 147 |

SEGUNDA PARTE: CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS Y TEJIDOS

CAPÍTULO 4: PATRONES DE TINCIÓN

Tomás García-Caballero e Inés Martín-Lacave

| | |
|---------------------------------------|------------|
| 1. Patrón citoplasmático | 151 |
| 1.1. Homogéneo..... | 151 |
| 1.2. Fibrilar | 152 |
| 1.3. Granular | 153 |

| | |
|---|------------|
| 1.4. Puntiforme paranuclear..... | 154 |
| 1.5. Basal | 154 |
| 1.6. En mosaico..... | 155 |
| 2. Patrón nuclear..... | 155 |
| 2.1. Homogéneo..... | 155 |
| 2.2. Nucleolar..... | 156 |
| 2.3. Envoltura nuclear..... | 156 |
| 3. Patrón nuclear y citoplasmático | 156 |
| 4. Patrón de membrana | 157 |
| 4.1. Completo..... | 157 |
| 4.2. Apical..... | 157 |
| 4.3. Lateral | 158 |
| 5. Patrón de membrana y citoplasmático | 158 |
| 5.1. Membrana y citoplasmático difuso..... | 158 |
| 5.2. Membrana y paranuclear puntiforme..... | 159 |
| 6. Patrón extracelular | 159 |
| 6.1. Coloide..... | 159 |
| 6.2. Lámina basal..... | 160 |
| 6.3. Fibras y sustancia fundamental amorfa | 160 |
| Bibliografía | 160 |

CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN SUBCELULAR

Carlos R Morales y Maryssa Canuel

| | |
|--|------------|
| 1. Marcadores de la membrana plasmática..... | 161 |
| 2. Marcadores nucleares..... | 161 |
| 2.1. Núcleo..... | 161 |
| 2.2. Lámina nuclear | 161 |
| 2.3. Nucléolo..... | 162 |
| 3. Marcadores del retículo endoplasmático rugoso..... | 162 |
| 4. Marcadores del aparato de Golgi | 162 |
| 4.1. Región cis (<i>cis</i> -Golgi)..... | 162 |
| 4.2. Región medial (<i>medial</i> -Golgi)..... | 163 |
| 4.3. Región trans-Golgi (TGN)..... | 163 |
| 5. Marcadores de endosomas y fagosomas..... | 163 |
| 5.1. Endosomas tempranos | 163 |
| 5.2. Endosomas tardíos | 164 |
| 5.3. Fagosomas | 164 |
| 6. Marcadores de lisosomas..... | 165 |
| 7. Marcadores de peroxisomas..... | 165 |
| 8. Marcadores de mitocondrias..... | 165 |
| 9. Marcadores de especializaciones apicales..... | 166 |
| 9.1. Microvellosidades..... | 166 |
| 9.2. Estereocilios..... | 166 |
| 9.3. Cilios..... | 166 |
| 10. Marcadores de especializaciones unitivas..... | 167 |
| 10.1. Uniones ocluyentes..... | 167 |

| | |
|--|------------|
| 10.2. Uniones adherentes..... | 168 |
| 10.3. Nexos..... | 168 |
| 11. Marcadores de lámina basal..... | 168 |
| Bibliografía..... | 169 |

CAPÍTULO 6: TEJIDO EPITELIAL

Inés Martín-Lacave, Beatriz Fernández y Tomás García-Caballero

| | |
|--|------------|
| 1. Marcador general de epitelios..... | 173 |
| 2. Epitelios de revestimiento..... | 173 |
| 2.1. Epitelio simple plano..... | 173 |
| 2.2. Epitelio simple cúbico..... | 175 |
| 2.3. Epitelio simple cilíndrico..... | 175 |
| 2.4. Epitelio seudoestratificado cilíndrico..... | 175 |
| 2.5. Epitelio de transición o urotelial..... | 176 |
| 2.6. Epitelio estratificado plano no queratinizado..... | 176 |
| 2.7. Epitelio estratificado plano queratinizado..... | 176 |
| 3. Glándulas exocrinas..... | 177 |
| 3.1. Células secretoras..... | 177 |
| 3.2. Células ductales..... | 177 |
| 3.3. Células mioepiteliales..... | 178 |
| 4. Marcadores de especializaciones apicales..... | 178 |
| 4.1. Microvellosidades..... | 178 |
| 4.2. Estereocilios..... | 179 |
| 4.3. Cilios..... | 179 |
| 5. Marcadores de lámina basal..... | 179 |
| 6. Tabla de citoqueratinas en sistemas y órganos..... | 179 |
| Bibliografía..... | 183 |

CAPÍTULO 7: TEJIDO CONJUNTIVO Y VARIEDADES

Inés Martín-Lacave y José C Utrilla

| | |
|--|------------|
| 1. Tejido conjuntivo..... | 187 |
| 1.1. Células conjuntivas..... | 187 |
| 1.2. Fibras conjuntivas y proteínas asociadas..... | 190 |
| 1.3. Sustancia fundamental amorfa..... | 191 |
| 2. Tejido cartilaginoso..... | 191 |
| 2.1. Conocitos..... | 191 |
| 2.2. Matriz cartilaginosa..... | 192 |
| 2.3. Pericondrio..... | 192 |
| 3. Tejido óseo..... | 193 |
| 3.1. Células óseas..... | 193 |
| 3.2. Matriz ósea..... | 194 |
| 3.3. Periostio..... | 194 |
| 3.4. Membrana sinovial..... | 195 |
| Bibliografía..... | 195 |

CAPÍTULO 8: SANGRE Y MÉDULA ÓSEA*Inés Martín-Lacave y Manuel de Miguel*

| | |
|--|------------|
| 1. Sangre | 201 |
| 1.1. Eritrocitos | 201 |
| 1.2. Plaquetas | 201 |
| 1.3. Leucocitos..... | 202 |
| 2. Médula ósea | 204 |
| 2.1. Sinusoides medulares..... | 204 |
| 2.2. Estroma | 204 |
| 2.3. Células progenitoras hematopoyéticas..... | 205 |
| 2.4. Serie eritroide..... | 205 |
| 2.5. Megacariocitos..... | 205 |
| 2.6. Serie granulomonocítica | 206 |
| 2.7. Serie linfoide..... | 206 |
| Bibliografía | 207 |

CAPÍTULO 9: TEJIDO MUSCULAR*Inés Martín-Lacave y José M^a Fernández-Santos*

| | |
|--|------------|
| 1. Marcadores generales | 211 |
| 2. Músculo liso | 211 |
| 3. Músculo estriado | 212 |
| 3.1. Marcadores generales | 212 |
| 3.2. Músculo estriado esquelético..... | 213 |
| 3.3. Músculo estriado cardíaco | 215 |
| 4. Lámina externa | 216 |
| Bibliografía | 216 |

CAPÍTULO 10: TEJIDO NERVIOSO*Inés Martín-Lacave y Tomás García-Caballero*

| | |
|---|------------|
| 1. Marcadores neuronales | 221 |
| 1.1. Neuronas en desarrollo | 221 |
| 1.2. Neuronas maduras..... | 221 |
| 2. Marcadores de sinapsis | 222 |
| 3. Marcadores de células gliales | 223 |
| 3.1. Sistema nervioso central | 223 |
| 3.2. Sistema nervioso periférico | 225 |
| 4. Marcadores de leptomeninges | 226 |
| 5. Marcadores de nervios periféricos | 226 |
| 5.1. Axones | 226 |
| 5.2. Células de Schwann | 226 |
| 5.3. Vaina de mielina..... | 227 |
| 5.4. Endoneuro..... | 227 |

| | |
|---------------------------|------------|
| 5.5. Perineuro | 227 |
| Bibliografía | 228 |

TERCERA PARTE: CARACTERIZACIÓN DE ÓRGANOS Y SISTEMAS

CAPÍTULO 11: SISTEMA CIRCULATORIO

Inés Martín-Lacave y Julia Buján

| | |
|---|------------|
| 1. Marcadores pan-endoteliales | 235 |
| 2. Vasos sanguíneos | 236 |
| 2.1. Túnica íntima | 236 |
| 2.2. Túnica media..... | 237 |
| 2.3. Túnica adventicia..... | 238 |
| 3. Corazón | 239 |
| 3.1. Endocardio..... | 239 |
| 3.2. Miocardio..... | 239 |
| 3.3. Sistema de conducción..... | 240 |
| 3.4. Pericardio visceral: mesotelio..... | 240 |
| 4. Vasos linfáticos | 241 |
| 4.1. Endotelio..... | 241 |
| 4.2. Lámina basal (LB) | 241 |
| Bibliografía | 242 |

CAPÍTULO 12: SISTEMA INMUNITARIO

Máximo Fraga e Inés Martín-Lacave

| | |
|-----------------------------------|------------|
| 1. Ganglio linfático | 247 |
| 1.1. Corteza..... | 247 |
| 1.2. Médula | 250 |
| 2. Bazo | 251 |
| 2.1. Pulpa blanca..... | 251 |
| 2.2. Pulpa roja | 253 |
| 3. Timo | 254 |
| 3.1. Corteza..... | 254 |
| 3.2. Médula | 255 |
| Bibliografía | 255 |

CAPÍTULO 13: SISTEMA ENDOCRINO

Inés Martín-Lacave y Tomás García-Caballero

| | |
|---------------------------|------------|
| 1. Hipófisis | 261 |
| 1.1. Adenohipófisis | 261 |
| 1.2. Neurohipófisis..... | 264 |

| | |
|--|------------|
| 2. Glándula pineal | 264 |
| 2.1. Pinealocitos..... | 264 |
| 2.2. Células intersticiales (gliales)..... | 265 |
| 2.3. Axones..... | 265 |
| 3. Tiroides | 265 |
| 3.1. Células foliculares..... | 265 |
| 3.2. Coloide..... | 266 |
| 3.3. Células C o parafoliculares..... | 266 |
| 4. Paratiroides | 267 |
| 4.1. Células principales..... | 267 |
| 4.2. Células oxífilas..... | 267 |
| 5. Glándulas suprarrenales | 268 |
| 5.1. Corteza suprarrenal..... | 268 |
| 5.2. Médula suprarrenal..... | 268 |
| 6. Islotes de Langerhans | 269 |
| 6.1. Marcadores generales..... | 269 |
| 6.2. Células A o alfa..... | 270 |
| 6.3. Células B o beta..... | 270 |
| 6.4. Células D o delta..... | 270 |
| 6.5. Células PP..... | 271 |
| Bibliografía | 271 |

CAPÍTULO 14: APARATO DIGESTIVO

Tomás García-Caballero, Beatriz Fernández y Lucía García-Caballero

| | |
|---|------------|
| 1. Labio | 277 |
| 1.1. Piel..... | 277 |
| 1.2. Bermellón..... | 278 |
| 1.3. Mucosa..... | 278 |
| 2. Cavidad oral | 278 |
| 2.1. Mucosa..... | 278 |
| 2.2. Lengua..... | 280 |
| 2.3. Diente..... | 281 |
| 2.4. Glándulas salivales..... | 285 |
| 3. Amígdalas palatinas | 287 |
| 3.1. Epitelio..... | 287 |
| 3.2. Componente linfoide..... | 287 |
| 4. Esófago | 289 |
| 4.1. Mucosa..... | 289 |
| 4.2. Glándulas esofágicas..... | 290 |
| 4.3. Muscular propia..... | 290 |
| 5. Estómago | 290 |
| 5.1. Epitelio superficial y foveolas..... | 290 |
| 5.2. Glándulas fúndicas..... | 291 |
| 5.3. Glándulas pilóricas..... | 292 |
| 5.4. Células neuroendocrinas..... | 293 |

| | |
|--|------------|
| 6. Intestino delgado | 293 |
| 6.1. Mucosa..... | 293 |
| 6.2. Glándulas de Brunner | 297 |
| 6.3. Placas de Peyer | 298 |
| 6.4. Muscular propia | 298 |
| 6.5. Plexos nerviosos | 299 |
| 7. Intestino grueso | 299 |
| 7.1. Mucosa..... | 299 |
| 7.2. Plexos nerviosos | 301 |
| 8. Apéndice | 302 |
| 8.1. Epitelio..... | 302 |
| 8.2. Componente linfoide | 302 |
| 9. Canal anal | 302 |
| 9.1. Zona colorrectal | 302 |
| 9.2. Zona transicional..... | 303 |
| 9.3. Zona cutánea | 303 |
| 10. Hígado | 303 |
| 10.1. Hepatocitos | 303 |
| 10.2. Canalículos biliares..... | 304 |
| 10.3. Células de Kupffer | 304 |
| 10.4. Células estrelladas perisinusoidales..... | 305 |
| 10.5. Conductos biliares | 305 |
| 10.6. Vasos | 305 |
| 11. Vesícula biliar | 306 |
| 11.1. Epitelio..... | 306 |
| 11.2. Conductos de Luschka | 306 |
| 12. Páncreas exocrino | 307 |
| 12.1. Células acinosas..... | 307 |
| 12.2. Células centroacinosas y conductos intercalares | 307 |
| 12.3. Conductos intralobulillares, interlobulillares y principales | 308 |
| Bibliografía | 309 |

CAPÍTULO 15: APARATO RESPIRATORIO

Rosalía Gallego y Kawtar Raghay

| | |
|---|------------|
| 1. Fosas nasales y senos paranasales | 317 |
| 1.1 Mucosa nasal | 317 |
| 1.2. Lámina propia..... | 319 |
| 2. Laringe | 319 |
| 2.1. Epitelio..... | 319 |
| 2.2. Lámina propia..... | 320 |
| 3. Tráquea | 320 |
| 3.1. Epitelio..... | 320 |
| 3.2. Lámina propia..... | 321 |
| 3.3. Submucosa | 321 |
| 3.4. Cartílago | 321 |
| 3.5. Músculo traqueal..... | 321 |

| | |
|--|------------|
| 4. Mucosa bronquial y bronquiolar | 321 |
| 4.1. Epitelio..... | 321 |
| 4.2. Lámina propia..... | 323 |
| 4.3. Muscular propia..... | 323 |
| 4.4. Cartílago hialino..... | 323 |
| 4.5. Plexos..... | 323 |
| 5. Alveolos pulmonares | 323 |
| 5.1. Epitelio alveolar..... | 323 |
| 5.2. Macrófagos alveolares..... | 325 |
| 6. Vascularización pulmonar | 325 |
| 7. Pleura | 325 |
| Bibliografía | 326 |

CAPÍTULO 16: APARATO URINARIO

Rosalía Gallego y Tomás García-Caballero

| | |
|---|------------|
| 1. Riñón | 329 |
| 1.1. Corpúsculo renal..... | 329 |
| 1.2. Túbulos renales..... | 333 |
| 1.3. Aparato yuxtaglomerular..... | 335 |
| 1.4. Vascularización renal..... | 336 |
| 1.5. Cápsula renal..... | 337 |
| 2. Vías urinarias | 337 |
| 2.1. Urotelio..... | 337 |
| 2.2. Lámina propia y capa muscular..... | 338 |
| Bibliografía | 338 |

CAPÍTULO 17: APARATO GENITAL FEMENINO

Inés Martín-Lacave y Tomás García-Caballero

| | |
|--|------------|
| 1. Ovarios | 343 |
| 1.1. Epitelio ovárico (mesotelio)..... | 343 |
| 1.2. Folículos ováricos..... | 343 |
| 1.3. Células estromales..... | 346 |
| 1.4. Células hiliares..... | 346 |
| 1.5. Cuerpo lúteo..... | 346 |
| 2. Trompas de Falopio | 347 |
| 2.1. Epitelio tubárico..... | 347 |
| 2.2. Capa muscular..... | 348 |
| 3. Útero | 348 |
| 3.1. Endometrio..... | 348 |
| 3.2. Miometrio..... | 349 |
| 4. Cérvix | 349 |
| 4.1. Endocérvix..... | 349 |
| 4.2. Exocérvix..... | 350 |
| 4.3. Estroma cervical..... | 350 |

| | |
|--|------------|
| 5. Vagina | 351 |
| 5.1. Epitelio de revestimiento | 351 |
| 5.2. Lámina propia..... | 351 |
| 5.3. Capa muscular..... | 351 |
| 6. Placenta | 351 |
| 6.1. Trofoblasto..... | 351 |
| 6.2. Células de Hofbauer (macrófagos)..... | 352 |
| 6.3. Células deciduales..... | 353 |
| 6.4. Mesénquima..... | 353 |
| Bibliografía | 353 |

CAPÍTULO 18: APARATO GENITAL MASCULINO

Javier Regadera e Inés Martín-Lacave

| | |
|--|------------|
| 1. Testículo | 359 |
| 1.1. Túbulos seminíferos..... | 359 |
| 1.2. Células de Leydig | 361 |
| 2. Vías espermáticas | 361 |
| 2.1. Túbulos rectos..... | 361 |
| 2.2. Rete testis | 362 |
| 2.3. Conductillos eferentes..... | 362 |
| 2.4. Epidídimo | 362 |
| 2.5. Conducto deferente | 363 |
| 2.6. Conducto eyaculador | 363 |
| 3. Próstata | 364 |
| 3.1. Células secretoras epiteliales | 364 |
| 3.2. Células basales..... | 365 |
| 3.3. Células neuroendocrinas | 365 |
| 3.4. Estroma fibromuscular..... | 365 |
| 3.5. Uretra prostática..... | 365 |
| 4. Vesículas seminales | 366 |
| 4.1. Epitelio..... | 366 |
| 4.2. Capa muscular..... | 366 |
| 5. Glándulas bulbouretrales | 366 |
| 5.1. Células secretoras epiteliales | 366 |
| 5.2. Células basales (mioepiteliales)..... | 366 |
| 5.3. Conductos | 366 |
| 6. Pene | 367 |
| 6.1. Uretra esponjosa | 367 |
| 6.2. Tejido eréctil | 367 |
| 6.3. Células intersticiales de Cajal..... | 367 |
| 6.4. Nervios..... | 367 |
| Bibliografía | 368 |

CAPÍTULO 19: PIEL*Tomás García-Caballero y Andrés Beiras*

| | |
|--|------------|
| 1. Epidermis..... | 371 |
| 1.1. Queratinocitos | 371 |
| 1.2. Melanocitos..... | 374 |
| 1.3. Células de Langerhans | 375 |
| 1.4. Células de Merkel | 375 |
| 2. Folículos pilosos..... | 376 |
| 2.1. Panmárcadores | 376 |
| 2.2. Vaina radicular externa | 376 |
| 2.3. Vaina radicular interna | 377 |
| 2.4. Corteza..... | 377 |
| 2.5. Eje del pelo | 378 |
| 2.6. Bulbo piloso..... | 378 |
| 2.7. Membrana vítrea..... | 378 |
| 2.8. Músculo erector del pelo..... | 378 |
| 3. Glándulas sebáceas | 379 |
| 4. Glándulas sudoríparas ecrinas | 379 |
| 4.1. Unidad secretora | 379 |
| 4.2. Células mioepiteliales | 380 |
| 4.3. Conducto secretor | 380 |
| 4.4. Acrosiringio | 381 |
| 5. Glándulas sudoríparas apocrinas..... | 381 |
| 5.1. Unidad secretora | 381 |
| 5.2. Células mioepiteliales | 382 |
| 5.3. Conducto secretor | 383 |
| 6. Dermis | 383 |
| 6.1. Fibroblastos..... | 383 |
| 6.2. Dendrocitos dérmicos | 383 |
| 6.3. Miofibroblastos | 384 |
| 6.4. Mastocitos..... | 384 |
| 6.5. Macrófagos | 384 |
| 6.6. Células glómicas..... | 385 |
| 6.7. Nervios..... | 385 |
| 7. Corpúsculos sensitivos..... | 385 |
| 7.1. Corpúsculos de Meissner..... | 385 |
| 7.2. Corpúsculos de Vater-Pacini | 386 |
| Bibliografía..... | 387 |

CAPÍTULO 20: MAMA*Tomás García-Caballero y Beatriz Fernández*

| | |
|---|------------|
| 1. Unidad terminal ducto-lobulillar..... | 393 |
| 1.1. Células madre | 393 |
| 1.2. Células glandulares..... | 393 |
| 1.3. Células mioepiteliales | 395 |

| | |
|--|------------|
| 2. Ductos interlobulillares | 395 |
| 2.1. Células epiteliales | 395 |
| 2.2. Células mioepiteliales..... | 396 |
| 3. Estroma | 397 |
| Bibliografía..... | 397 |
| | |
| ÍNDICE ANALÍTICO | 401 |

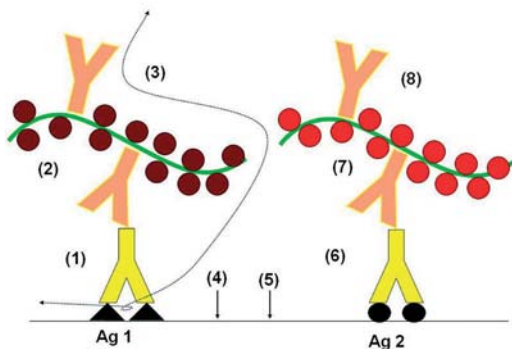
Precauciones generales:

- Como los tratamientos existentes para la eliminación de los anticuerpos de la 1ª serie son bastante drásticos, es conveniente usar material incluido en parafina, por ser éste más resistente.
- Asimismo, es recomendable utilizar como primer cromógeno la DAB ya que permanece en el tejido después del tratamiento.
- Es conveniente demostrar en primer lugar el antígeno menos abundante en la sección histológica en estudio.

2.2.5.1. Eliminación mediante elución

Una vez finalizada la demostración del primer antígeno, el cual se ha revelado con DAB, se procede a la disociación de los complejos antígeno-anticuerpo de la 1ª serie aplicando un agente caotrópico para, a continuación, comenzar con la 2ª cadena de revelado.

Este es el fundamento del equipo de doble marcaje EnVision de DAKO⁵⁸.



- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| (1) Ig ratón anti-Ag1 | (5) Bloqueo proteínas |
| (2) EV cabra anti-Ig ratón&Px | (6) Ig ratón anti-Ag2 |
| (3) DAB | (7) EV cabra anti-Ig ratón&Px |
| (4) Glicina-HCl | (8) AEC |

Figura 2.12. Eliminación de la 1ª serie de anticuerpos: EV-Px-DAB (Ag1) → EV-Px-AEC (Ag2) (según Van Hecke, 2001)⁵⁸.

La duración del periodo de elución varía considerablemente entre los distintos autores: desde un tiempo tan reducido como tres cambios de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2, de 1 minuto cada uno¹⁵; a 1 hora en HCl 1N¹⁰; hasta 48 horas en glicina-HCl 2M pH 2¹⁸.

Recientemente, Pirici et al. (2009),³³ han ensayado varios medios de elución clásicos en *Western blotting* para la obtención de doble inmunotinción, siendo el tratamiento con glicina-SDS, pH 2, durante 30-60 mi-

⇒ Nakane (1968)²⁷, fue el primer autor que empleó este método, llegando a demostrar tres antígenos sucesivamente mediante la aplicación del mismo método inmunoperoxidásico indirecto y el uso de tres cromógenos diferentes. Para ello, ensayó entre serie y serie distintos agentes caotrópicos, siendo el amortiguador glicina-HCl a pH 2,2, durante 1 hora, el que aportó mejores resultados.

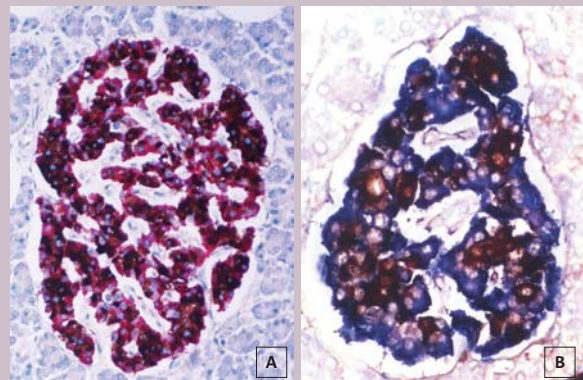


Figura 2.13. Demostración secuencial de insulina y glucagón en islotes pancreáticos. Métodos: (A) Glucagón (EV-Px-DAB) → Insulina (EV-Fsa-FR) (20x); (B) Glucagón (EV-Px-DAB) → Insulina (EV-Fsa-FR) (40x).

⇒ Probablemente, esa variabilidad esté en función de la afinidad de los anticuerpos que se utilicen: a mayor afinidad, mayor tiempo de elución será necesario.

⇒ Llevando esta técnica al extremo, Glass et al. (2009)¹³, han descrito un nuevo método al que denominan SIMPLE (*Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing*), que consiste en la

nutos a 50°C y con agitación, el que ofreció mejores resultados. Este método aporta la ventaja adicional de que inhibe las actividades enzimáticas de la peroxidasa y fosfatasa alcalina endógenas.

Precauciones:

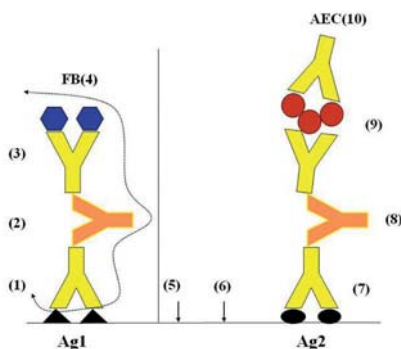
- Según Hasui *et al.* (2003)¹⁵, el tratamiento con glicina re-enmascara los antígenos recuperados con calor, por lo que aquellos antígenos que necesiten recuperación antigénica deberán demostrarse en primer lugar.
- Según dichos autores, después del paso de elución es recomendable intercalar un bloqueo con albúmina bovina.

2.2.5.2. Desnaturalización por calor

Fueron Lan *et al.* (1995)²¹ quienes comprobaron que la cadena de anticuerpos de la 1ª serie también puede anularse mediante desnaturalización, gracias a la aplicación de dos cambios en solución de recuperación antigénica (tampón citrato 100 mM, pH 6), de 5 minutos cada uno, en un horno microondas.

Posibilidades:

- APAAP/FB (Ag1) → PAP/AEC (Ag2)
- EV-Px/DAB (Ag1) → EV-Fsa/FR (Ag2)
- EV-Px/DAB (Ag1) → EV-Px/AEC (Ag2)
- Otras



- | | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| (1) Ig ratón anti-Ag1 | (6) Bloqueo proteínas y Px endógena |
| (2) Ig cerdo anti-Ig ratón | (7) Ig ratón anti-Ag2 |
| (3) Ig ratón anti-Fsa | (8) Ig cerdo anti-Ig ratón |
| (4) Fast Blue | (9) PAP ratón |
| (5) Microondas | (10) AEC |

Figura 2.14. Desnaturalización de la 1ª serie por calor: APAAP-FB (Ag1)→PAP/AEC (según Lan *et al.*, 1995)²¹.

demonstración de un primer antígeno mediante un método IPx y revelado con AEC, seguido por registro fotográfico mediante un scanner. Se destiñe y elimina la 1ª serie de anticuerpos y vuelta a empezar con otro antígeno, así hasta llegar a demostrar 5 antígenos de forma sucesiva.

Desventajas:

- Como se ha visto, para que se produzca la disociación de los inmunocomplejos de la 1ª serie es necesario, en algunas ocasiones, prolongar el tratamiento hasta 24-48 horas, lo que alarga de forma considerable la doble inmunotinción.
- El tratamiento con agentes caotrópicos también puede provocar la desnaturalización del 2º antígeno y, por tanto, impedir su identificación mediante inmunohistoquímica.

⇒ En realidad, estos autores demostraron 3 antígenos diferentes de forma sucesiva. Entre cada serie intercalaron, además del tratamiento con microondas, dos tratamientos bloqueantes de reacciones inespecíficas, uno con suero normal de la misma especie que el anticuerpo secundario y otro con suero fetal bovino.

⇒ Además de la DAB, los cromógenos AEC, *Fast Red* y *Fast Blue* también resisten el tratamiento con calor.

Advertencia:

- Elegir como Ag2 aquel que requiera recuperación antigénica, o que no se perjudique mediante la misma.

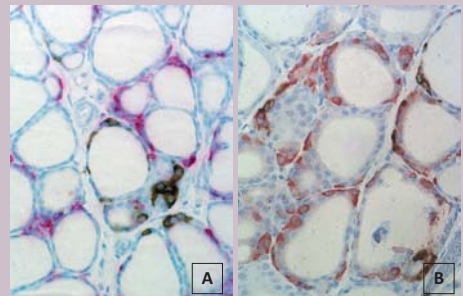


Figura 2.15. Demostración de somatostatina (SS) (de color marrón oscuro) y **calcitonina (CT)** (de color magenta-rojo) **en tiroides de rata** usando anticuerpos específicos producidos en la misma especie y dos métodos inmunoenzimáticos diferentes. Métodos: **(A)** SS(EV-Px-DAB)→CT(LSAB-Fsa-FR); **(B)** SS(EV-Px-DAB)→CT(EV-Px-AEC) (40x).

3. CORAZÓN

3.1. ENDOCARDIO: ENDOTELIO

(Véanse apartados 1 y 2.1.1. de este capítulo).

3.2. MIOCARDIO

3.2.1. Marcadores generales fibras

- *Actina muscular específica*
- *Actina de músculo cardíaco- α* ⁸⁰
- *Cateninas*: en los discos intercalados^{47,49}
- *CD56/NCAM (Neural cell adhesion molecule)*: en los discos intercalados⁸³
- *Conexinas 43 y 45*: en los discos intercalados^{15,22,69}
- *Cristalina- α B*: en los discos intercalados⁵¹
- *Desmina*: en los discos intercalados (desmosomas) y las líneas Z^{22,45,47,88}
- *Desmoplaquina*: en los discos intercalados⁴⁷
- *Distrofina*: patrón de membrana^{25,47}
- *Espectrina*: patrón de membrana⁴⁷
- *Mioglobina*: en el sarcoplasma⁴³
- *Miosina (cadena ligera) (MLC)*^{22,30}
- *Miosina (cadena pesada) (MHC)*^{22,30}
- *Titina*: patrón estriado³⁰
- *Tropomiosina*³⁰
- *Troponinas I y T*^{4,22,30}
- *Tubulina*: en el sarcoplasma⁴⁷
- *Vinculina*: patrón de membrana⁴⁷

(Véase también Capítulo 9, apartado 3.3)

3.2.2. Fibras auriculares

- *ANF (Atrial natriuretic factor)*^{4,28,60}
- *Angiotensinógeno*: inmunotinción intensa⁷⁸
- *Miosina (cadena ligera-2a) (MLC-2a)*^{22,48}
- *Miosina (cadena pesada- α) (MHC- α)*^{22,48,95}

3.2.3. Fibras ventriculares

- *Angiotensinógeno*: solo a nivel de la capa subendocárdica ventricular⁷⁸
- *Miosina (cadena ligera-2v) (MLC-2v)*^{22,95}
- *Miosina (cadena pesada- β) (MHC- β)*²²

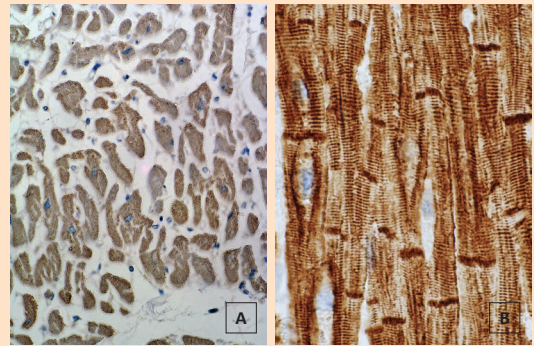


Figura 11.12. Miocardio. Las fibras musculares cardíacas se marcan con los anticuerpos **anti-actina muscular específica (A)** y **anti-desmina (B)**, que se intensifica a nivel de los discos intercalados. (A) 40x; (B) 60x.

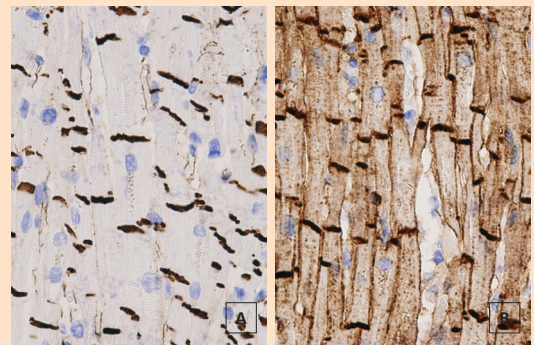


Figura 11.13. Miocardio. Los discos intercalados se marcan de forma nítida para **catenina- β (A)** y **CD56 (B)**, aunque este último también se localiza a nivel sarcoplásmico (40x).

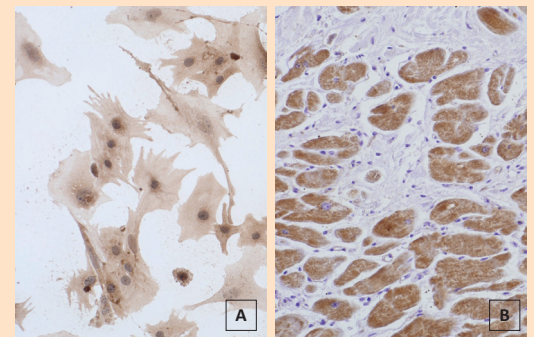


Figura 11.14. Cardiomiocitos. Estas células expresan **miosina (MHC- α)**, como se puede observar en cultivos celulares (A) y en secciones de miocardio (B). 20x.

2.1.1. Folículos linfoides

Manto: véase ganglio linfático.

Centro germinal: véase ganglio linfático.

Zona marginal

- Marcadores generales B
- *Bcl2*⁶³
- *CD21*^{95,96,102}
- *IgM* (IgD y CD23, en cambio, generalmente negativos)^{95,96,102}

2.1.2. Vainas linfoides periarteriolares (VLPA)

- *CD3*¹⁰¹
- *CD4*: predominan sobre los linfocitos *CD8*¹⁰⁷
- *CD5*¹⁰¹
- *CD8*¹⁰⁷
- *CD45RO*⁴¹

2.1.3. Células reticulares fibroblásticas

- *Actina de músculo liso*⁸⁵
- *CD49*⁴¹
- *Miosina de músculo liso*⁷⁶

2.1.4. Fibras reticulares

- *Colágeno-III*⁵⁴
- *Colágeno-IV*^{53,85}
- *Colágeno-XVII*⁵³
- *Fibronectina*⁴⁹
- *Laminina*⁵³
- *Tenascina*⁴⁹
- *Vitronectina*⁴⁹

2.1.5. Células dendríticas interdigitantes

(Véase ganglio linfático).

2.1.6. Macrófagos

(Véase ganglio linfático).

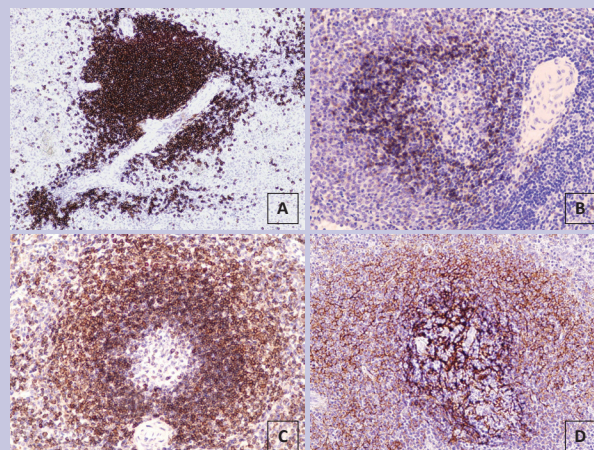


Figura 12.11. Folículos linfoides en el bazo. A) **CD20.** Intensa positividad en todo el folículo linfoide (10x). B) **IgD.** Se marca únicamente el manto folicular; el centro germinal y la zona marginal son negativos (20x). C) **Bcl-2.** Tanto el manto como la zona marginal muestran inmunorreactividad; el centro germinal es negativo (20x). D) **CD21.** Las células foliculares dendríticas se tiñen intensamente, y de forma algo más débil, las células de la zona marginal (20x).

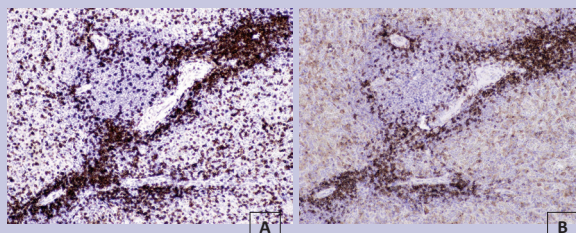


Figura 12.12. A) **CD3.** Marcaje de la VLPA (imagen complementaria de la Figura 12.11A). B) **CD4.** La mayor parte de los linfocitos de la VLPA expresan CD4 (10x).

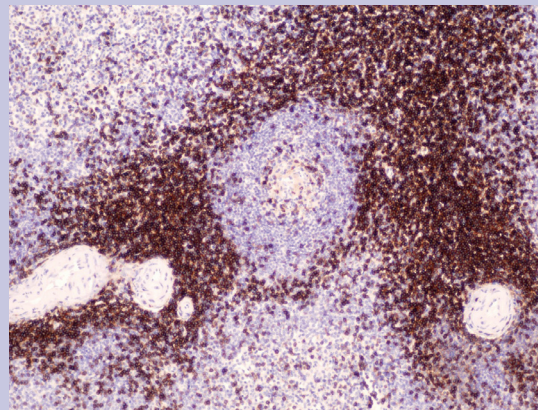


Figura 12.13. Extensa inmunorreactividad para **CD5** en linfocitos T de la VLPA, así como en elementos dispersos de la pulpa esplénica (10x).

10.4. CÉLULAS ESTRELLADAS PERISINUSOIDALES

- *Actina de músculo liso (SMA)*^{7,38}
- *CD-56/N-CAM (Neural cell adhesion molecule)*⁸⁷
- *Desmina*^{7,188,203}
- *GFAP (Glial fibrillary acidic protein)*^{22,46}
- *Receptor de estrógenos β* ²⁰⁷
- *Sinemina*²⁰⁶
- *Vimentina*: también positiva en células endoteliales y de Kupffer¹⁸⁸
- *Vitamina A*: autofluorescencia⁷⁸
- *WT-1 (Wilms' tumor-1 transcription factor)*: nuclear⁶⁷

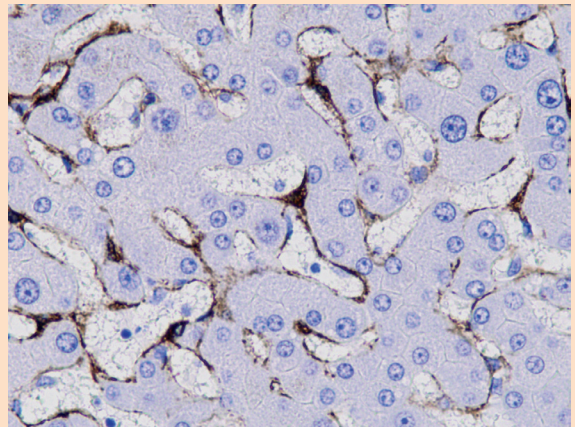


Figura 14.64. Actina de músculo liso. Con este anticuerpo se marca el citoplasma y las prolongaciones de las células estrelladas perisinusoidales de Ito (40x).

10.5. CONDUCTOS BILIARES

- *Anhidrasa carbónica-IX*¹⁵¹
- *CA-19.9 (Cancer antigen-19.9)*
- *Cadherina-E*: membrana plasmática y citoplasma
- *Catenina- β* : membrana plasmática
- *CD138*
- *CKAE1/AE3*: tinción intensa
- *CKs 7, 8, 18 y 19*: tinción intensa^{149,190}
- *CKs 34 β E12, 5/6, 10, 17 y 20*: negativas
- *Claudina-4*¹⁰⁰
- *EMA (Epithelial membrane antigen)*: membrana apical
- *Ep-CAM (Epithelial cell adhesion molecule)*

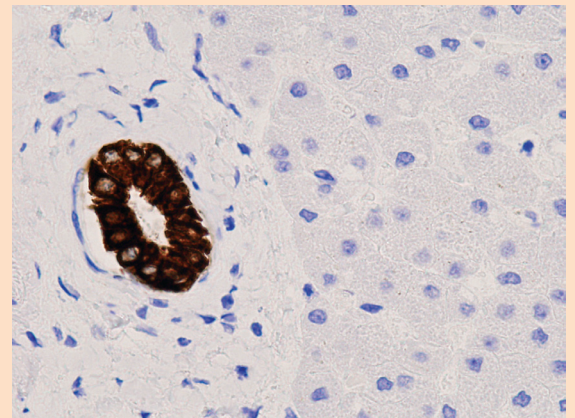
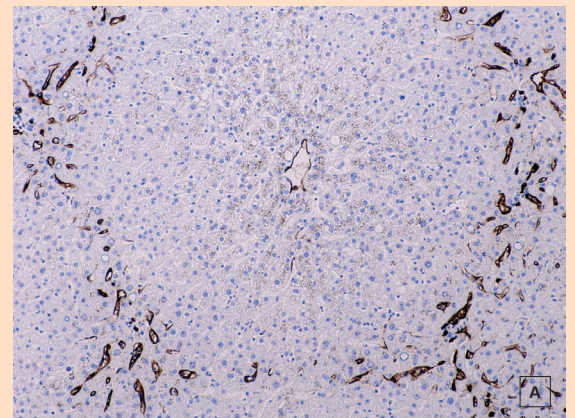


Figura 14.65. CK7. Tinción específica e intensa del conducto biliar, mientras que los hepatocitos son negativos (40x).

10.6. VASOS

- *CD31*: vasos sanguíneos y linfáticos
- *CD34*: vasos sanguíneos y linfáticos
- *D2-40/Podoplanina*: vasos linfáticos



1.1.9. Citoquinas y factores de crecimiento en queratinocitos

- *EGFR* (*Epidermal growth factor receptor*)⁹
- *FGF-B* (*Fibroblast growth factor-basic*)⁴⁴
- *GM-CSF* (*Granulocyte macrophage- colony stimulating factor*)^{22,66}
- *IL-1* y *-6* (*Interleukin-1, -6*)^{7,92}
- *TGF- α* y *- β* (*Transforming growth factor- α , - β*)⁹³
- *TNF- α* (*Tumor necrosis factor- α*)⁹²

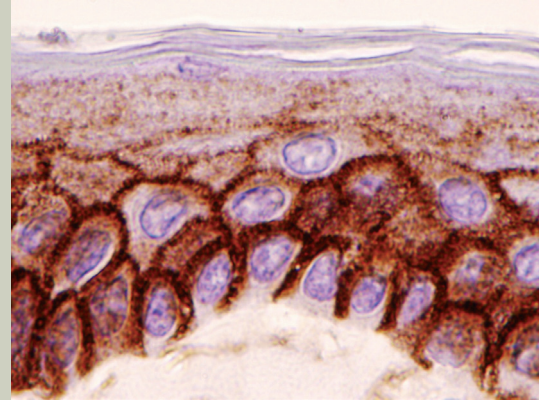


Figura 19.8. EGFR. Inmunorreactividad citoplasmática y de membrana que disminuye conforme ascendemos hacia las capas superficiales. La células de la capa basal muestran marcaje intenso de las caras laterales y la cara superficial (100x).

1.2. MELANOCITOS

- *ACTH* (*Adrenocorticotropic hormone*): promueve la biosíntesis de eumelanina¹²³
- *Bcl-2* (*B-cell lymphoma-2*): también en células de Merkel⁹⁴
- *CD117/c-Kit*: sensible^{21,39,67}
- *c-Met/HGFR* (*Mesenchymal-epithelial transition factor/Hepatocyte growth factor receptor*)¹⁰⁴
- *FGFR-1* (*Fibroblast growth factor receptor-1*)⁶
- *HMB-45* (*Human melanoma black-45*): melanocitos embrionarios, bulbo piloso y melanocitos activados (pero no en reposo)^{38,61}
- *Melan-A/MART-1* (*Melanoma antigen recognized by T cells-1*): sensible y específico^{11,15,61,64}
- *MITF* (*Microphthalmia associated transcription factor*): también marca mastocitos y macrófagos¹⁰
- *MSH- α* (*Melanocyte-stimulating hormone- α*): promueve la biosíntesis de eumelanina¹²³
- *NKI/C3*: también tiñe histiocitos¹²⁷
- *PLN-2*: sensible y específico^{10,99}
- *Proteína relacionada con tirosinasa 1/Mel-5*: sensible y específica^{8,21,118}
- *Proteína S-100*: baja sensibilidad para melanocitos intraepidérmicos e inespecífica (en epidermis se marcan también las células de Langerhans)¹⁰
- *Tirosinasa*: sensible y específica¹⁰
- *Vimentina*: inespecífica (en epidermis se tiñen también las células de Langerhans)

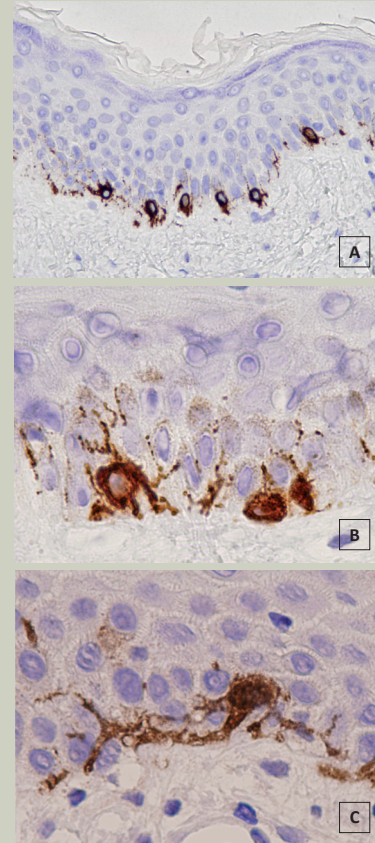


Figura 19.9. A) Melan-A. Tinción específica de melanocitos (40x). **B) Panmelanoma (Melan-A + Tirosinasa + HMB45).** Marcaje del citoplasma y las prolongaciones de los melanocitos (100x). **C) Proteína S-100.** Inmunorreactividad en núcleo, citoplasma y dendritas de un melanocito (100x).

10 (focal y débil), 17 (capa luminal, débil) y 19 (capa luminal)

- *CKCAM5.2* (CKs 7 y 8): aunque se ha descrito negatividad con este marcador,⁷⁷ en nuestra experiencia las CKs 7 y 8 muestran positividad débil y focal
- CKs 6 y 16⁶¹
- CKs 18 y 20: negativas
- *EGFR* (Epidermal growth factor receptor):⁷² capa basal
- *EMA* (Epithelial membrane antigen): borde luminal⁷⁷ y capa basal (microgranular)
- *GCDFP-15* (Gross cystic disease fluid protein-15): luz¹⁰²

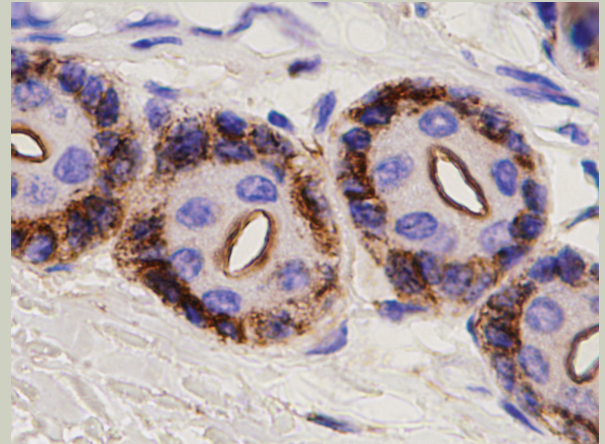


Figura 19.22. EMA. Tinción luminal y de la capa basal del conducto secretor (40x).

4.4. ACROSIRINGIO

- *CEA* (Carcinoembryonic antigen)
- CKs 1, 10, 11 y 19⁸³
- *EMA* (Epithelial membrane antigen)⁵
- *Filagrina*⁵⁶
- *GCDFP-15* (Gross cystic disease fluid protein-15)
- *HLA-DR* (Human leucocyte antigen-DR)⁹⁰

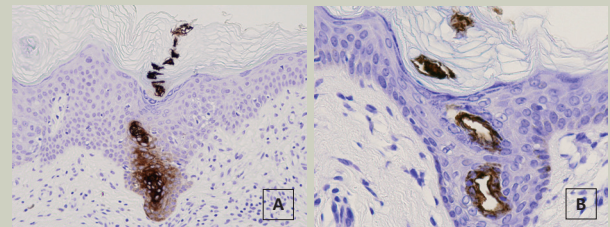
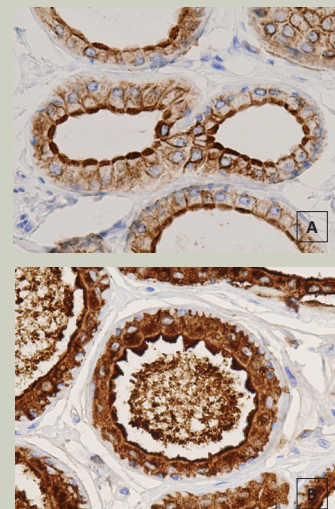


Figura 19.23. A) *GCDFP-15*. Tinción específica del acrosiringio con marcaje luminal y periluminal (20x). B) *CEA*. En este caso la inmunorreactividad se localiza exclusivamente en la capa de células luminales (40x).

5. GLÁNDULAS SUDORÍPARAS APOCRINAS

5.1. UNIDAD SECRETORA

- *CD117/c-Kit*⁶⁷
- *CEA* (Carcinoembryonic antigen): tinción débil y focal^{77,102}
- CKs *AE1/AE3*, *34βE12* y 10
- *CKCAM 5.2* (CKs 7 y 8): positiva con acentuación del borde luminal⁷⁷
- CKs 8, 18 y 19⁶¹
- CKs 5/6, 10, 17 y 20: negativas
- *EGF* (Epidermal growth factor)¹⁰³
- *EGFR* (Epidermal growth factor receptor)¹⁰³
- *EMA* (Epithelial membrane antigen): acentuación del borde luminal^{77,102}
- *GCDFP-15* (Gross cystic disease fluid protein-15): componente secretor y luz de los conductos¹⁰²



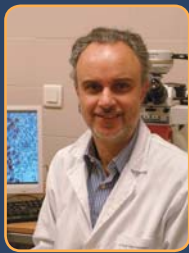
La inmunohistoquímica es una tecnología que ha revolucionado el panorama científico desde sus inicios ya que permite la identificación *in situ* de cualquier proteína respetando el sustrato morfológico. No obstante, éste es el primer texto que aborda de forma sistemática las posibilidades de su aplicación en Histología para la identificación precisa de los diferentes componentes tisulares en el contexto de un individuo sano.

De los 20 capítulos que configuran este *Atlas de Inmunohistoquímica*, los tres primeros están dedicados a una descripción minuciosa y actualizada de las técnicas inmunohistoquímicas y sus aplicaciones, tanto en microscopía óptica como electrónica, todo ello ilustrado con más de 100 esquemas originales en color de gran calidad. Los restantes capítulos abordan de forma clara y progresiva el reconocimiento de los distintos elementos que integran los tejidos, órganos, aparatos y sistemas del cuerpo humano mediante una descripción exhaustiva de sus marcadores inmuno-específicos.

Esta obra se convierte así en una verdadera “guía visual microscópica” del organismo humano, pues aporta más de 900 microfotografías en color de calidad excepcional ilustrativas de los marcadores más útiles para poner de manifiesto cada tipo celular mediante inmunohistoquímica.

El *Atlas de Inmunohistoquímica* va dirigido a los profesores y alumnos de Histología en los grados de Medicina, Biología, Odontología, Veterinaria y otras Ciencias de la Salud; a los técnicos superiores de Anatomía Patológica; a los M.I.R. de Anatomía Patológica, así como a los especialistas en esta materia. Asimismo, este Atlas constituye una obra de referencia para todos aquellos profesionales que, procediendo de áreas ajenas a la morfología microscópica, tengan que enfrentarse al reto de la identificación específica de los distintos tipos de células o tejidos en el curso de sus investigaciones.

Como valor añadido para la docencia, el libro va acompañado de un CD que contiene todos los esquemas y microfotografías mostrados en el mismo.



Tomás García-Caballero es licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de Compostela desde 1980 y especialista en Anatomía Patológica desde 1985. Defendió su tesis Doctoral sobre la estructura de las células de Merkel en la Universidad de Santiago en 1985. Tras una estancia postdoctoral en la Universidad Lyon-Sud (Francia), obtuvo la plaza de Profesor Titular de Ciencias Morfológicas en 1987 y desde el año 2000 es Catedrático de Histología. Su principal campo de interés científico ha sido la “localización inmunohistoquímica de péptidos y receptores hormonales en tejidos normales y tumorales”. En la actualidad está interesado principalmente en el estudio de marcadores tumorales predictivos, especialmente HER2 en cáncer de mama y gástrico (ha participado en la elaboración de las guías españolas para la determinación de HER2 en ambos tipos tumorales). Ha publicado más de 120 trabajos científicos, un libro sobre Técnicas de Hibridación *in situ* y 8 capítulos de libros. Dirige el Laboratorio de Inmunohistoquímica y Dianas Terapéuticas del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Santiago y desde noviembre de 2011 es Coordinador del área de Oncología del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Complejo Universitario Hospitalario de Santiago de Compostela.



Inés Martín-Lacave es Doctora en Biología por la Universidad de Sevilla (1978). En 1983 obtuvo la plaza de Profesora Adjunta de Histología y Embriología General en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. Durante 15 años fue Responsable del Laboratorio de Inmunohistoquímica del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. En el año 2004 obtuvo la cátedra de Histología, siendo la primera mujer en alcanzar dicha categoría profesional en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. Ha realizado estancias en el Instituto Pasteur y la Universidad de Marie y Pierre Curie (París), el New England Medical Hospital (Boston) y la Universidad de Minnesota. Ha centrado su investigación, principalmente, en la glándula tiroidea, contribuyendo a desvelar el enigma que representaba su población endocrina minoritaria, las células C o parafoliculares. Es autora de más de 90 artículos científicos y directora de 16 Tesis Doctorales. Dirige el grupo denominado “Sistema Neuroendocrino Difuso”, dentro del Plan Andaluz de Investigación de la Junta de Andalucía. Ha publicado el libro *Atlas Práctico de Histología*, (Ed. Díaz de Santos, Madrid, 2ª edición, 2005), que está en proceso de reedición.

ISBN: 978-84-9969-013-1



9 788499 690131

E-mail: ediciones@diazdesantos.es
internet: <http://ediciones.diazdesantos.es>