



Técnicas de inmunohistoquímica

EVALUACIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

J. Escalona Zapata

Servicio de Anatomía Patológica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Las siguientes líneas pretenden ser un homenaje a la memoria del Prof. Llombart Rodríguez. Hemos elegido para ello una revisión del valor de la inmunohistoquímica en el diagnóstico de los tumores del sistema nervioso porque, independientemente de su interés intrínseco, el tema tiene una significación histórica relacionada con el Prof. Llombart. Él fue el último de los discípulos vivos de Río-Hortega y por lo tanto su formación se desarrolló dentro de la tradición de las impregnaciones con carbonato de plata.

El éxito de estas técnicas se debió, indudablemente, a la posibilidad de teñir selectivamente el citoplasma de las células de los gliomas. Como el propio Río-Hortega reconociera, la tinción era inespecífica, pero en aquel momento era el único método capaz de demostrar estas complicadas estructuras celulares. Esta misma posibilidad es la que ofrece actualmente la inmunohistoquímica. Las diferencias entre los resultados de ambas técnicas apenas difieren.

Sin embargo, los métodos argénticos han sido duramente criticados por casi todas las escuelas no españolas, en tanto que la inmunohistoquímica ha sido rápidamente aceptada. En nuestra opinión, el motivo reside en la necesidad de que las técnicas argénticas sean realizadas o, al menos, directamente supervisadas por el propio patólogo, en tanto que los métodos inmunohistoquímicos se pueden realizar por los técnicos sin supervisión. No deja de ser sorprendente e incluso lamentable la subordinación del ser humano a la comodidad, incluso en aspectos que debieran ser tan sagrados como la investigación. Parece bastante evidente que la preferente aceptación de uno y otro método no ha sido conceptual ni depende de una mayor calidad de los resultados, sino de que uno es más trabajoso que otro para los patólogos.

Sirva esto de homenaje a quienes no les importó aceptar un trabajo más tedioso en aras de una mayor calidad.

INTRODUCCIÓN

Desde el principio de la medicina científica, la búsqueda de signos patognomónicos capaces de definir por sí solos una enfermedad ha sido uno de los objetivos de los investigadores. Signos de matiz clínico como los de Romberg, Babinsky, etc., son expresión de este deseo, que se continúa hoy día con lo que se ha venido a llamar "Medicina demostrada". Así pues, no es raro que intermitentemente aparezcan trabajos que propongan criterios absolutos con fines diagnósticos. En palabras de Jiménez Díaz, éste es uno de los mayores peligros de la medicina: encontrar una de estas panaceas significaría eliminar el trabajoso estudio diario y la valoración global de cada uno de los pacientes y, eventualmente, el inicio del decaer del pensamiento médico clásico.

En esta línea, la inmunohistoquímica ha sido una de las grandes revoluciones de la anatomía patológica y su inmenso éxito ha tenido como base el supuesto de que los resultados obtenidos eran poco menos que específicos. Sin embargo, la "especificidad" del método presenta numerosas excepciones. La regla general que identificaba la positividad de un determinado antisuero con un diagnóstico concreto tuvo que ser desechada tempranamente. La GFAP, obtenida a partir de placas de esclerosis múltiple, resultó ser positiva en células ependimarias y en algunos oligodendrogliomas y la proteína S-100 era capaz de teñir casi todas las células de origen neural. La llamada enolasa neuroespecífica (ENE) resultó ser una enolasa no exclusivamente neuronal ni mucho menos específica.

Por otra parte, cuando sobrevienen fenómenos necróticos, el contenido de los citoplasmas se libera y es fagocitado o incorporado, dándose lugar a falsas positividades. Por último, el crecimiento infiltrante de tumores agresivos facilita el englobamiento de células preexistentes, generalmente astrocitos, con falsas imágenes de maduración (1) o mezcla con áreas de gliosis reactiva (Fig. 1).

En esta revisión intentaremos dar una perspectiva de lo que podemos esperar de la inmunohistoquímica en el diagnóstico diario de los tumores cerebrales. Queremos recalcar especialmente esta palabra, *diario*, porque, aunque a menudo aparecen comunicaciones de antisueros de extraordinario interés, en la práctica diaria razones de volumen de trabajo y de economía obligan a utilizar un número de anticuerpos reducido (una revisión global de la inmunohistoquímica de los tumores cerebrales puede encontrarse en Figols y Cruz Sánchez, 1996) (2). En esta revisión trataremos a los siguientes anticuerpos: GFAP, S-100, NSE, sinaptofisina, vimentina, EMA, CAM 5.2, factor VIII y CD38, que forman parte de la batería habitual en los servicios de Anatomía Patológica.

ASTROCITOMA HEMISFÉRICO DE BAJA MALIGNIDAD

El espectro inmunohistoquímico de este tipo de tumor es relativamente sencillo, con una alta positividad para la GFAP (Fig. 2) en la práctica totalidad de las células que lo componen (3). La expresión de la proteína S-100 es constante, pero algo menos espectacular, con la particularidad de la positividad citoplásmica y nuclear. La vimentina es discretamente positiva tanto en astrocitos normales como tumorales, y tanto mayor cuanto más alto es el índice de malignidad (4). Ocasionalmente puede haber positividad de EMA o citoqueratinas (5). No hay expresión de NSE o sinaptofisina. Los vasos expresan el factor VIII o CD38, con patrones morfológicos normales.

ASTROCITOMA HEMISFÉRICO MALIGNO

La variante maligna del astrocitoma del hemisferio cerebral reproduce el espectro del grupo de bajo grado, con una intensa expresión de GFAP en las células grandes, tanto más cuanto más maduras son. Diferencialmente, las células pequeñas, de núcleo hiperocrómico y citoplasma apenas visible, son irregularmente positivas o negativas, dado que en ellas reside la posible diferenciación frente a la malignización del tumor.



Figura 1. Malformación vascular arteriovenosa. Entre su componente vascular y hemorrágico figuran tractos gliósicos con células astrocíticas hiperplásicas (original, GFAP $\times 100$).

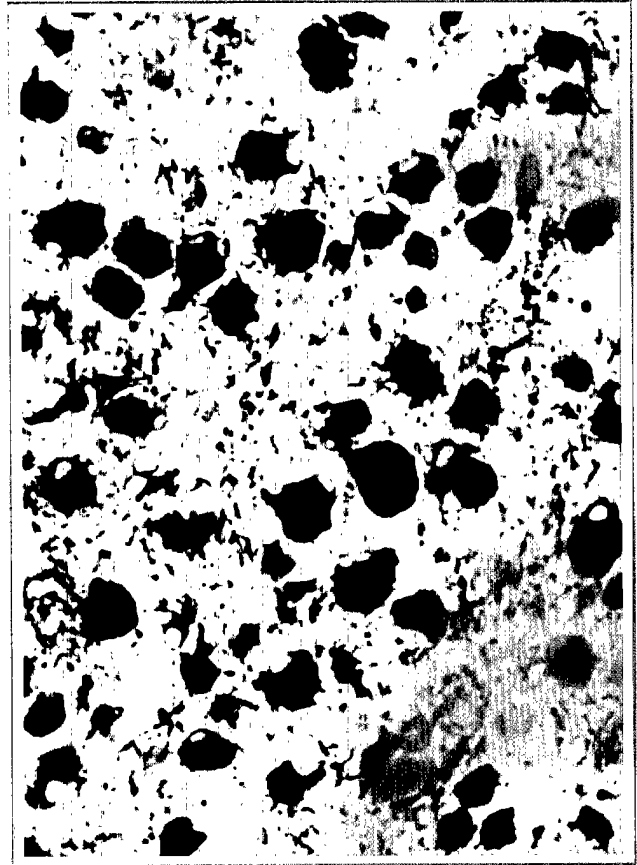


Figura 2. Astrocitoma hemisférico protoplásmico con numerosas células astrocíticas estrelladas, de citoplasma hinchado, que muestran una intensa expresión de GFAP (original, GFAP $\times 200$).

En comparación con lo anterior, la expresión de la proteína S-100 es media en las células grandes y moderada en las pequeñas.

No es raro encontrar astrocitos incluidos que expresan intensamente GFAP.

Los antisueros CD38 y el factor VIII son útiles para la demostración de las alteraciones vasculares iniciales.

GLIOBLASTOMA

Dentro del patrón común a todo el grupo astrocitoma-glioblastoma, las células grandes e intermedias del glioblastoma tienen una expresión intermedia o alta de GFAP, en tanto que las células pequeñas sólo ocasionalmente presentan positividad (6) (Fig. 3). Este patrón se exagera en la variante de células gigantes con positividades muy altas en las células de mayor tamaño, que contrastan con las células isomorfas, que muestran una expresión muy baja. Asociado a ello, la expresión de la proteína S-100 siempre es pobre.

La expresión de vimentina es la habitual en todo el grupo con intensidades tanto mayores cuanto más agresivo es el tumor (4).

Las conocidas alteraciones vasculares de los glioblastomas pueden demostrarse por medio de los sueros frente al factor VIII y CD38. Ocasionalmente hay expresión de actina en las células que componen los glomérulos (2).



Figura 3. Glioblastoma multiforme. En la población celular de estos tumores alternan células negativas, de menor grado de diferenciación, con elementos que expresan GFAP en grado variable (original, GFAP $\times 100$).



Figura 4. Glioblastoma multiforme. En las áreas necróticas se pueden encontrar neutrófilos cuyo citoplasma alberga abundante sustancia GFAP positiva fagocitada (original, GFAP $\times 200$).

Por último, deben señalarse los artefactos, especialmente frecuentes en los glioblastomas, en que se encuentra una gran cantidad de astrocitos incluidos con una intensa expresión de GFAP y una moderada expresión de la proteína S-100 (6). Las amplias necrosis también obligan a valorar cuidadosamente las falsas positividades por fagocitosis de material necrosado (Fig. 4).

ASTROCITOMA DE LA LÍNEA MEDIA Y DEL CEREBELO

Esta neoplasia, la más diferenciada de toda la serie astrocitaria, muestra una intensa positividad de la GFAP e intermedia o alta de la proteína S-100. Particularmente, las fibras de Rosenthal muestran una intensa expresión de GFAP en las áreas periféricas, mientras que la zona central, correspondiente al material osmiófilo de la ultraestructura, queda en negativo (6). La expresión de la proteína S-100 en ellas es más difusa y la vimentina tan inexpressiva como en el resto del grupo.

OLIGODENDROGLIOMA

En la práctica, no existe ningún marcador específico para la oligodendroglía. Las células claras habituales de las imágenes clásicas en panal de abeja carecen de la expresión de GFAP y de proteína S-100. La expresión de Leu-7 en la membrana celular es inespecífica, pero tiene utilidad diagnóstica (7, 8) (Fig. 5).

Sin embargo, este patrón clásico varía en las formas llamadas inusuales (9). Entre ellas el tipo eosinófilo presenta una intensa positividad a la GFAP, y una moderada expresión de la proteína S-100. Las células gigantes del oligodendroglioma polimorfo también muestran positividad de GFAP y, en menor grado, de S-100. Esta positividad se sitúa característicamente en el centro de la célula rodeada por los núcleos periféricos. En este sentido conviene señalar que la expresión de GFAP corresponde al desarrollo de gliofilamentos en el citoplasma de las células (10), fenómeno que se da en un buen número de casos, incluido el patrón clásico. Para algunos autores este fenómeno es la causa de los llamados tumores mixtos, que realmente corresponderían a oligodendrogliomas con metaplasia astrocitaria (11).

El equilibrio entre la expresión de Leu-7 y GFAP tiene cierto interés pronóstico, dado que en las formas agresivas se pierde la primera aumentando la segunda. Otro tanto sucede con la positividad de la membrana para lectinas (*Arachis hypogoea*), que disminuye en los casos más agresivos (12).

En relación con la descripción de los casos con expresión de la proteína básica de la mielina, consideramos que dependen de la existencia de fibras mielínicas preexistentes en el interior del tumor como consecuencia del crecimiento infiltrante marcadamente interfascicular e intrafascicular (1). La MAG (glicoproteína asociada a la mielina) se comporta como la PMB.

Los marcadores de vasos tienen un interés más académico que diagnóstico.



Figura 5. Oligodendroglioma. Las células de los tumores mejor diferenciados expresan el antígeno *Leu-7* en la membrana (original, *Leu-7* ×600).



Figura 6. Ependimoma. Se observa una intensa expresión de vimentina, especialmente localizada en las células que componen los sistemas gliovasculares (original, vimentina ×100).

EPENDIMOMA

Tampoco existe ningún marcador inmunohistoquímico para el ependimoma. Las distintas expresiones de los anticuerpos comúnmente utilizados dependen de cada variante. De este modo, los ependimomas tubulares suelen presentar expresión de EMA, dada su tendencia epitelial (13). Los sistemas gliovasculares propios de las formas celulares tienen una intensa expresión de GFAP y de vimentina (Fig. 6) y algo menor de proteína S-100 (14). Las zonas papilares expresan también GFAP y, ocasionalmente, marcadores epiteliales como el CAM 5.2 y el EMA.

TUMORES NEURONALES ADULTOS

Los raros tumores centrales de origen neuronal expresan neurofilamentos y sinaptofisina (15). La expresión de ENE (16) es menos fiable en los tumores adultos, mientras que, al menos en nuestra experiencia, es más intensa en las formas embrionarias.

La coexpresión de GFAP y/o vimentina en estos tumores (17) depende en unos casos del carácter mixto del proceso y en otros de reacciones gliósicas peritumorales.

TUMORES EMBRIONARIOS (PNET) INCLUIDOS EN EL MEDULOBLASTOMA

La inmunohistoquímica de este tipo de tumores es marcadamente confusa, habiéndose descrito expresiones más o menos intensas de GFAP siempre moderadas, de ENE con cierta intensidad (Fig. 7), de proteína S-100, y con mayor intensidad de sinaptofisina y vimentina. Eventualmente puede encontrarse expresión de citoqueratinas de bajo peso molecular. Todo ello tiene lugar en células aisladas o en pequeños grupos (18).

Esta diversidad de expresiones depende de las posibles líneas de diferenciación, más o menos esbozadas en cada caso, y de la existencia de varias líneas celulares simultáneas, y viene a confirmar la proteiformidad de estas neoplasias, especialmente en el caso del meduloblastoma. Es evidente que muchas de estas expresiones no corresponden a artefactos, pero no debe olvidarse que, dado el carácter intensamente infiltrante y agresivo de estas neoplasias, una parte del tejido nervioso invadido queda englobado en el tumor, y algunas positividads, especialmente en el caso de los astrocitos y neuronas, no dependen de la maduración de las células tumorales sino de la presencia de dichas células englobadas. Otro tanto puede decirse respecto a las maduraciones en sentido neuronal y a las consecuencias del desarrollo de necrosis.

TUMORES DE LOS PLEXOS COROIDEOS

El patrón inmunohistoquímico de los tumores de los plexos coroideos depende de las características simultáneas epitelial y neuroectodérmica que le son propias: por un lado expresan citoqueratinas (19) y por otro GFAP (20) y proteína S-100 (21).

Los raros casos malignos expresan antígeno carcinoembrionario (22), si bien con carácter inespecífico.

NEURINOMA

Probablemente el espectro inmunohistoquímico del neurinoma es uno de los más característicos, con una positividad constante e intensa de la proteína S-100 (23) (Fig. 8). La expresión de vimentina es algo más moderada. Ocasionalmente se ha descrito expresión de ENE e incluso de GFAP siempre en células aisladas.

MENINGIOMA

El espectro inmunohistoquímico del meningioma viene definido por dos marcadores que expresan la bipotencialidad conjuntiva y epitelial de estas neoplasias. El marcador por excelencia del meningioma es la vimentina, cuya expresión siempre es muy elevada y constante (24) (Fig. 9). Junto a ella, no menos del 40% de los casos tienen expresión de EMA y/o citoqueratinas, que son especialmente evidentes en la variante secretora (25, 26). La coexistencia de ambos marcadores es el criterio más firme (2).

La expresión de GFAP es negativa pero tiene cierto interés ya que pueden aparecer astrocitos englobados en las formas malignas. Dado que uno de los criterios de mayor agresividad del meningioma es la invasión del tejido nervioso subyacente, frecuentemente aparecen astrocitos más o menos alterados entre los nidos del meningioma invasor de la corteza cerebral.

METÁSTASIS EPITELIALES

El espectro inmunohistoquímico de las metástasis epiteliales en el cerebro depende del tipo de tumor pero, dado que los sarcomas rara vez metastatizan en el sistema nervioso, en general la batería responde a un patrón epitelial. De este modo, el EMA y el CAM 5.2 son intensamente positivos (Fig. 10) y la vimentina generalmente negativa. En el tejido tumoral no existe expresión de GFAP ni de proteína S-100 pero sí en los astrocitos periféricos que rodean el tejido tumoral metastásico (6).

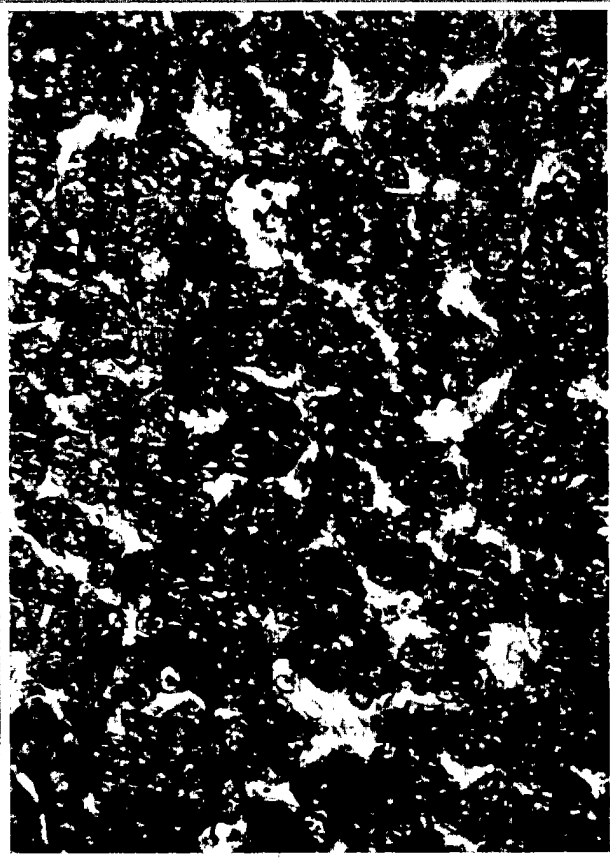


Figura 7. Tumor neuroectodérmico primitivo del hemisferio cerebral. Todas las células expresan intensamente enolasa neuroespecífica (original, ENE $\times 400$).



Figura 8. Intensa expresión de la proteína S-100 en las áreas B de un neurinoma (original, S-100 $\times 200$).



Figura 9. Expresión de vimentina en todas las células de un meningioma (original, vimentina $\times 200$).



Figura 10. Metástasis de un carcinoma epidermoide bien diferenciado. El suero anti-EMA define nítidamente las células escamosas de un globo córneo (original, EMA $\times 200$).

RESULTADOS

En relación con el diagnóstico diferencial inmunohistoquímico de los distintos tipos tumorales, se pueden sentar los siguientes criterios:

- La GFAP es positiva en todos los tumores de origen astrocítico y ocasionalmente en los oligodendrogliomas y los ependimomas. La intensidad de la positividad depende del grado de diferenciación de las células y de su proximidad al tejido conjuntivo, siendo más alta cuanto más maduras son.

Como consecuencia y en sentido estricto, este anticuerpo no distingue entre sí los tres tipos básicos de glioma pero sí permite diferenciarlos del resto de los tumores que aparecen en el sistema nervioso central y que reconocen un origen no neuróglíco.

De nuevo debe insistirse en la necesidad de valorar la presencia de astrocitos incluidos en las variantes infiltrantes y las falsas positividades por fagocitosis de debris en áreas necróticas.

- La proteína S-100 tiene un valor muy escaso dado que casi todas las estructuras dependientes del sistema nervioso son capaces de sintetizarla. De este modo, todos los tumores astrocíticos, el oligodendroglioma, el ependimoma, los tumores de los plexos coroides, el hemangioblastoma y el neurinoma son capaces de expresarla.

Posiblemente la mayor utilidad reside en el caso del neurinoma, teniendo siempre en cuenta la localización habitual en el ángulo pontocerebeloso, fuera del neuroeje.

- Otro tanto puede decirse de la vimentina, de expresión habitual en casi todas las neoplasias con cierta capacidad de crecimiento. Obviamente, la máxima positividad se da en el meningioma, del que es el antisuero por excelencia. También puede aparecer en hemangioblastomas y neurinomas, con carácter más inespecífico con menor intensidad. En general, la expresión de vimentina es tanto mayor cuanto más agresivo es el tumor.
- Los marcadores de células neuronales como la sinaptofisina, los neurofilamentos y la ENE son útiles para diferenciar neoplasias de origen nervioso. Especialmente es interesante la sinaptofisina, capaz de definir neoplasias de origen neuronal incluso de baja madurez. En nuestra experiencia, la ENE es más útil en los tumores embrionarios hemisféricos que en el meduloblastoma y en los tumores maduros del tipo del ganglioneuroma, que también se demuestra fácilmente con los neurofilamentos.
- El Leu-7 es un marcador inespecífico pero útil para definir las formas clásicas del oligodendroglioma, en tanto que ni la PBM ni el MAG carecen de utilidad.
- Los marcadores epiteliales permiten diferenciar los carcinomas metastásicos de los tumores primitivos del sistema nervioso central. Las excepciones se reducen a los tumores de los plexos, algunos ependimomas en los que la coexistencia de expresiones de los marcadores neurales permiten la diferenciación correcta.

Así, el antisuero epitelial EMA define todas las neoplasias epiteliales, si bien presenta la máxima expresión en las metástasis carcinomatosas y, en segundo lugar, con menos constancia, en los ependimomas y en algunos papilomas de los plexos coroideos. Un 40% de los meningiomas es capaz de expresar EMA, especialmente la variante secretora. Rara vez aparece en gliomas, salvo en algunos astrocitomas de bajo grado y en las variantes epiteliales del glioblastoma.

Como en el caso anterior, el antisuero CAM 5.2 es positivo en todas las neoplasias epiteliales metastásicas. En este caso hay que sumar los tumores de los plexos coroideos, cuyas células suelen expresar citoqueratinas de bajo peso.

CONCLUSIÓN

En la práctica diaria, la inmunohistoquímica es un método de gran rentabilidad y, utilizado correctamente, es capaz de solucionar graves problemas de diagnóstico diferencial, pero debe ser abordado bajo ciertas condiciones previas:

- Los resultados deben interpretarse sobre la base de un conocimiento previo profundo de la anatomía patológica de los tumores cerebrales.
- La simple positividad tiene un valor escaso por sí misma, debiendo valorarse cuidadosamente todos los factores artefactuales citados.
- En los casos de diferenciaciones múltiples o anómalas, es imprescindible el uso de controles previamente tipificados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Escalona Zapata J. *Astrocytes in brain tumors. Differentiation or trapping?* *Histol Histopath* 1994; 9: 325-332.
2. Figols J, Cruz Sánchez F. *Inmunohistoquímica de los tumores del sistema nervioso central y periférico*. En: Escalona Zapata J (Ed.). *Tumores del sistema nervioso central*. Ed. Complutense, Madrid 1996.
3. Bonnin JM, Rubinstein LJ. *Immunohistochemistry of central nervous system tumors. Its contribution to neurosurgical diagnosis*. *J Neurosurg* 1984; 60: 1121-1133.
4. Schiffer D, Giordana MT, Mauro A, Michelli A, Germano I, Giaccone G. *Immunohistochemical demonstration of vimentin in human cerebral tumors*. *Acta Neuropath (Berlin)* 1986; 70: 209-219.

5. Cruz Sánchez FF, García-Bachs M, Rossi ML y cols. *Epithelial differentiation in gliomas, meningiomas and choroid plexus papillomas*. Virchows Arch B 1992; 62: 25-34.
6. Escalona Zapata J. Tumores del sistema nervioso central. Ed. Complutense, Madrid 1996.
7. Motoi M, Yoshino T, Hayashi S, Nose S, Horie Y, Ogawa K. *Immunohistochemical studies on human brain tumors using anti-leu 7 monoclonal antibody in paraffin-embedded specimens*. Acta Neuropath (Berlin) 1985; 66: 75-77.
8. Perentes E, Rubinstein LJ. *Immunohistochemical recognition of human neuroepithelial tumors by Leu-7 (HNK) monoclonal antibody*. Acta Neuropath (Berlin) 1986; 69: 227-233.
9. Escalona Zapata J. *Unusual oligodendrogliomas*. Acta Neuropath (Berlin) 1981; Suppl. VII: 94-96.
10. Meneses ACO, Kepes JJ Sternberg NH. *Astrocytic differentiation of neoplastic oligodendrocytes*. J Neuropath Exp Neurol 1982; 41: 368.
11. Escalona Zapata J, Miranda Nieves G. *Interrelations between oligodendrocytes and astrocytes in oligodendrogliomas*. Clin Neuropath 1992; 6: 291.
12. Figols J, Cervos-Navarro J, Cruz Sánchez F. *Lectins: Reliable differentiation markers in human oligodendrogliomas*. Brain Tumor Pathol 1993; 10: 1-6.
13. Cruz Sánchez F, Rossi ML, Hughes JT, Cervos-Navarro J. *An immunohistological study of 66 ependymomas*. Histopathology 1988; 13: 443-454.
14. Gullotta F, Schindler F, Schmutzler R, Weeks-Seifert A. *GFAP in brain tumor diagnosis: Possibilities and limitations*. Pathol Res Pract 1985; 180: 54-60.
15. Troyanowski JQ. *Neurofilament proteins and human nervous system tumors*. J Histochem Cytochem 1987; 35: 999-1003.
16. Takahashi H, Wakabayashi K, Kawai K y cols. *Neuroendocrine markers in central nervous system neuronal tumors (gangliocytoma and ganglioglioma)*. Acta Neuropath (Berlin) 1989; 77: 237-243.
17. Burger PC, Scheithauer WB. Tumors of the central nervous system. AFIP, Washington, DC, 1994.
18. Cruz Sánchez F, Rossi ML, Hughes JT, Moss TH. *Differentiation in embryonal neuroepithelial tumors of the central nervous system*. Cancer 1991; 67: 965-976.
19. Mannoji H, Becker LE. *Ependymal and choroid plexus tumors. Cytokeratin and GFAP*. Cancer 1988; 61: 1377-1385.
20. Taratutto AL, Molina H, Monges M. *Choroid plexus tumors in infancy and childhood. Focal ependymal differentiation. An immunoperoxidase study*. Acta Neuropath (Berlin) 1983; 56: 304-308.
21. Nakamura Y, Becker LE, Marks A. *Distribution of S-100 protein in pediatric brain tumors*. J Neuropath Exp Neurol 1983; 42: 136-145.
22. Coffin CM, Wick MR, Braun JT, Dehner LP. *Choroid plexus neoplasms. Clinicopathologic and immunohistochemical studies*. Am J Surg Path 1986; 10: 394-404.
23. Johnson MD, Glick AD, Dawis BW. *Immunohistochemical evaluation of Leu-7, myelin basic protein, S-100 protein, glial-fibrillary acidic protein and LN3 immunoreactivity in nerve sheath tumors and sarcomas*. Arch Pathol Lab Med 1988; 112: 155-160.
24. Meis JM, Ordóñez NG, Bruner JM. *Meningiomas. An immunohistochemical study of 50 cases*. Arch Path Lab Med 1986; 110: 934-937.
25. Kepes JJ. *The histopathology of meningiomas. A reflection of origins and expected behavior*. J Neuropath Exp Neurol 1986; 45: 95-107.
26. Alguacil García A, Pettigrew NM, Sima AAF. *Secretory meningioma. A distinct subtype of meningioma*. Am J Surg Path 1986; 10: 102-111.