

Evaluación de Reactividad Inmunohistoquímica con Método del Complejo Avidina–Biotina (ABC)

Evaluation of Immunohistochemical Reactivity with Avidin-Biotin Complex (ABC) Method

Sandoval, C.^{*,**,*} & Vásquez, B.^{****}

SANDOVAL, C. & VÁSQUEZ, B. Evaluación de reactividad inmunohistoquímica con método del complejo avidina–biotina (ABC). *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 3(3):909-918, 2016.

RESUMEN: Inmunohistoquímica es toda técnica que permite detectar *in situ* componentes celulares y extracelulares por medio de anticuerpos específicos, empleando sistemas de detección enzimáticos. Dentro de los métodos inmunohistoquímicos, la técnica del complejo avidina–biotina (ABC) es ampliamente utilizada debido a su alta sensibilidad. El objetivo del presente estudio fue evaluar la reactividad inmunohistoquímica del anticuerpo 4C4.9 para la detección de la proteína S-100, utilizando el método ABC. Para la evaluación de la reactividad inmunohistoquímica se utilizaron 2 biopsias de piel humana con diagnóstico histopatológico de melanoma maligno nodular ulcerado y nevus melanocítico intradérmico, provenientes del Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Se utilizó el Kit VECTASTAIN® como método de detección, la dilución del anticuerpo 4C4.9 fue 1/250 y la temperatura de incubación fue a 4 °C ó 37 °C por 18 horas. Para validar la técnica, se realizó un control positivo y otro negativo para 4C4.9. Los resultados de la tinción inmunohistoquímica por el método del complejo ABC mostraron tinción positiva para la proteína S-100, tanto en melanoma maligno nodular ulcerado, como en nevus melanocítico intradérmico, incubados durante 18 horas a 4 °C ó 37 °C. Sin embargo, la inmunotinción fue más intensa cuando el anticuerpo primario se incubó a 37 °C. Para una correcta interpretación de los resultados, es necesario tener en consideración que la reacción antígeno-anticuerpo se ve influenciada por diversos factores, como la concentración del anticuerpo, el tiempo y la temperatura de incubación. En conclusión, nuestros resultados sugieren incubar las muestras con el primer anticuerpo (4C4.9) en una dilución de 1/250 en agua destilada, incubando durante 18 h a 37 °C. Se recomienda la utilización del anticuerpo 4C4.9 como apoyo al diagnóstico y diagnóstico diferencial.

PALABRAS CLAVE: Melanoma maligno; Nevus melanocítico; anticuerpo 4C4.9; Proteína S-100.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de Inmunohistoquímica: la inmunohistoquímica es toda técnica que permite detectar *in situ* componentes celulares y extracelulares por medio de anticuerpos espe-

cíficos empleando sistemas de detección enzimáticos. Esta técnica se basa en la alta especificidad y afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer moléculas y unirse a ellas, don-

* Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

** Centro de Investigación CIMA, Facultad de Odontología, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

** Becario CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2015-21150991.

**** Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

de la conjugación de éstos anticuerpos a enzimas o sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido estudiado.

Este método se basa en reacciones inmunoenzimáticas utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar antígenos presentes en las células de tejidos. Hay muchos métodos de tinción inmunoenzimática que pueden ser usados para localizar antígenos relevantes para el diagnóstico en la que se utilizan diferentes enzimas, como la peroxidasa o la fosfatasa. En este sentido, Nakane & Pierce (1966) junto a Avrameas & Uriel (1966), sientan las bases de la inmunohistoquímica al marcar anticuerpos con peroxidasa de rábano picante.

Método de detección: varias son las técnicas inmunohistoquímicas desarrolladas con el fin de aumentar la calidad del marcaje, al mismo tiempo que se intenta disminuir las tinciones inespecíficas y el fondo. Dentro de los métodos inmunohistoquímicos, la técnica del complejo avidina-biotina (ABC) es ampliamente utilizada debido a su alta sensibilidad. Esta técnica inmunoenzimática se basa en la gran afinidad que tiene la avidina, una glicoproteína básica, por la vitamina biotina, que es más de cien mil veces superior que la de un anticuerpo por su antígeno (Doherty *et al.*, 1989). Esta propiedad permite mejorar la intensidad del marcaje al amplificar la reacción. Después de la incubación del tejido con el anticuerpo primario, se aplica un anticuerpo secundario ligado a una molécula de biotina. Posteriormente, se incuba con un complejo constituido por moléculas de avidina y biotina conjugadas con peroxidasa, en el cual debe predominar la avidina (4:1) para que pueda unirse a las moléculas de biotina que se encuentran ligadas al anticuerpo secundario. Así, se obtienen varias moléculas de enzima por locus antigénico, ofreciendo, por lo tanto, una excelente calidad de marcaje.

Anticuerpo primario 4C4.9: el anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína citoplasmática S-100 (4C4.9), es utilizado como anticuerpo primario en la técnica de inmunohistoquímica para la búsqueda, identificación y diferenciación de nevus y melanomas en biopsias de piel humana. La interpretación

clínica de cualquier tinción o su ausencia debe ser complementada por estudios morfológicos y controles adecuados (Cell Marque, 2016).

Los anticuerpos monoclonales son glucoproteínas producidas por las células B, con la capacidad de reconocer moléculas específicas, incluso células cancerosas. Estos anticuerpos son herramientas esenciales en el ámbito clínico y biotecnológico, y han probado ser útiles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, inmunológicas y neoplásicas, así como también en el estudio de las interacciones patógeno-hospedero y la marcación, detección y cuantificación de diversas moléculas (Machado *et al.*, 2006).

Según el antígeno a identificar, y por lo tanto, el tipo de anticuerpo utilizado, la inmunohistoquímica puede ser de utilidad diagnóstica en identificación, diferenciación y pronóstico de neoplasias. Así, la proteína S-100 ha sido encontrada en melanocitos normales, histiocitos, condrocitos, lipocitos, músculo esquelético y cardíaco, schwannocitos, células epiteliales y mioepiteliales de mama, glándulas sudoríparas y salivales, así como en células gliales (Nakajima *et al.*, 1982; Kahn *et al.*, 1983; Morrison & Prayson, 2000). Asimismo, neoplasias derivadas de estas células pueden expresar también proteína S-100, aunque no uniformemente (Nakajima *et al.*; Kahn *et al.*; Monda & Wick, 1985; Yaziji & Gown, 2003). Un gran número de tumores bien diferenciados de la glándula salival, tejido adiposo y cartilaginoso (Monda *et al.*) y, tumores derivados de schwannocitos expresan proteína S-100. Casi todos los melanomas malignos y casos de histiocitosis X son positivos para la proteína S-100 (Yaziji & Gown; Patel *et al.*, 2002). A pesar de que la proteína S-100 es una sustancia ubicua, su demostración es de gran valor en la identificación de varias neoplasias, en particular melanomas (Nakajima *et al.*; Kahn *et al.*; Monda & Wick; Yaziji & Gown; Patel *et al.*; Morrison & Prayson).

Kit VECTASTAIN®: este ha reportado ser 40 veces más sensible que otros métodos de inmunoperoxidasa, produciendo mayor intensidad de tinción con altas diluciones del anticuerpo primario. Asimismo, se ha notificado que los antígenos que no se detectan con otros proce-

dimientos se pueden visualizar fácilmente utilizando el método ABC (Vector Laboratories, 2016).

El kit VECTASTAIN® es un método libre de fondo, a diferencia de otros productos a base de avidina o estreptavidina que con frecuencia poseen uniones inespecíficas. De igual manera, en la mayoría de los casos, el procedimiento completo de tinción desde la adición del anticuerpo primario hasta el montaje del corte al portaobjetos, puede llevarse a cabo en menos de tres horas.

Otras de las características del kit VECTASTAIN®, es ser un método económico, permitiendo teñir un gran número de cortes por presentación; ser un sistema estable, pudiendo ser empleado por años cuando se almacena refrigerado; versátil, porque puede ser utilizado en sistemas manuales o automatizados produciendo la misma calidad de tinción; y ser un sistema reconocido, siendo el método de tinción más utilizado para la tinción inmunohistoquímica (Vector Laboratories).

Melanoma maligno: es un tumor maligno derivado de melanocitos y las células névicas. Se puede presentar en toda región anatómica que presente melanocitos, como piel, mucosa, cavidad bucal, ojo, ano o genitales. Puede originarse de nevus previos en el 50 % de los casos, o en forma espontánea (Casariego & Baudo, 2004). Su incidencia es creciente en las últimas décadas, representa desde el 1,5 % al 7 % de las neoplasias cutáneas, causa entre el 60 % al 70 % de las muertes por cáncer de piel y el 1 % al 2 % de las muertes por cáncer (Molina, 2000).

Nevus melanocítico: El nevus melanocítico es una proliferación anormal pero benigna de los melanocitos de la piel que tienden a agruparse en nidos o tecas, siendo importante su posible relación con el melanoma como simulador, marcador de riesgo o posible precursor. Si bien pueden estar presentes en un 1 % de los neonatos, suelen iniciar su aparición a partir de los 6 a 12 meses e ir aumentando en número y tamaño hasta alrededor de los 25 años. De entre todos, los nevus displásicos y los congénitos, especialmente los gigantes, son los de mayor potencial maligno, por lo que, es

esencial diferenciar en la anamnesis los nevus melanocíticos congénitos, de los nevus melanocíticos adquiridos (Weedon, 2002).

Proteína S-100: En el campo de los marcadores tumorales, se han estudiado varias moléculas y entre ellas, una de las que más interés ha suscitado es la proteína S-100. Esta proteína ácida, termolábil, ligadora de calcio, con un peso molecular de 21 kd, fue aislada en cerebro de bovino y ha sido objeto de múltiples investigaciones (Moore, 1965).

Actualmente la proteína S-100 se utiliza como marcador inmunohistoquímico en el diagnóstico diferencial del melanoma primario y de las metástasis de melanoma. Desde que Gaynor *et al.* (1980),[≠] lo describieron como marcador tumoral sérico en pacientes con melanoma, se han realizado numerosos trabajos para estudiar su utilidad en esta patología (Hauschild, 1997; Tofani *et al.*, 1997). Bajo este contexto, la utilización de esta proteína como marcador, permite la búsqueda e identificación de nevus melanocíticos y melanomas malignos en biopsias de piel humana.

Así, el objetivo del presente estudio fue evaluar la reactividad inmunohistoquímica del anticuerpo 4C4.9 para la detección de la proteína S-100, utilizando el método ABC en biopsias de piel humana.

MATERIAL Y MÉTODO

Reactivos

Hidróxido de sodio 10 N. Para preparar 100 ml de hidróxido de sodio 10 N, se disolvieron 40 g de hidróxido de sodio (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en 100 ml de agua destilada.

Tampón fosfato 0,4 M pH 7,4. Para preparar 100 ml de Tampón fosfato 0,4 M pH 7,4, se disolvieron 5,6 g de fosfato dipotásico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 1 g de fosfato monosódico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en 40 ml de agua destilada, aforando a 100 ml con agua destilada en un matraz aforado.

Paraformaldehído 4 %. Para preparar 100 ml de paraformaldehído 4 %, se calentaron 60 a 70 ml de agua destilada a 60 °C en un matraz utilizando un agitador magnético. Luego, se añadieron 4 g de paraformaldehído (EMPROVE®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), dos o tres gotas de hidróxido de sodio 10 N, y se esperó hasta que la solución se volvió transparente. Posteriormente, se filtró la solución y se añadieron 25 ml de tampón fosfato 0,4 M pH 7,4, se aforó con agua destilada hasta 100 ml y se enfrió a temperatura de 4 a 10 °C antes de usar.

Solución PBS 1x (buffer fosfato salino). Se prepararon 500 ml de PBS en una dilución 1/10. Para éste fin, se diluyeron 50 ml de PBS 10x en 450 ml de agua destilada y se mezcló uniformemente.

Solución de gelatina/dicromato de potasio. Para preparar 100 ml de solución de gelatina/dicromato de potasio, se disolvieron lentamente 0,5 g de gelatina (EMPROVE®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en agua destilada a 50 °C. Una vez enfriada la solución a temperatura ambiente, se agregaron 0,05 g de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), y se filtró en papel filtro de 45 µm.

Batería de alcoholes. La concentración de alcohol se expresa en porcentaje de volumen. Por ejemplo, el alcohol de 70 °C contiene 70 ml de alcohol absoluto (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) por cada 100 ml de solución alcohólica de 70°. Por lo tanto, para preparar 100 ml de alcohol al 70 %, se incorporaron 70 ml de alcohol absoluto en un matraz, y se aforó a 100 ml con agua destilada. El mismo principio se utilizó para preparar la batería de alcoholes (100%, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 % y 50 %).

Hidrógeno peróxido 0,3 %. Para preparar 1 ml de hidrógeno peróxido al 0,3 % a partir de una solución pura de hidrógeno peróxido 30 % (Perhydrol®, EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se diluyeron 10 µL de hidrógeno peróxido 30 % en 1 ml de agua destilada.

Dilución del anticuerpo primario 4C4.9. Se prepararon 500 µL de dilución del anticuerpo primario en proporción de 1/250, según lo es-

tandarizado en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal de Universidad de La Frontera (LINBA-UFRO). Para éste fin, se diluyeron 2 mL del anticuerpo primario 4C4.9 (Cell Marque®, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.) en 500 mL de agua destilada.

Kit VECTASTAIN® (Vector Laboratories®, Burlingame, CA, EE.UU.)

Solución de bloqueo de sitios inespecíficos (amarillo). Suero normal de caballo (2,5 %). Listo para usar.

Anticuerpo secundario biotinilado (celes-te). Anticuerpo biotinilado pan-específico (anti-IgG de ratón/conejo/cabra). Listo para usar.

Reactivo de detección (gris). Complejo estreptavidina – peroxidasa. Listo para usar.

Solución DAB – peróxido de hidrógeno. Para preparar 1 ml de solución DAB – peróxido de hidrógeno, se diluyeron 50 µL de diaminobencidina (DAB) 20x y 50 µL de peróxido de hidrógeno en 900 µL de PBS 1x.

Control positivo. Como control positivo para la inmunohistoquímica, se utilizó un corte histológico con expresión positiva para la proteína citoplasmática S-100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.), utilizando el anticuerpo para 4C4.9. (Figura 1.A).

Control negativo. Para el control negativo, se omitió el anticuerpo primario 4C4.9 (Figura 1.B).

Muestras. Para la evaluación de la reactividad inmunohistoquímica se utilizaron 2 biopsias de piel con diagnóstico histopatológico, provenientes del Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal de Universidad de La Frontera (LINBA-UFRO). La primera biopsia presentaba un diagnóstico de melanoma maligno nodular ulcerado y la segunda un diagnóstico de nevus melanocítico intradérmico. Para el análisis por microscopía de luz, las muestras fueron fijadas a 4 °C durante 24 horas en solución de paraformaldehído al 4 % en PBS y procesadas siguiendo el protocolo convencional para su inclusión en Paraplast Plus (Paraplast® Embedding Media, McCormick Scientific, St. Louis, MO, EE.UU.).

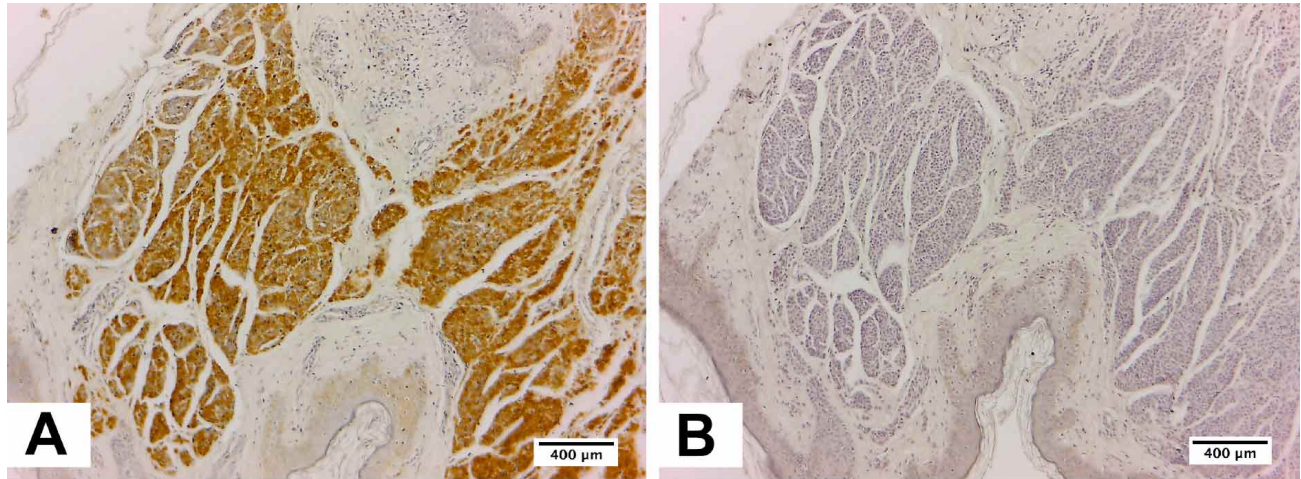


Fig. 1. Controles para detección inmunohistoquímica con anticuerpo 4C4.9, utilizando el Kit VECTASTAIN® como método de detección. A. Control positivo para expresión de proteína S-100. B. Control negativo.

Gelatinización de portaobjetos. Para mejorar la adherencia de los cortes histológicos, los portaobjetos fueron sumergidos en solución de gelatina/dicromato de potasio por un período de 1 a 2 horas. Luego, fueron retirados y secados en estufa a 37 °C durante toda la noche.

Preparación de los cortes. De cada biopsia, se realizaron 2 cortes histológicos de 5 de µm de espesor en un micrótopo. Posteriormente, los cortes fueron estirados en agua con temperatura de 45 a 50 °C en un baño de flotación y montados en portaobjetos gelatinizados. Después, se dejaron secar en estufa a 40 °C por 12 horas.

Luego, los cortes fueron desparafinados en Xilol I y II, durante 10 min cada uno e hidratados en una batería de alcoholes decrecientes (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 % y 50 %), durante 10 min cada uno.

Finalmente, los cortes fueron lavados 3 veces en PBS por 3 min en cada lavado. Después del último lavado, los cortes se delimitaron en el portaobjetos con un lápiz hidrofóbico (PAP PEN) por el contorno del tejido fijado, alrededor de 2 mm del borde del portaobjeto.

Detección inmunohistoquímica

Inhibición de peroxidasa endógena. Para evitar inmunoreactividad de fondo e incluso resultados falsamente positivos, se bloqueó la actividad peroxidasa presente en el tejido (Panizo

et al., 1998) con 250 µL de hidrógeno peróxido al 0,3 % durante 20 min. Posteriormente, los cortes fueron lavados 2 veces en PBS durante 5 min cada lavado.

Bloqueo de sitios inespecíficos. Para bloquear posibles sitios de unión inespecífica al anticuerpo, las muestras fueron incubadas con una solución de bloqueo que contenía una alta concentración de proteína. En este sentido, se depositaron 200 µL de solución de bloqueo sobre los portaobjetos y se incubaron por 20 min. Posteriormente, se retiró el exceso de solución y se lavó en PBS por 2 min.

Incubación con el primer anticuerpo. Para incubar las muestras con el primer anticuerpo, se depositaron 100 µL de la dilución del anticuerpo primario 4C4.9 sobre cada uno de los cortes y fueron incubados en cámara húmeda durante 18 horas. Un corte fue incubado a 4 °C y el otro a 37 °C. Posteriormente, fueron lavados 2 veces en PBS durante 5 min.

Incubación con el segundo anticuerpo. Para incubar las muestras con el segundo anticuerpo, se depositó una gota del segundo anticuerpo biotinilado a cada corte histológico y se incubaron durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron lavados 2 veces en PBS durante 5 min.

Incubación con reactivo de detección. Para aplicar el reactivo de detección, se depositó una gota del complejo estreptavidina - peroxidasa

a cada corte histológico, y se incubaron durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron lavados 4 veces en PBS durante 5 min cada lavado.

Revelado. Para revelar la reacción producida por el complejo avidina – biotina – peroxidasa, se depositaron 250 μ L de solución DAB – peróxido de hidrógeno sobre los cortes histológicos durante 10 min. Posteriormente, la reacción fue detenida lavando con agua destilada por un minuto.

Tinción de contraste. Como tinción de contraste se utilizó Hematoxilina de Harris, aplicando sobre el corte histológico 200 μ L de este colorante durante 2 min. Después, las muestras fueron lavadas en agua corriente por un minuto.

Deshidratación y diafanización. Para deshidratar las muestras, los cortes fueron sumergidos en una batería de alcoholes de concentración creciente (50 %, 80 % y 96 %) por un minuto en cada uno. Luego, fueron sumergidos en alcohol 100 % I por 3 min y en alcohol 100 % II por 5 min. Posteriormente, se dejaron secar al aire por 1 o 2 min. Finalmente, para diafanizar las muestras, los cortes fueron sumergidos en Xilol I y II por 10 min cada vez.

Montaje y visualización. Para el montaje, se utilizó Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se dejaron secar en estufa a 37 °C durante toda la noche. Las láminas fueron visualizadas bajo un microscopio de luz marca Leica® DM 2000 LED y fotografiadas con cámara Leica® MC170HD. Las imágenes fueron capturadas en un computador DELL® Inspiron 14 utilizando el Software Leica® LAS EZ.

RESULTADOS

La inmunohistoquímica por el método del complejo ABC para determinar presencia de la proteína S-100 mostró tinción citoplasmática positiva para melanoma maligno nodular ulcerado. El análisis histopatológico mostró brotes sólidos de tumor separados por finas bandas de tejido conectivo (Fig. 2A-C). La inmunohistoquímica también mostró tinción citoplasmática positiva para nevus melanocítico intradérmico. Se observó dermis e hipodermis con infiltrado difuso de células névicas formando agrupaciones en ciertas áreas (Fig. 3.A-C). Para ambas biopsias, la intensidad de la reacción fue mayor cuando la incubación se realizó a 37°C (Fig. 2D-F y 3D-F).

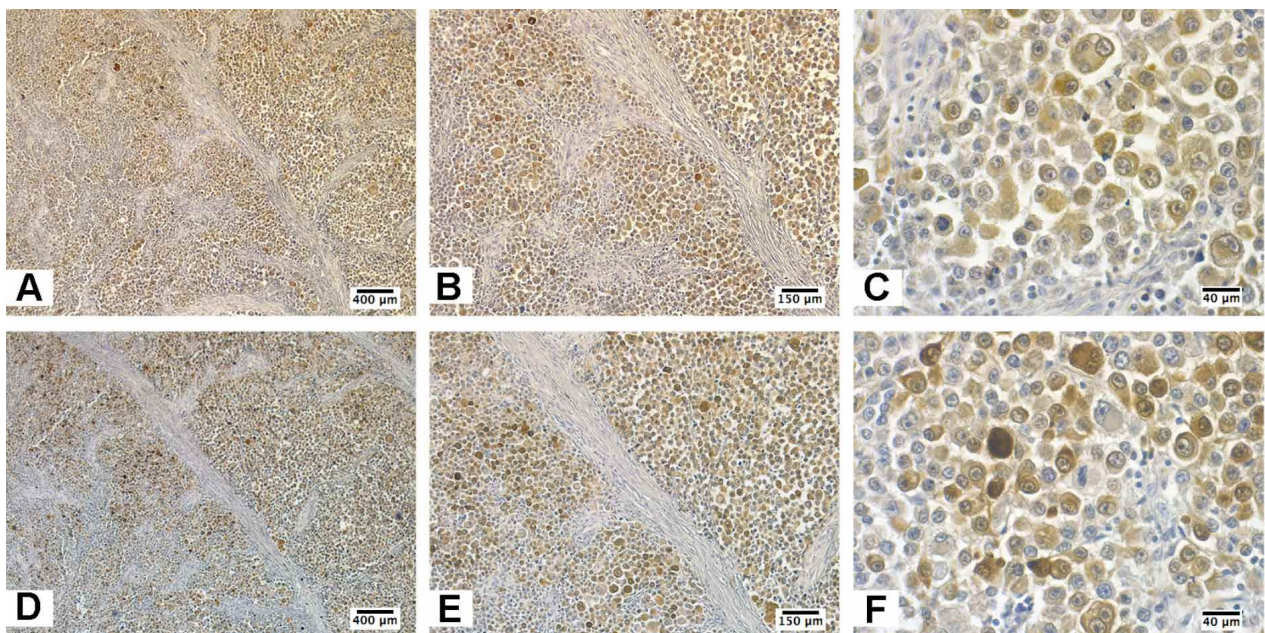


Fig. 2. Cortes histológicos de biopsia de piel humana con diagnóstico de melanoma maligno nodular ulcerado, utilizando el Kit VECTASTAIN® como método de detección. A, B y C. incubados con anticuerpo primario 4C4.9 a una dilución de 1/250 durante 18 horas a 4 °C. D, E y F. incubados con anticuerpo primario 4C4.9 a una dilución de 1/250 durante 18 horas a 37 °C.

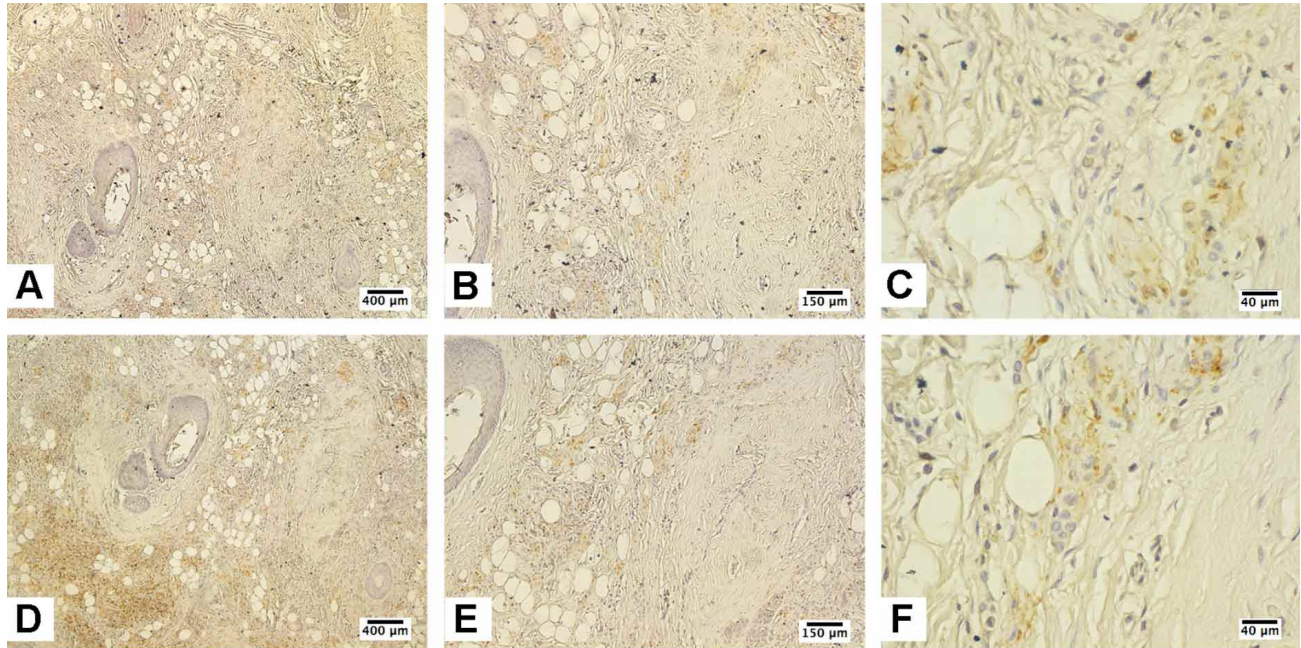


Fig. 3. Cortes histológicos de biopsia de piel humana con diagnóstico de nevus melanocítico intradérmico, utilizando el Kit VECTASTAIN® como método de detección. A, B y C. incubados con anticuerpo primario 4C4.9 a una dilución de 1/250 durante 18 horas a 4 °C. D, E y F. incubados con anticuerpo primario 4C4.9 a una dilución de 1/250 durante 18 horas a 37 °C.

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de tumores malignos se pueden distinguir dos fases de crecimiento, por un lado el crecimiento radial, que se desenvuelve durante una etapa temprana del desarrollo de la enfermedad y, por otro, la fase de crecimiento vertical, que se desarrolla luego de un período variable que oscila generalmente entre uno a dos años. En la fase de crecimiento radial las células neoplásicas crecen confinadas a la epidermis o a la dermis superficial, por lo que el diagnóstico precoz y el tratamiento correcto, generalmente cirugía, posibilitan la curación de la misma. Por el contrario, en la fase de crecimiento vertical el patrón de proliferación de las células en dermis se modifica, aparecen nuevos clones celulares que proliferan disponiéndose en nódulos esferoidales que se expanden más rápido que el resto del tumor, implicando generalmente un mal pronóstico, dado que la infiltración de las capas inferiores de la piel posibilita la diseminación de las células neoplásicas a través de los vasos linfáticos a los linfonódulos regionales o a través de los vasos sanguíneos a cualquier órgano (Cigüenza *et al.*, 2012).

El melanoma nodular ulcerado es un melanoma maligno sumamente agresivo, que solamente presenta etapa de crecimiento vertical, sin embargo, los nevus melanocíticos son una de las lesiones pigmentadas más frecuentes de la piel y corresponden a los lunares comunes. Clínicamente los melanomas malignos son nódulos circunscritos y sobreelevados que histológicamente crecen en forma expansiva en la dermis, mientras que, los nevus pueden ser planos, elevados, papilomatosos, verrucosos, papulares y pedunculados (González, 2016). Estos últimos generalmente aparecen en la infancia y adolescencia, y su número se estabiliza hacia la madurez (Luelmo, 2001).

Un diagnóstico diferencial adecuado es fundamental para establecer un tratamiento apropiado, conocer el pronóstico y progresión de la enfermedad, entre otros aspectos. En algunos casos, el diagnóstico diferencial entre los melanomas malignos in situ y lesiones como los nevus melanocíticos, pueden ser absolutamente indistinguibles en su etapa inicial. Estas difi-

cultades en el diagnóstico también se pueden observar con otras lesiones, como las no melanocíticas de tipo epidérmicas y vasculares. El diagnóstico diferencial de los nevus melanocíticos es relevante porque su presencia es considerado un factor de riesgo para desarrollar melanoma. Aproximadamente en un 25 % de los casos diagnosticados con melanoma, ocurre en relación a una lesión pre-existente de nevus. El riesgo es variable según tipo, tamaño, número y localización (Markovic *et al.*, 2007).

Bajo este contexto, el diagnóstico de los tumores malignos pobremente diferenciados se facilita considerablemente con la aplicación de anticuerpos monoclonales para alcanzar el diagnóstico definitivo y establecer un pronóstico. Aunque ninguno anticuerpos ha demostrado especificidad absoluta para un determinado tipo de tumor, en la práctica clínica, existen paneles de marcadores inmunohistoquímicos que obvian este problema.

Los marcadores inmunohistoquímicos más ampliamente utilizados en la clínica diaria para apoyar el diagnóstico diferencial histopatológico de melanoma son la proteína S-100, HMB-45 (gp-100) y Melan-A (MART-1), MiTF-1, Sox-10 y tirosinasa. (Fuertes *et al.*, 2013). Por su origen, los melanocitos expresan la proteína S-100, que es el marcador más sensible, aunque menos específico (Blessing *et al.*, 1998; Park & Min, 2003; de Wit *et al.*, 2004). Estudios han demostrado que existe 100 % de inmunopositividad en melanomas, lesiones pigmentadas benignas, melanoma con signos de recesión y dermatosis solar (Barrionuevo *et al.*, 1999). Nuestros resultados confirman lo anteriormente planteado, ya que presentaron una reacción positiva para la expresión citoplasmática de la proteína S-100, tanto en melanoma maligno nodular ulcerado como en nevus melanocítico intradérmico, por lo cual, el antígeno S-100 sólo se debería utilizar como parte de un conjunto de otros marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico diferencial.

Cuando se utiliza la inmunohistoquímica para realizar el diagnóstico diferencial, es relevante tener ciertas consideraciones en cuanto a la estandarización de los protocolos de los distintos marcadores utilizados, ya que facto-

res como concentración de los anticuerpos utilizados, tiempos y temperatura de incubación, entre otros, pueden influir en la reacción antígeno-anticuerpo y, por tanto, en la interpretación de los resultados.

Según Martín-Lacave & García Caballero (2014) la dilución óptima de un anticuerpo será aquella que proporcione la máxima intensidad de tinción específica y la mínima tinción de fondo. En este sentido, LINBA-UFRO evaluó previamente la dilución recomendada por el fabricante, encontrando que la dilución 1/250 logra mejores resultados para la inmunotinción de melanomas malignos y nevus melanocíticos, que para el anticuerpo 4C4.9 fue 1/250. Asimismo, Martín-Lacave & García Caballero sostienen que conforme aumenta el tiempo y temperatura de incubación, mayor es la formación del complejo antígeno-anticuerpo. En nuestros resultados, si bien se observó una reacción inmunohistoquímica positiva para ambas biopsias, la reacción de las muestras incubadas a 37 °C durante 18 h, mostró inmunopositividad más intensa y definida que las incubadas a 4°C durante 18 h.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren incubar las muestras con el primer anticuerpo (4C4.9) en una dilución de 1/250 en agua destilada, incubando durante 18 h a 37 °C. Se recomienda la utilización del anticuerpo citoplasmático 4C4.9 como apoyo al diagnóstico y diagnóstico diferencial.

SANDOVAL, C. & VÁSQUEZ, B. Evaluation of immunohistochemical reactivity with avidin-biotin complex (ABC) method. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 3(3):903-908, 2016.

SUMMARY: Immunohistochemistry is any technique that can detect cellular and extracellular components *in situ* by means of specific antibodies, using enzymatic detection systems. Among immunohistochemical methods, the technique of avidin - biotin complex (ABC) is widely used because of its high sensitivity. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical reactivity of the 4C4.9 antibody for detection of S-100 protein using

the ABC method. For the evaluation of immunohistochemical reactivity 2 biopsies of human skin were used with histopathological diagnosis of ulcerated malignant melanoma and melanocytic intradermal nevi from the Research Laboratory on Animal Biotechnology of the Universidad de La Frontera, Chile. The Kit VECTASTAIN® was used as detection method, the dilution the 4C4.9 antibody was 1/250 and incubation temperature was at 4 °C or 37 °C for 18 hours. To validate the technique, a positive control and a negative for 4C4.9 was performed. The results of immunohistochemical staining by the method of ABC complex showed positive staining for protein S-100 both in ulcerated malignant melanoma and melanocytic intradermal nevi, incubated for 18 hours at 4 °C or 37 °C. However, immunostaining was more intense when the primary antibody was incubated at 37° C. For a correct interpretation of the results, it is necessary to take into consideration that the antigen-antibody reaction is influenced by various factors such as the concentration of antibody, time and temperature of incubation. In conclusion, our results suggest incubating the samples with the first antibody (4C4.9) at 1/250 dilution in distilled water, incubating for 18 h at 37 °C. However, immunostaining was more intense when the primary antibody was incubated at 37° C. For a correct interpretation of the results, it is necessary to take into consideration that antigen-antibody reaction is influenced by various factors such as the concentration of antibody, time and temperature of incubation. In conclusion, our results suggest incubating the samples with the first antibody (4C4.9) at 1/250 dilution in distilled water, incubating for 18 h at 37 °C. The use of the antibody 4C4.9 is recommended to support the diagnosis and differential diagnosis.

KEY WORDS: Malignant melanoma; Melanocytic nevi; 4C4.9 antibody; S-100 protein.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avrameas, S. & Uriel, J. Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C R Hebd. Séans Acad. Sci. Paris*, 262:2543-5, 1966.
- Barrionuevo, C.; Seminar, V.; Maita, R.; Rosas, R.; Jara, D.; Victorio, J. & Escalante, I. Inmunohistoquímica en lesiones cutáneas melanocíticas: Utilidad de los marcadores antígeno S100, HMB-45, Cromogranina A y Proteína p53. *Anal. Fac. Med.*, 60(4):257-264, 1999.
- Blessing, K.; Sanders, D. S. & Grant, J. J. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology*, 32(2):139-46, 1998.
- Casariego, Z. J. & Baudo, J. E. Trabajo de revisión: melanoma. *Av. Periodon. Implantol.*, 16(3):157-77, 2004.
- Cell Marque. Cell Marque Portfolio: S-100 (4C4.9) Mouse Monoclonal. Sigma-Aldrich Co., 2016. Disponible en: http://www.cellmarque.com/antibodies/CM/138/S-100_4C4-9
- Cigüenza, M.; Caba, M.; Castaño, D. M.; Delgado, Y.; Ocón, E. M. & Gómez, N. Metástasis musculoesqueléticas en los pacientes con melanoma. En: 31 Congreso Nacional de la SERAM. Sociedad Española de Radiología Médica, S-0732, 2012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1594/seram2012/S-0732>
- de Wit, N. J.; van Muijen, G. N. & Ruiters, D. J. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathology*, 44(6):517-41, 2004.
- Doherty, M. J; Russo, G. G.; Jolly, H. W. & Stewart, K. R. Immunoenzyme techniques in dermatopathology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 20(5 Pt 1):827-37, 1989.
- Doherty, M. J; Russo, G. G.; Jolly, H. W. & Stewart, K. R. Immunoenzyme techniques in dermatopathology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 20(5 Pt 1):827-37, 1989.
- Fuertes, L.; Santonja, C.; Kutzner, H. & Requena, L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part II). *Actas Dermosifiliogr.*, 104(3):181-203, 2013.
- Gaynor, R.; Irie, R.; Morton, D. & Hershan, H. R. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature*, 286(5771):400-1, 1980.
- González, S. Neoplasias de la Piel. En: Chuaqui, R.; Duarte, I.; González, S.; Etchart, M. & Rosenberg, H. Lecciones de Anatomía Patológica. Santiago de Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile, 2016. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/publ/anatomiaopatologica/10Dermatopatologia/10neoplasias.html>
- Hauschild, A. The use of serological tumor markers for malignant melanoma. *Onkologie*, 20(6):462-5, 1997.

- Kahn, H. J.; Marks, A.; Thom, H. & Baumal, R. Role of antibody to S100 protein in diagnostic pathology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 79(3):341-7, 1983.
- Luelmo, J. Nevus melanocítico en la infancia. *An. Esp. Pediatr.*, 54(5):477-83, 2001.
- Machado, N. P.; Téllez, G. A. & Castaño, J. C. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio.*, 10(3):186-97, 2006.
- Markovic, S. N.; Erickson, L. A.; Rao, R. D.; Weenig, R. H.; Pockaj, B. A.; Bardia, A.; Vachon, C. M.; Schild, S. E.; McWilliams, R. R.; Hand, J. L.; Laman, S. D.; Kottschade, L. A.; Maples, W. J.; Pittelkow, M. R.; Pulido, J. S.; Cameron, J. D.; Creagan, E. T.; Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st Century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention and diagnosis. *Mayo Clinic Proc.*, 82(3):364-80, 2007.
- Martín-Lacave, I. & García Caballero, T. *Atlas de Inmunohistoquímica*. Díaz de Santos, Madrid, 2014.
- Molina, F. *Melanoma Maligno*. En: Manual de Oncología Clínica y Molecular. Rosell, R.; Abad, A.; Monzó, M. & Bardanas, A. (ed.) Arán Ediciones, 2000.
- Monda, L. & Wick, M. R. S-100 protein immunostaining in the differential diagnosis of chondroblastoma. *Hum. Pathol.*, 16(3):287-93, 1985.
- Moore, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19(6):739-44, 1965.
- Morrison, C. D. & Prayson, R. A. Immunohistochemistry in the diagnosis of neoplasms of the central nervous system. *Semin. Diagn. Pathol.*, 17(3):204-15, 2000.
- Nakajima, T.; Watanabe, S.; Sato, Y.; Kameya, T.; Hirota, T. & Shimosato, Y. An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues. *Am. J. Surg. Pathol.*, 6(8):715-27, 1982.
- Nakane, P. K. & Pierce, G. B. Jr. Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 14(12):929-31, 1966.
- Panizo, A.; Idoate, M. & Sola, I. Glosario de Inmunohistoquímica. *Rev. Esp. Patol.*, 31(2):171-2, 1998.
- Park, H. R. & Min, S. K. Expression of S100A2 and S100B proteins in epithelial tumors of the skin. *J. Cutan. Pathol.*, 30(6):373-8, 2003.
- Patel, P.; Levin, K.; Waltz, K. & Helm, K. F. Myxoid melanoma: immunohistochemical studies and a review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 46(2):264-70, 2002.
- Tofani, A.; Cioffi, R. P.; Sciuto, R.; Rea, S.; Festa, A.; Di-Filippo, F.; Cavaliere, R. & Maini, C. L. S100 and NSE as serum markers in melanoma. *Acta Oncol.*, 36(7):761-4, 1997.
- Vector Laboratories. VECTASTAIN Universal Quick HRP Kit (Peroxidase), R.T.U. (Ready-to-Use). Catalog Number: PK-7800. Vector Laboratories Inc., 2016. Disponible en: <https://vectorlabs.com/vectastain-universal-quick-kit-r-t-u-ready-to-use.html>
- Weedon, D. *Skin Pathology*. 2nd ed. London, England: Churchill, Livingstone, 2002.
- Yaziji, H. & Gown, A. M. Immunohistochemical markers of melanocytic tumors. *Int. J. Surg. Pathol.*, 11(1):11-5, 2003.

Dirección para correspondencia:
Cristian Sandoval
Avenida Francisco Salazar 01145
Casilla 54-D
Temuco
Chile.

E-mail: cristian.sandoval@ufrontera.cl

Recibido : 11-05-2016

Aceptado: 23-07-2016