

# Manual de Calidad de Inmunohistoquímica en Anatomía Patológica

HOSPITAL  
**DONOSTIA**

Servicio de Anatomía  
Patológica

**2007**



Osakidetza

# **Manual de Calidad de Inmunohistoquímica en Anatomía Patológica**

**Dr. Manuel Vaquero  
S. Anatomía Patológica**

**2007**



# ÍNDICE

Introducción .....	5
Fijación de tejidos .....	7
Recuperación antigenica .....	9
Cuantificación del resultado	
inmunohistoquímico .....	10
Realización de inmunohistoquímica	
en preparaciones citológicas .....	11
Evaluación de nuevos anticuerpos .....	12
Tipos de anticuerpos .....	14
Anticuerpos disponibles .....	14
Paneles de anticuerpos .....	14
• Primario desconocido .....	14
• Tumores indiferenciados .....	17
• Utilidad del EMA .....	17
• Mama .....	17
• S. Nervioso: neurodeg. y tumores .....	18
• Pulmón/mesotelio .....	20
• Piel .....	21
• Hígado .....	21
• Riñón-urotelio/próstata/testes .....	21
• Ovario/trofoblasto .....	24
• Endocrinos-neuroendocrinos .....	25
• Partes blandas .....	25
• Algoritmo en carcinoma colorectal .....	26
• Hematopoyéticos .....	27
Controles externos recomendados .....	28

Hoja de petición de estudios inmunohistoquímicos . . . . .	30
Anexo: Ejemplo de la base de datos de anticuerpos . . . . .	31

## **Introducción (J Histotech 1999; 22:163; Arch Pathol Lab Med 2000;124: 945)**

El uso de tinciones de tejidos para facilitar su observación microscópica se inició con la hematoxilina-eosina en el siglo XIX. En el primer tercio del siglo XX se introduce la histoenzimología que utiliza tejidos sin fijar y de la que quedan únicamente restos, como los estudios con DPNasa y ATPasa en enfermedades musculares. La primera inmunohistoquímica se realizó con anticuerpos fluorescentes sobre tejidos frescos como los que se utilizan actualmente en diversas enfermedades de piel y riñón. Los métodos inmunoenzimáticos (peroxidasa, avidita-biotina) que permitían amplificar la señal del cromógeno favorecieron la utilización de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Actualmente se utilizan polímeros sintéticos para amplificar la señal (Envision, Powervision).

La inmunohistoquímica es una técnica esencial en el diagnóstico anatomico-patológico de las enfermedades, fundamentalmente de las neoplásicas. Para que su utilidad sea plena es necesario realizar la fijación de los tejidos, las indicaciones de uso, las técnicas y la lectura y valoración de los resultados ateniéndose a unos criterios de Controles de Calidad tanto internos –del propio servicio– como externos, en nuestro caso los auspiciados por la Sociedad Española de Anatomía Patológica.

Con el objetivo de servir de guía para la obtención de resultados óptimos con las técnicas de inmunohistoquímica se recogen en este Manual los distintos apartados necesarios para conseguir, primero, unos niveles de calidad estándares y que ello conduzca después a su mejora continua.

En el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Donostia se cuenta con un laboratorio de Inmunohistoquímica con los medios técnicos y una cantidad suficiente de anticuerpos que permiten obtener los mejores

resultados diagnósticos. Sin embargo, es necesario organizarlos y gestionarlos adecuadamente para que cualquiera de los patólogos del servicio obtenga la mayor eficacia y reproducibilidad con los mismos. Por ello, es imprescindible contar con una base de datos que incluya todos los anticuerpos y sus características, con una guía técnica y con indicaciones sobre paneles de conjuntos de anticuerpos según las patologías a estudiar y algoritmos diagnósticos para las mismas; también deben existir controles internos en el mismo corte o de tejidos o tumores ad hoc que permitan unas valoraciones cuantitativas objetivas con mínimas variaciones inter e intraobservador.

La estandarización de cada uno de los pasos, desde la recogida del tejido hasta la valoración final del resultado obtenido, es clave para que la inmunohistoquímica sea totalmente fiable y, a la vez, que el gasto realizado sea el más ajustado a las necesidades. Con estos fines nace este Manual.

Agradezco la colaboración de los patólogos del servicio, así como el apoyo y la asistencia técnica recibida para la realización de este trabajo a los técnicos del laboratorio de inmunohistoquímica —Elena, Juana y Puri—; a Koro, supervisora del servicio, y a Linda, por su apoyo informático. Sin ellas la tarea hubiese sido mucho más ardua y el resultado inaccesible.

## Fijación de los tejidos

La inmunohistoquímica se puede realizar en tejidos de biopsia y de autopsia, generalmente fijados en formol e incluidos en parafina, así como en material de citología.

La fase de fijación del material para inmunohistoquímica es esencial. Una fijación inadecuada impide cualquier resultado fiable.

El fijador que se utilizará para inmunohistoquímica es el formaldehído al 4% tamponado a pH 7,4 (formalina). El período ideal de fijación no será menor de 24 horas ni mayor de 48 horas. Fuera de estos estándares la calidad de la técnica baja sensiblemente. Es aconsejable, por tanto, indicar en la hoja de petición de la biopsia la hora en que se introdujo en formol. Hay evidencias de que la fijación a mayores temperaturas que la ambiental empeora los resultados. Lo ideal para la piezas mayores es mantenerlas en el frigorífico a 4º C si se van a dejar toda la noche antes de tallarlas. El material autópsico ofrece generalmente malos resultados debido a los fenómenos postmorten que sufren los tejidos. La inmunohistoquímica con vimentina permite observar el deterioro sufrido durante la fijación. Las piezas que vayan a procesarse el fin de semana iniciarán dicho procesamiento el mismo viernes para evitar que permanezcan excesivo tiempo en el formol; en caso de no ser posible, es preferible iniciar el procesamiento por alcohol de 70.

Cuando el tejido ha estado menos de 24 horas en formol, se produce una fijación híbrida: periféricamente se fijan con formol mientras las partes profundas centrales lo hacen gracias a los alcoholes que se emplean durante el procesamiento. Esto les hace más sensibles a los métodos de recuperación antigénica y resultan más falsos positivos.

Las citologías, al no tener que fijarse en formol, llevan un procesamiento diferente que se recoge en el apartado correspondiente.

En caso de necesitarse utilizar un método de descalcificación se elegirán los más suaves, preferiblemente el EDTA. Si se han empleado ácidos, es crítico realizar un lavado de duración variable con agua corriente, de mayor duración cuanto más haya durado la descalcificación.

## Métodos de recuperación antigénica

Durante la fijación con formalina se producen puentes metilo cruzados entre las proteínas y se forman compuestos cárnicos adyacentes. Estos compuestos afectan también a las zonas antigenicas y deben eliminarse para obtener un resultado óptimo en la inmunohistoquímica.

El método de recuperación antigenica se realiza fundamentalmente mediante incubación con calor, en torno a los 100 °C, en búferes de citrato o EDTA. Menos frecuente es el uso de enzimas proteolíticas, sin calentamiento, ya que dejan un fondo mayor y favorecen el desprendimiento del tejido.

- Protease-induced epitope retrieval (PIER)

Descrito para inmunofluorescencia por Huang en 1976. En parafina tan sólo es útil para un número limitado de anticuerpos y además es difícil de reproducir. El que da resultados más estandarizados es la proteasa. Las variables más importantes son el tiempo de digestión y la concentración de la enzima.

- Heat-induced epitope retrieval (HIER)

En 1991 Shi comienza a utilizar el microondas, entre 8 y 12 minutos, introduciendo las laminillas en buffer citrato 0,001 M a pH 6. El mayor problema es que algunos epitopos se dañan con el calor de forma irreversible y esto acontece más fácilmente si el tejido está poco fijado. Para evitar el desprendimiento de los cortes tisulares se utilizan laminillas adherentes especiales.

## Cuantificación del resultado inmunohistoquímico (J Histochem 2005; 28:89)

Se seguirá en general la siguiente pauta, aunque hay frecuentes casos específicos en los que los porcentajes y su significado pueden variar:

- Negativo (-): total negatividad o menos del 50% de las células "diana" con menor intensidad que el control.
- Positividad débil (+/-): más del 50% de las células "diana" con menor intensidad que el control.
- Positivo (+): más del 50% de las células "diana" con igual o mayor intensidad que el control.

El límite de intensidades entre negativo y positividad débil o positivo se hace por comparación con un control interno existente u otro externo *ad hoc*.

## Realización de inmunohistoquímica en preparaciones citológicas

Lo mejor es prever siempre un bloque para procesar en parafina. Hay dos posibilidades, o bien realizar la inmunohistoquímica sobre la misma laminilla citológica o también despegar las zonas deseadas y transferirlas a otros portas. Esta última es más tediosa pero ofrece los mejores resultados y permite sacar varios portas de una sola extensión citológica. El método es muy reciente y se desarrolla de la siguiente manera:

Es importante la utilización del medio Mount-Quick (Newcomer supply. Middleton WI) (Cancer Cytopathol 2005;105:158/ J Histochem 2002;25:251).

- Echad el medio sobre la laminilla y endurecerlo en estufa a 50-60 °C varias horas.
- Marcad las zonas a estudiar con rotulador indeleble.
- Calentad al baño María (45 °C) durante 15-20 minutos para ablandarlo.
- Levantad el medio del porta con un bisturí y cortadlo en lonchas.
- Transferid a porta adherente especial y mantened durante un minuto una presión con papel de filtro humedecido.
- Mantened a 60 °C durante toda la noche.
- Retirad el MontQuick mediante tres pasos por xilol.
- Rehidratar (No es necesario desteñir si se va a utilizar HIER).

## Evaluación de nuevos anticuerpos (J Histochem 2001; 24:275)

**1. Selección de un nuevo anticuerpo primario:** los motivos pueden ser por que existan nuevas demandas o para sustituir a otro existente.

- Deben predecirse el número de test que se realizarán anualmente y el coste de cada estudio.
- Deben conocerse la dilución –aunque se preferirán los no diluidos previamente–, el método de recuperación antigénica y la sensibilidad y especificidad del anticuerpo. Vg. para p53 el D07 o el pAb 1801; HER2/neu mejor el polyclonal de conejo pero falsos +. Los polyclonales tiene en general mayor afinidad y pueden emplearse diluciones >1/1000, aunque tienden a dar “más fondo” lo que obliga a bloqueos suplementarios (vg. con la clona LeuM1 tipo IgM debe utilizarse un anticuerpo secundario de tipo IgM).

### 2. Optimización de la inmunorreactividad

Los factores más importantes son.

- Dilución del anticuerpo primario.
- Duración de la incubación del primario.
- Tipo y concentración del anticuerpo secundario.
- Técnica de recuperación antigénica empleada.
- Temperatura de incubación.
- Sistema de detección y amplificación.

En la práctica se manejan únicamente tres variables:

- Dilución del anticuerpo primario.
- Tiempo de incubación del primario (si se aumenta el tiempo se puede diluir más el anticuerpo primario).
- Técnica de recuperación antigénica (el EDTA alcalino suele ser mejor que el citrato. Excepciones: LMP-1 y CD21, en los que se preferirán enzimas).

La hoja de trabajo para la validación de nuevos anticuerpos es la siguiente (tabla orientativa):

Dilución*	Recup antg / T° **	Tiempo antc	Sist incubación	Resultados ***
1/10 1/20 1/40 1/80	10 mM citrato pH 6 / 20 minut	32 minutos	Envision	0- negativo 1- positivo débil en algunas células diana
1/10 ... 1/80	1mM EDTA pH 8/ 20 minut	32 minutos	Envision	2- positivo débil en muchas células diana 3-positivo moderado en la mayoría células diana
1/10 ... 1/80	Proteasa 8 minutos	32 minutos	Envision	4-positivo fuerte en la mayoría células diana

\* Seguid diluciones según especificaciones de cada anticuerpo.

\*\* Calentad (olla, microondas o autoclave) a 100°C 15-20 minutos y otros tantos para enfriar. En muchos casos, es mejor el pH 9.

\*\*\* Sólo para ajustar la valoración. No para resultados en diagnósticos.

Además de la positividad de la diana debe valorarse el fondo. Dicha tinción de fondo tiene causas variadas. A veces es debido a que el anticuerpo no está totalmente purificado y tiene inmunoglobulinas inespecíficas. Muchas veces es por una titulación deficiente del anticuerpo primario y/o secundario (disminuid la concentración y aumentad los tiempos para solucionarlo). En las tinciones citoplásmicas deben tenerse en cuenta los falsos positivos como los debidos a biotina endógena (neutralizadla con avidina después del anticuerpo primario) y con las peroxidásas (se neutraliza con agua oxigenada) y fosfatasa (se bloquea con levamisol) endógenas.

Para detectar problemas de fijación es útil introducir un control de vimentina (Dako) pero sin realizar con ella recuperación antigénica alguna.

## Tipos de anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser poli o monoclonales. Estos últimos son más específicos y se obtienen mediante el método de hibridoma de Kohler que consiste en la fusión de células esplénicas de un ratón inmunizado con una línea celular de mieloma no secretor murino. Dado que el conejo es más fácil de inmunizar que el ratón actualmente se están introduciendo anticuerpos monoclonales de conejo a pesar de que este animal no padece mieloma, por lo que deben generarse heterohibridomas conejo-ratón. Los anticuerpos de conejo son más sensibles y parecen conservar la especificidad. (Am J Clin Pathol 2005;124:295).

## Anticuerpos disponibles

Como puede observarse en la base de datos, anexada a modo de ejemplo al final del manual, se recogen todos los datos necesarios para la identificación, manejo y gestión de calidad de la técnica de inmunohistoquímica.

De ella, junto con la hoja de petición, se desprenderán las estadísticas mensuales de anticuerpos utilizados, porcentaje de positividad de cada uno e incidencias técnicas.

**Paneles de anticuerpos** (Dabs. Diagnostic Immunohistochemistry 2002; [www.immunohipermart.net](http://www.immunohipermart.net); [www.immunoquery.com/login.cfm](http://www.immunoquery.com/login.cfm); [www.cap.org](http://www.cap.org))

**Metástasis de primario desconocido** (J Histoch 1999; 22:209)

- Las citoqueratinas (CK) se clasifican según el Pm y el punto isoeléctrico (Moll). In vivo tienden a expresarse en parejas, una básica y la otra ácida (CK8/CK18; CK5/CK14). En la práctica las más útiles son:

- PanCK AE1-AE3.
- 34beta E12 (alto Pm): se detecta en epitelios complejos como el ductal, el transicional y los escamosos (CK 1,5,10 y 14), en carcinomas escamosos pobremente diferenciados y en mesotelio.
- CK5/6: positivo en células basales, en carcinomas escamosos pobremente diferenciados y en mesotelio.
- CK7: se detecta en epitelios simples de pulmón, cérvix, mama, ductos biliares, tubos colectores renales, vejiga y mesotelio.
- CK19 muy útil en carcinoma de páncreas, estómago, colon, tracto biliar, hígado y mama. El Ca papilar tiroideo suele ser positivo frente al 50% de los foliculares.
- CK20: se detecta en células foveolares gástricas y células "umbrela" de la vejiga. Muy positivo en carcinoma de células de Merkel. Positivo en carcinoma de colon.
- La utilización simultánea de CK 7 y CK20 ofrece grandes ventajas en la orientación de un posible primario:

CK7/CK20 +	CK7/CK20 negativas	CK7+/ CK 20 negativa	CK7 negativa/ CK20 +
Páncreas	Escamoso pulmón	Timoma	
Vejiga	Neuroendocrinos	Pulmón No oat cell	
Mucinoso de ovario	Hepatocarcinoma	Mesotelioma	
Ca Merkel	Riñón	Mama	
	Próstata	Endometrio	
		Seroso de ovario	Colorrectal

- CEA: generalmente positivo en carcinomas de pulmón, hígado y colorrectal. A veces positivo en mama, transicionales y cérvix. Generalmente negativos en mesotelioma, riñón, endometrio y ovario.
- p 16- sobreexpresado en carcinomas y displasias asociadas a VPH.

Otras combinaciones útiles para identificar el origen de los carcinomas son:

	34BE12	CAM 5.2	AE1/AE3	CK7	CK 20	TTF-1
C Merkel	N	+	+	N	+	N
Oat cell	N	+	+	-/+	N	+
Adc pulm	-/+	+	+	+	N	+/-
Mama	-/+	+	+	+	N	N
Seminoma	N	N	N	N	N	N
Endometr	-/+	+	+	+	N	N
Vejiga	-/+	+	+	+	+	N
Parótida	-/+	+	+	+	N	N
Neuroend	N	+	+	+	N	N
Páncreas	-/+	+	+	+/-	-/+	N
Biliar	-/+	+	+	+/-	+/-	N
Gástrico	N	+	+	+/-	+/-	N
Colorrectal	N	+	+	N	+	N
Próstata	N	+	+	-/+	N	N
Renal	N	+	+	N	N	N
Germinal	N	+	+	+	N	N
Hepatoca	N	+	N	N	N	N
Muc ovarí	N	+	+	+	+	N
No muc ov	N	+	+	+	N	N
Tiroïdes	-/+	+	+	-/+	+/-	+
Adrenal	N	N	N	N	N	N
Timo	-/+	+	+		N	N
Endocérvix	N	+	+	+	N	N

Algunos anticuerpos son más órgano-específicos:

- PSA, tiroglobulina, TTF-1, proteína surfactante tipo A.
- Receptores de estrógenos y/o progesterona generalmente positivos en mama, endometrio, cérvix, ovario,

tiroides, neuroendocrinos y sudoríparos. Son siempre negativos en hepatocarcinoma, carcinoma colorrectal y en el pulmonar no oat cell.

- Tumores indiferenciados

	CAM 5.2	EMA	S-100	ALC	Fosf Al Plac
Carcinoma	+	+	-/+	N	-/+
Melanoma	N	N	+	N	N
Linfoma	N	N	N	+	N
No semino	+	N	N	N	+
Seminoma	R-N	N	N	N	+

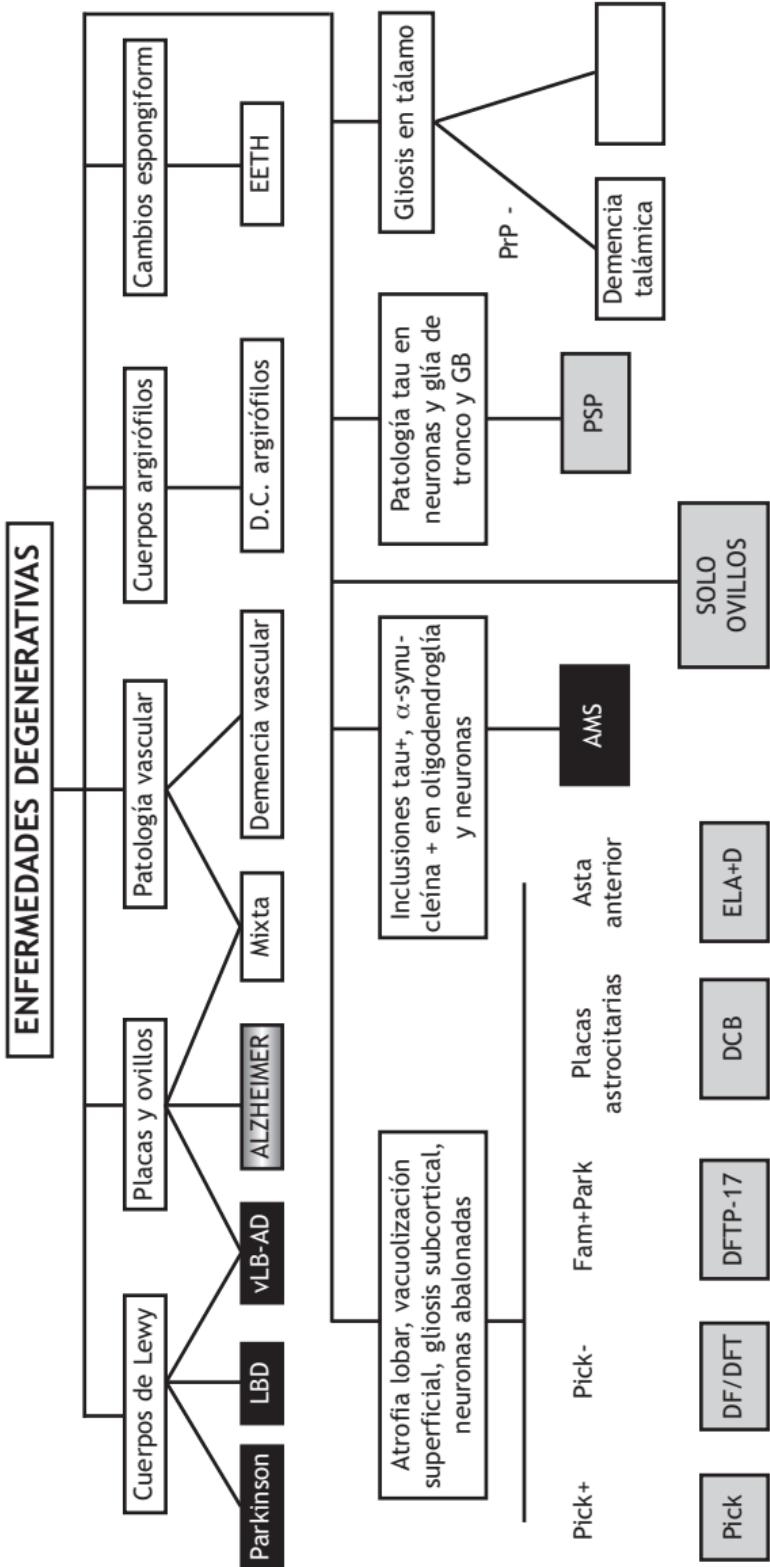
- Reactividad del EMA en carcinomas y tumores no epiteliales.

Típicamente positivo	Generalmente negativo	Positividad más focal
Biliar ductos	Tumores germinales excepto coriocarcinoma	Perineuroma
Carcinomas sarcomatoides		Neurofibrosarcomas
Endocérvidox		Sarcoma sinovial
Endometrio		Plasmáticas
Mama		Eritroblastos
Meningioma		Cel L-H Hodgkin
Mesotelioma		ALK linfoma
Páncreas		Leiomiosarcoma
Piel y anejos		Hist fibroso maligno
Próstata ductos		
Pulmón		
Salival		
Tiroides		
Urotelio		

- Mama

- Para el diagnóstico diferencial entre hyperplasia ductal e hyperplasia atípica-Ca in situ son útiles la citoqueratina 34bE12 y la CK 5/6.
- Para valorar la posible invasión estromal se utilizan la p63 y la calponina.

- Enfermedades neurodegenerativas



En la clasificación es importante la conjunción de: datos clínicos, distribución anatómica de las lesiones, tipo de cambios morfológicos y positividad, según en tipo de patología, para los siguientes anticuerpos:

- Amiloide- $\beta$
- Proteína Glial Fibrilar ácida
- Sinucleína
- Tau
- Ubicuitina

- **Tumores de sistema nervioso central**

Muy importante: en las intraoperatorias hay que estar seguros de que el material es representativo de la lesión. ¡Ojo!: En las biopsias obtenidas con esterotaxia, si se usa toda la muestra para la técnica de "aplastamiento" en vez de las improntas, no quedará material para parafina. Hay que tener además en cuenta que algunos glioblastomas pueden dar positividad para citoqueratinas, por lo que se preferirá el CAM 5.2. En general suelen ser útiles para el diagnóstico y clasificación la utilización de Ki-67 y p53.

- Con células claras

	PGFAP	EMA	Synapt	Kp-1
Oligodendrogioma	+	-	-	-
Xantoastrocitoma	+	-	-	-
Ependimoma	+	-	-	-
T disemбриoplástico	+	-	+	-
Neurocitoma	+	-	+	-
Meningioma	-	+	-	-
Hemangioblastoma	-	-	-	-
Ca renal	-	+	-	-
Desmialinización	+	-	-	+
Infarto	+	-	-	+

- Con células epitelioides

	GFAP	CAM 5.2	EMA	S-100	Cromog	Sinapt
Oligodendrogioma	+	-	-	+	-	-
Ependimoma	+	-	-	+	-	-
Papiloma plexos	-	+	-	+	-	+
Cordoma	-	+	+	+	-	-
Craneofaringioma	-	+	+	-	-	-
Carcinoma	-	+	+	-	-	-
Adenoma hipofisis	-	+	+	-	+	+
Paraganglioma	-	-	-	-	+	+
Meningioma	-	-	+	-	-	-
Melanoma	-	-	-	+	-	-
Hemangioblastoma	-	-	-	-	-	-

- Tumores con células pequeñas/anaplásicas

	Viment	GFAP	Synap	S100	Desmi	CK	EMA	CD20
Ependimo-blast	+/-	-/+	-	-	-	-	-	-
Medulob/P NET	-	-/+	+/-	-/+	-	-	-	-
Rabdomios	-	-	-	-	+/-	-	-	-
T teratoide	+	+/-	-	-	-	+/-	-/+	-
Hemangio-peric	+	-	-	-	-	-	-	-
Linfoma	-	-	-	-	-	-	-	+
Ca cel pequeña	-	-	-	-	-	+	+	+/-

• Respiratorio

- Carcinomas pulmonares: epidermoide vs oat cell

	Panqueratin/ CAM 5.2	Cromogranina A	TTF-1
Ca epidermoide	+ difuso	-	-
Oat cell	+/- puntiforme	+	+

- Mesotelioma epitelial vs carcinoma

	Calre-tinina	Trombo modulin	DO 4	CK 5/6	CEA	CD15	BerEP 4
Mesotelioma	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-
Carcinoma	-	-	-	-/+	+/-	+/-	+

• Piel

- Enfermedad de Paget vs carcinomas/ melanoma

	CK 7	Pan CK	CK 20	CEA	S-100
Paget mama	+	+	-	+	- /+
Paget vulva	-/+	+/-	-/+	+/-	-/+
Ca recto	-	+	+	+	-
Ca urotelial	+	+	-	-/+	-
Melanoma	-	-	-	-	+
Bowen	-		-	-	-

• Hígado

- Carcinomas hepáticos primarios

	CK AE1-AE3	CEA	Hepatocito 1	Alfa FP
Hepatocarcinoma	-/+	-/+	+	+/-
Colangiocarcinoma	+/-	+/-	-/+	-/+

• Genitourinario

- Tumores renales: perfiles inmunohistoquímicos

- Adenoma metanéfrico: WT1 y CD 57 positivos; CK 7 y EMA negativos
- Angiomiolipoma: HMB 45 y actina positivos; CK negativas
- Carcinomas con translocación Xp11.2/TFE3: proteína TFE 3 positiva nuclear
- Carcinoma de células claras

Positivos	Negativos
CK 7 EMA Vicentina CD10 Fosfatasa alcalina	CK alto Pm CEA S-100 Inhibina Otros: Mucina, Oil red-O, hierro coloidal Hale

- Carcinoma papilar renal

Positivos	Negativos
CK AE1-AE3	CK alto Pm
CK 7	Ulex europeus lectina
Vicentina	
Mucina	

- Carcinoma cromófobo

Positivos	Negativos
CK AE1-AE3	CD10
CK 7	Vimentina
CK alto Pm (a veces negativo)	
E-Cadherina	
EMA	
Hierro coloidal Hale	
Azul alcián	

- Carcinoma ductos colectores

Positivos	Negativos
EMA	CD15
CK 7	
CK alto Pm	
Vimentina	
CEA (focal)	
Mucina	

- Carcinoma urotelial

Positivos	Negativos
CEA	Vimentina
CK alto Pm	
p63	
CK 7	
CK 20 (*)	CDX2
-catenina (a diferencia de colon)	

(\*) CK20 para diag. Dif. Entre Ca in situ (+) e hiperplasia urotelial

- Cuadro sinóptico de neoplasias renales (Clin Lab Med 2005; 25:247)

	Cel Claras	Papilar	Cromó-fobo	Oncoci-toma	Ductos colec
CD10	<b>81-100%</b>	63-100%	+/- 26%	+/- 33%	-----
RCC marker	75-85%	75-96%	+/- 45%	-----	
Vimentina	+	+/-	-----	+/-	
EMA	+		+	75%	+
CK 7	----	+ (tipo1)	73-100% *	19-100% **	+/-
CK 20	----	+/- (tipo 2)	----	+/- (50-80%)	-----
CK 15	75%	<b>100%</b>	+/- (25%)	63%	
CD 117	+/- (15%)	+/- (28%)	57-100% ***	70-100% ***	-----
Racemasa	-/+ (25%)	<b>100%</b>	-----	-/+ (15%)	
CK < Pm	+	+		+	
CK >Pm	----	-/+	----	----	+
E-Cadherina	5%	0% (tipo1) 38% (tipo2)	<b>95-100%</b>	<b>100%</b> ****	

(\*) intenso con refuerzo de membrana; (\*\*) focal y débil; (\*\*\* ) membrana; (\*\*\*\*) citoplásmico. A diferencia del cromófobo: éste patrón en anillo con CK 7-CK 19 y AE1-AE3

#### - Próstata (Histopathology 2005; 47:1)

- El AMARCR (antígeno monoclonal conejo P504S) es útil en PIN de alto grado y carcinoma prostático. Puede resultar positivo en adenosis y en el adenoma nefrogénico.
- PSA- debe utilizarse un policlonal y un carcinoma de alto grado como control.
- Para diferenciar un carcinoma de próstata de otro urotelial resultan útiles: el PSA para el origen prostático y las citoqueratinas de alto peso molecular (34 betaE12), p63 y la CK7 para identificar urotelio (puede ser positivo en Gleason altos y lo contrario la CK 20).

Para marcar basales resultan igual de eficaces la CK 5/6 y la p63 (ésta resiste más la electrocoagulación).

### - Tumores testiculares

Suelen ser útiles los siguientes anticuerpos:

- Fosf Alcalina Placentaria (membrana)- Seminoma, neopl germinal intratubular, gonadoblastoma, ca embrionario, TSE.
- HCG- Células sincitiotrofoblasto.
- Lactógeno placentario- trofoblasto intermedio.
- Inhibina- T estroma-cordones sexuales, trofoblasto intermedio.
- EMA-si sale positiva descartar un carcinoma metastásico.

	PLAP	CD 117	Pan CK	CD30	alfa-Feto	Inhibina	Vimentina
Seminoma	+(*)	+	-/+	-	-	-	-
Ca embrionario	+		+	+	-/+	-	-
TSE	+/-		+	-	+/-	-	-
Tcel Leydig**	-		-/+	-	-	+	+
T cel Sertoli	-		+/-	-	-	+	+

(\*) negativa en espermatocítico; (\*\*) S-100 y Melan A pueden ser positivos.

### - Tumores ováricos

	Epitelio Superf	Tecom	Granulosa	Sertoli Leydig	Tum anex Wolfi	Disgerminom	TSE	CaEm	Corio
EMA	+	-	-		-	-	-	-	-
Inhibina	-	+	+	+/-	+	-	-	-	-
MelanA	-	-	-/+	+	-	-	-	-	-
CK	+	-	-		-	-	+	+	+
AFP	-	-	-		-	-	+	-/+	-
HCG	-/+	-	-		-	-	-	-	+
CD30	-	-	-		-	-	-	+	-

### - Ca mucionoso ovárico vs Ca colon

	Colorrectal	Ovárico
CK 7	-	+
CK 20	+	-
CEA	+	-
Vimentina	-	-/+

- Lesiones trofoblásticas y simuladores

	Lugar placen	Nódulo placen	T trofo blástico	Ca escamoso
CK	+	+	+	+
Ki-67	-	-/+	+/-	+
HLP	+	-	+/-	-
PLAP	+	+	?	-

- Tumores endocrinos/neuroendocrinos (J Histo 1999; 22:239): cromogranina A (a veces falla en carcinoides hindgut y prolactinomas), sinaptofisina, Leu 7, CD57 (NCAM), inhibina alfa (células gonadales productoras de esteroides y corteza adrenal).
- Tumores de partes blandas (J Histo 1999;22:219)
  - CD31 (PECAM-1): endotelio, plaquetas, células madre hematopoyéticas.
  - CD34: dermatofibrosarcoma protuberans, tumor fibroso solitario, hemangiopericitoma, GIST, endotelio, progenitores hematopoyéticos, fibroblastos y lipoma fusocelular.
  - Factor XIII: histiocitoma fibroso.
  - S-100: melanoma, sarcoma de células claras, lipoma de células redondas.
  - HMB-45: melanomas, PEComas.
  - HHF.35, actina muscular alfa: células glómicas, miofibroblastos, mioepitelio y músculo liso.
  - Caldesmón: músculo liso y mioepitelio pero no en miofibroblastos ni rabdo.
  - Calponina: músculo liso, miofibroblastos, mioepitelio y, a veces, en sarcoma sinovial.
  - EMA: perineuromas, meningiomas, carcinoma renal y sarcoma sinovial (en éste focalmente pueden resultar positivos S100 y CD99).
  - Myo D1: en el núcleo para que sea específico de músculo estriado.
  - $\beta$ -catenina en fibromatosis (negativo en cicatrices).

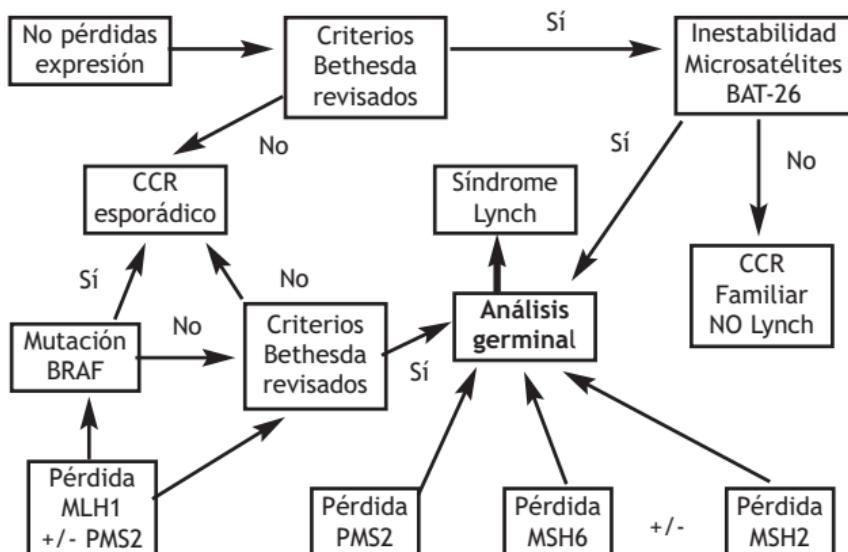
Por tumores son útiles:

- Sarcoma epitelioide: EMA, vicentina, CD34 (50%), actina (33%). La CK7 es negativa.

- Sarcoma alveolar: positividad de actina y desmina en el 50% casos. Proteína AE3 +.
- Osteosarcoma: osteocalcina.
- Swing/PNET: CD99; focalmente CK, neurofilamentos.
- Neuroblastomas: NSE y sinaptofisina positivos; CD99 negativo.
- T. cel. redondas pequeñas desmoplásico: positividad para CK, vimentina, EMA y desmina. NES +/-.
- Tumores de células pequeñas azules redondas (J Histoch 1999;22:289).

	ALC	Vim	Des	Act	MyoD	CK	CD 99	NF	Cra	Sy-nap	TdT	Inhib	S 100
Leuc/linf	+	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	-
Rabdo	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurobl	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Swing	-	+	-	-	-	-/+	+/-	-/+	+	-/+	-	-	-
S sinovial	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
DSRCT	-	+	+	+	-	-	-	-/+	-/+	+	-	-	-
Cond ms	-	+	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-
Granulosa	-	-	-/+	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	+	-/+
Melanoma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Carcinoma	+	-/+	-	-	-	+	-	-	-/+	-	-	-	-/+

**Algoritmo resultados IHQ con MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 en Carcinoma colorrectal (Rev Esp Patol 2006;39:201-8). Modificado**



- Hematopoyéticos y afines:

- Antígeno leucocitario común (ALC: CD45RB/CD45): células originadas en la médula ósea, incluyendo linfocitos y monocitos. Son negativos en 50% casos: linfoma ALK y linfoblásticos. Suelen ser negativos: cel Hodgkin y plasmáticas.
- ALK: varias localizaciones celulares.
- CD1a: cel Langerhans, timocitos corticales (inmaduros) y, a veces, Rosai-Dorfman.
- CD3: policlonal. Si monoclonal usad épsilon (7S1).
- CD5: timocitos, linfos T, Carcinomas tímicos, LLC y linfoma del manto.
- CD10: LLA, centro germinal, linfoma folicular, linf Burkitt.
- CD15 (LeuM1): granulocitos, algunos macrófagos y cel Reed-Sternberg (Golgi y membrana).
- CD20: linfocitos B.
- CD23: LLC, cel dendríticas.
- CD30: marcador de activación linfocitario, linfoma ALK, Carcinoma embrionario y cel Reed-Sternberg (Golgi y membrana).
- CD38: linfos activados y plasmáticas.
- CD43: linfos T, granulocitos (LMA), monocitos, megacariocitos, mastocitos y un 30% de linfomas B.
- CD45RO (UCHL1): linfos T, monocitos y granulocitos (LMA).
- CD63: plasmáticas (marca retículo endoplásmico).
- CD68 (KP-1): positividad citoplásrica en monocitos, SER, osteoclastos, precursores mieloides y algunos linfos B.
- CD79a: linfocitos B.
- CD99: timocitos corticales y timomas, PNET/Ewing y LLA.
- CD123: precursor dendrítico hematodérmico.
- CD138: plasmáticas.
- Mum 1: plasmáticas.
- Pax-5: diferenciación línea B.
- Bcl-2: linfomas de bajo grado y linfocitos T.
- Bcl-6: origen centro germinal.
- Ciclina D1: linfoma del manto.

- S100 (nuclear y citoplásrico): cel Langerhans, cel interdigitantes, Rosai-Dorfman, leucemia mieloide, melanomas y cel Schwann.
  - TdT: leucemias linfoides agudas.
  - Triptasa: mastocitos.
  - MIB-1 (Ki-67): marcador de proliferación.
  - ZAP70- indicador de peor pronóstico en LLC y, probablemente, en linf manto.
- Controles externos recomendados ([www.ihcworld.com](http://www.ihcworld.com)).

Anticuerpos	Tejidos	Localización
Actina músculo-específica	Colon, bazo	Citoplasma
AE1/AE3	Colon, piel, páncreas	Citoplasma
AFP	Hígado fetal	Citoplasma
ALK	Linfoma anaplásico	Variable nuclear/citopl
Beta amiloide	Cerebro Alzheimer	Citoplasma
Beta Catenina	Ductos, díctulos biliares	Núcleos
BerEP4	Mama, colon	Citoplasma
CD (varios), bcl-2/bcl-6	Amígdala	Membrana
CD15	Hodgkin	Membrana-Golgi
CD30	Hodgkin, páncreas	Membrana/Golgi
CD99	Timo	Membrana
CD117	Piel, cerebro, pulmón, bazo	
CEA (monoclonal)	Colon	Membrana/citoplasma
CK AE1-AE3	Colon, piel, páncreas	Citoplasma
CK7	Mama, pulmón	Citoplasma
CK20	Colon, páncreas	Citoplasma
Caldesmon	Músculo liso	Citoplasma
Calretinina	Mesotelio, timo teste, cerebelo	Núcleo-citoplasma
COX2	Colon, riñón	
Cromogranina A	Páncreas, adrenal, ovario	Granular citoplasma
Desmina	Colon, bazo	Citoplasma
E-Cadherina	Mama	Citoplasma
EGF R	Placenta	Membrana
EMA	Amígdala, riñón	Membrana
Estrogeno R	Mama, útero	Nuclear
Fosfatasa alc placentaria	Placenta	Citoplasma
Hepar 1	Hígado normal	Citoplasma
hCG	Placenta	Citoplasma
HMB-45	Melanoma	Citoplasma
Inmunoglobulinas	Amigdala	Citoplasma
Inhibina	Ovario	Citoplasma
Ki-67 (MIB1)	Piel, timo, amigdala	Nuclear
Lactógeno placentario	Placenta, amígdala	
Melan A	Melanoma	Citoplasma
Mieloperoxidasa	Médula ósea	Citoplasma granular

Anticuerpos	Tejidos	Localización
Pax-5	Hodgkin nodular linf	Núcleo
p53	Ca seroso, Ca mama	Nuclear
p63	Mama	Nuclear
PDGF R	Mama	Membrana
Progesterona R	Mama, útero	Nuclear
Proteína Glial fibrilar	Cerebelo	citoplasma
PSA	Próstata	Citoplasma
Racemasa	Próstata	Citoplasma
S-100	Piel	Núcleo + citoplasma
Sinaptofisina	Cerebro, adrenal	Citoplasma
Tau	Alzheimer	Citoplasma
TdT	Timo	Núcleo
Tiroglobulina	Tiroides	Citoplasma
TTF-1	Tiroides	Nuclear
Triptasa	Médula ósea	Citoplasma
Vimentina	Ca de colon	Citoplasma
WT-1	Riñón	Nuclear

# Petición de estudios inmunohistoquímicos

Nº de la muestra  
Urgente

Dr/Dra. Fecha petición: Fecha entrega:

Observaciones para el técnico:

Valoración técnica (1 a 10)

- TEAP:
- Patólogo:

Problemas técnicos observados:

- 
- Actina musc esp
  - ALK proteína
  - Alfa1-antitrip
  - Alfa-fetoprot
  - Alfa sinucleína
  - Amiloide AA
  - Amiloide beta
  - Anti HH3
  - Bcl-1
  - Bcl-2
  - Bcl-6
  - Bcl-10
  - BerEP 4
  - Caldesmólon
  - Calmodulina
  - CD1a
  - CD3
  - CD4
  - CD5
  - CD7
  - CD8
  - CD10
  - CD15
  - CD20
  - CD23
  - CD30
  - CD31
  - CD34
  - CD43
  - CD45RA (ALC)
  - CD45RO/UCHL
  - CD56
  - CD57
  - CD68
  - CD79a
  - CD99
  - CD117
  - CD123
  - CEA
  - c-erb-2
  - Cromogranina A
  - Citoq AE1-AE3
  - Citoq 5/6
  - Citoqueratina 7
  - Citoqueratina 19
  - Citoqueratina 20
  - Citoq 34 B E12
  - Desmina
  - DO 4 D2-40
  - EBER
  - e-cadherina
  - Enolasa NE
  - Estrógeno recept
  - Factor XIII a
  - Fosfatasa ácida
  - Fosfat alcalina
  - Granzima B
  - HCG-beta
  - Hepatocito 1
  - HMB-45
  - Inhibina alfa
  - Inmunoglob A
  - Inmunoglob D
  - Inmunoglob G
  - Inmunoglob M
  - Kappa
  - Ki-67
  - Lactógeno plac
  - Lambda
  - LMP-1
  - Melan A
  - Mieloperoxidasa
  - Myo-D1
  - MUM-1
  - MLH1-MSH2-MSH6-PMS2
  - Neurofilamentos
  - p16
  - p53
  - p63
  - Pax-5
  - Perforina
  - Progesterona recep
  - Prot glial fibrilar
  - PSA
  - Racemasa alfa
  - S-100
  - Sinaptofisina
  - Surfactante pr A
  - Tau
  - TdT
  - TIA-1
  - Tiroglobulina
  - Triptasa
  - Trombomodulin
  - TTF-1
  - Vimentina
  - ZAP-70

# **ANEXO**

## Anticuerpos

ANTICUERPO NOTAS	CLON	LABORATORIO	REFERENCIA	DILUCIÓN	REC.ANTIGENOS. VISUALIZACION	CONTROL
<b>Anticuerpos</b>						
E M A	E29	DAKO	M 613	1/2500	OLLA	ENVISION
E CADHERINA	AM 390SH	MENARINI	AM 390	PREDILUIDA	OLLA	ENVISION
DESMINA	D33	DAKO	M 760	1/100	OLLA	ENVISION
DENTRITICAS	CNA-42	DAKO	M 7157	1/100	OLLA	ENVISION
D B A 44 congelado	DBA 44	DAKO	M 880	1/50	OLLA	ENVISION
CROMOGRANINA	LK2H10	MENARINI	MU 126-UC	1/100	OLLA	ENVISION
COLAGENA IV	CIV 22	DAKO	M 785	1/50	OLLA	ENVISION
CK 7	Ov-TL12-30	DAKO	M 7018	1/500	OLLA	ENVISION
CITOKERATINA CAM 5.2	MNF116	DAKO	M0821	1/300	OLLA	ENVISION
CALRETTININA	POLI	ZIMED	08-1211	1/10	OLLA	ENVISION
CALDESMON	H-CD	DAKO	M 3557	1/50	OLLA	ENVISION
CALCITONINA congelado	CA-3-F5	DAKO	M 3509	1/250	OLLA	ENVISION
CADERNAS LAMBDA congelado	POLI	DAKO	A 193	1/30000	OLLA	ENVISION
CADERNAS K KAPPDA	POLI	DKO	A 192	1/30000	OLLA	ENVISION
C K 34-12		DAKO	M 0630	1/600	OLLA	ENVISON
Cerb B2	POLI	DAKO	A 0485	1/1500	OLLA	ENVISON
C E A	TF3H8-1	BIOGENEX	MU-187-UC	1/350	OLLA	ENVISON
C D 99		MENARINI	MIC2	PREDILUIDO	OLLA	ENVISON
C D 8	4B11	NOVOCASTRA	NCLCD84B11	1/20	OLLA	ENVISON
C D 79 a	JCB117	DAKO	M 7050	1/200	OLLA	ENVISON
C D 7	CD7-277	NOVOCASTRA	NDLCD7272	1/50	OLLA	ENVISON
C D 68	PG-M1	DAKO	M 0876	1/500	OLLA	ENVISON
C D 68	KP1	DAKO	M 814	1/500	OLLA	ENVISON

CD 57	NK1	NOVOCASTRA	NCL-NK1	1/50	OLLA
CD 5	4C7	NOVOCASTRA	CD5 4C7	1/5	OLLA
CD 43	MT1	BIOGENEX	MU 155 UC	1/150	OLLA
CD 4	IF6	NOVOCASTRA	NCLCD41F6	1/20	OLLA
CD 38 C 1	VS38 c	DAKO	M 7077	1/25	OLLA
CD 34	Qbend/10	NOVOCASTRA	NCL-END	1/500	OLLA
CD 31congelado	JC/70 <sup>a</sup>	DAKO	M 823	1/50	OLLA
CD 3	POLI	DAKO	M 7254	1/200	OLLA
CD 23	1B 12	NOVOCASTRA	NCLCD23 1B1	1/40	OLLA
CD 21 congelado	IF8	DAKO	M 784	1/20	ENZIMA 10'40
CD 20	L 26	DAKO	M 755	1/3500	OLLA
CD 15	MMA	BDICKINSON	347420	1/20	OLLA
CD 138	ML 15	DAKO	M 7228	1/100	OLLA
CD 117	CKIT	DAKO	A 4502	1/150	OLLA
CD 10	56C6	NOVOCASTRA	NCLCD10270	1/15	OLLA
CD 1 congelado	010	M-D	0781 B	1/10	OLLA
B CL 6	PG-B6p	DAKO	M 7211	1/350	OLLA Ph.8
B CL 2	124	DAKO	M 887	M. 300 10 PEPS	ENVISION
ANTIGENO EPITELIAL	VER EP4	DAKO	N 1531	1/25	ENVISION
AMIELOIDE	MC 1	NOVOCASTRA	NCL-AAC	1/400	ENVISION
ACTINA	HHF 35	DAKO	M635	1/200	ENVISION
ACTH	02 A31	DAKO	N 1531	1/15	ENVISON
ALK	ALK1	DAKO	M 7195	1/25	OLLA
ALC	PD7/26	DAKO	M 833	1/1000	OLLA
AFP		DAKO	A 0008	1/1500	OLLA