

REVISIONES

## TECNICAS DE INMUNO-PEROXIDASA EN LA DETECCION DE MARCADORES TUMORALES Y ANTIGENOS VIRALES

GENARINA ESCOVAR V.,\* HENRY HANSEN V.,\*\* GONZALO URIBE BOTERO.\*\*\*

En las dos últimas décadas ha habido un notable desarrollo de la metodología diagnóstica por medios inmuno-histoquímicos. La introducción de estos métodos en la investigación biomédica ha contribuido a resolver numerosos problemas de diagnóstico en histopatología. Además han contribuido considerablemente al diagnóstico rápido y preciso de varias enfermedades infecciosas de importancia médica. El método inmunocitoquímico se basa esencialmente en explotar la exquisita especificidad de los anticuerpos como reactivos de diagnóstico en la visualización y localización de una gran variedad de antígenos presentes en los tejidos y en las células.

### APLICACION DE LOS METODOS INMUNOCITOQUIMICOS

En esencia la aplicación de los métodos inmunocitoquímicos permite una expansión de las observaciones morfológicas en su correlación con los patrones bioquímicos y fisiológicos. Como elementos de diagnóstico, han sido ampliamente empleados en la clasificación y el diagnóstico de enfermedades del intersticio y del glomérulo renal, así como también en enfermedades mediadas

inmunológicamente (1, 2) y en un número considerable de infecciones virales (3). Más recientemente han sido empleados en el diagnóstico y clasificación de una variedad amplia de condiciones neoplásicas y preneoplásicas con base en la presencia o ausencia de una serie de marcadores tumorales (4).

### MARCADORES TUMORALES

Los marcadores tumorales representan un grupo heterogéneo de sustancias que están presentes en los extractos de tejidos o en el plasma de pacientes con diferentes neoplasias (5).

Las áreas de mayor interés en el diagnóstico inmunocitoquímico incluyen las varias clases de inmunoglobulinas en los tumores de origen linfo-reticular y en los procesos linfo-proliferativos atípicos, la identificación específica de polipéptidos y hormonas esteroides, así como receptores específicos en tumores endocrinos y no endocrinos y el estudio de antígenos carcinoembrionarios en lesiones neoplásicas y preneoplásicas en el colon y otros tejidos. Desde un punto de vista clínico, por la aplicación de estos procedimientos se espera una ayuda en el diagnós-

---

\* Profesora asistente, Departamento de Morfología. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Actualmente en entrenamiento: Department of Pathology M.D. Anderson Hospital and Tumor Research Institute. Texas Medical Center, Houston Texas 77030. U.S.A.

\*\* Profesor asociado, Departamento de Microbiología y Parasitología, Sección Virología. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Actualmente en entrenamiento: Department of Virology Baylor College of Medicine. Texas Medical Center. Houston Texas 77030, U.S.A.

\*\*\* Profesor Asistente, Department of Pathology Baylor College of Medicine. Texas Medical Center and Staff Pathologist Veterans Administration Hospital Medical Center Houston Texas 77211, U.S.A.

SOLICITUD DE SEPARATAS AL DR. HENRY HANSEN.

tico temprano de las neoplasias, la predicción del pronóstico y la predicción a la respuesta de varias formas de terapia.

En la tabla 1 se presenta un resumen de los principales marcadores tumorales y de los principales antígenos virales demostrables por métodos inmunocitoquímicos y su aplicación diagnóstica (5, 6, 7).

Basados esencialmente en reacciones inmunocitoquímicas de radio-inmunoensayo y en propiedades fisiológicas, es posible realizar una clasificación de los marcadores tumorales, dividiéndolos en varias clases:

#### 1. Primera clase de marcadores tumorales

Esta clase incluye substancias tales como hormonas, enzimas e inmunoglobulinas, que son producidas en células adultas normales y que se encuentran incrementadas en el suero y en los tejidos de pacientes con tumores derivados de este grupo específico de células. El incremento en la producción de hormonas adenohipofisarias en tumores de la pituitaria, de hormonas pancreáticas en tumores pancreáticos, de enzimas como la fosfatasa ácida potásica en neoplasmas de la próstata y la presencia de inmunoglobulinas monoclonales en el suero de pacientes con mieloma y otras enfermedades linfoproliferativas, representan ejemplos de la utilidad clínica de esta clase de marcadores tumorales (7). (Ver figuras Nos. 3, 4, 5).

#### 2. Segunda clase de marcadores tumorales

Una segunda clase de marcadores tumorales incluye los llamados antígenos oncofetales, presentes en altas concentraciones en los embriones, en el feto y en la placenta y que no son detectables o están presentes en muy bajas concentraciones en el adulto. Este segundo grupo incluye una variedad de isoenzimas fetales o embrionarias como la fosfatasa alcalina placentaria (Isozima de Regan), el antígeno carcinoembrionario, la alfafetoproteína, la alfa-1-antitripsina, la hormona gonadotropina coriónica y una variedad amplia de hormonas e iso-hormonas que pueden ser sintetizadas por los tumores endocrinos y no endocrinos (Ver figura No. 6).

#### 3. Tercera clase de marcadores tumorales

Este grupo incluye los llamados antígenos específicos de tumor o antígenos asociados a los tumores, los cuales son únicos para un tipo particular de neoplasma (Ej.: melanoma, sarcoma). Estos tumores, que en su mayoría son definidos desde un punto de vista bioquímico, pueden despertar una respuesta humoral o celular en el huésped (6). (Ver figura No. 7).

### ANTIGENOS VIRALES

Mediante la aplicación de los métodos de inmunoperoxidasa ha sido posible demostrar antígenos virales en el citoplasma o en el núcleo de las células infectadas. Entre los principales se pueden señalar los antígenos de Hepatitis B., Herpes simplex y Citomegalovirus (Tabla No. 1). (Ver figura No. 8).

### EMPLEO DE LAS TECNICAS DE INMUNOPEROXIDASA

Uno de los mayores avances en el campo de la inmunocitoquímica ha sido el desarrollo de las técnicas de inmunoperoxidasa aplicadas a la demostración específica de antígenos intracelulares y tisulares (8). Estas técnicas comparten varios principios con las ya establecidas y ampliamente utilizadas técnicas de inmunofluorescencia (9); sin embargo, ofrecen mayores ventajas, como el uso de tejidos embebidos en parafina, la estabilidad del producto de la reacción, la obtención de preparaciones permanentes y la utilización de microscopía de luz o electrónica. Tales factores, además de su extraordinaria sensibilidad y especificidad han incrementado rápidamente la popularidad de su uso como ayuda diagnóstica en patología quirúrgica, de autopsias y en enfermedades infecciosas de importancia clínica.

### LA ENZIMA PEROXIDASA COMO MARCADOR INMUNOCITOQUIMICO

Los refinamientos tanto conceptuales como técnicos sucedidos en las últimas dos décadas han permitido el desarrollo de métodos más sensibles, tales como el uso de

TABLA No. 1

APLICACION DIAGNOSTICA DE LOS METODOS INMUNOCITOQUIMICOS EN PATOLOGIA TUMORAL

MARCADOR TUMORAL	APLICACION DIAGNOSTICA
Tumores de la pituitaria anterior (hormonas adrenocorticotrópica, hormona prolactina, del crecimiento, estimulante de la tiroides, luteinizante folículo-estimulante.	Clasificación de tumores de la pituitaria anterior (23, 24, 25, 26).
Hormonas de los islotes pancreáticos (insulina, glucagón, somatostatina) además, polipéptido pancreático, gastrina, colecistoquinina.	Clasificación de las células de los islotes pancreáticos y sus tumores y diagnóstico de tumores carcinoides (27, 28, 29, 30, 31).
Fosfatasa ácida	Identificación del carcinoma prostático y sus metástasis (32).
Alfa-1-antitripsina	Carcinoma hepatocelular. Tumores de origen endodérmico (33).
Alfa-feto-proteína	Carcinoma hepatocelular. Diagnóstico diferencial de tumores del ovario y tumores testiculares de la línea germinal (34, 35).
Alfa-lacto-albúmina	Carcinoma del seno (36, 37, 38).
Calcitonina	Carcinoma medular de la tiroides. Hiperplasia de células C. (39, 40, 41).
Antígeno carcinoembrionario	Adenocarcinoma del colon. Diferenciación de mesoteliomas de los carcinomas metastásicos (42, 43, 44).
Gonadotropina Coriónica	Neoplasmas del trofoblasto. Diferenciación de tumores ováricos y testiculares de la línea germinal (45, 46, 47).
Factor VIII	Tumores derivados de células endoteliales (48).
Cadenas pesadas y livianas de Inmunoglobulinas	Identificación de linfomas de tipo B. Diferenciación de Linfomas de carcinomas indiferenciados. Diferenciación de linfomas malignos de hiperplasias atípicas. Caracterización de Mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenstrom (49, 50, 51, 52, 53).
Lisozima o Muramidasa	Linfoma histiocítico. Leucemia Monocítica (54).
Mioglobina-Miosina	Tumores derivados de músculo esquelético y músculo liso (55).
Lactógeno placentario	Neoplasmas de trofoblasto (56).
Testosterona	Tumores de células de Leydig y Sertoli (57).
Estradiol	Tumores ováricos de la granulosa y de la teca (58).
Tiroglobulina	Nódulos tiroides adenomatosos adenomas y carcinomas (59).
<b>MARCADORES VIRALES</b>	
Antígeno de Hepatitis B.	Carcinoma hepatocelular. Infección Viral (60, 61).
Antígeno de Herpes Simplex	Carcinoma de cervix y vulva sospechosos de origen viral (62).

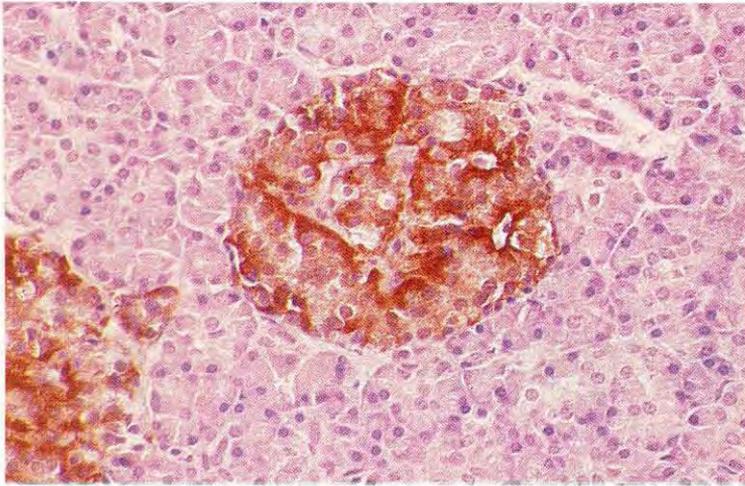


Figura No. 3. Reacción de Peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) positiva en la detección Insulina en un Islole de Leangerhans (25 X).

Figura No. 4. Fosfatasa ácida demostrada en un tejido prostático hiperplásico, utilizando el método inmunocitoquímico (PAP) (10 X).

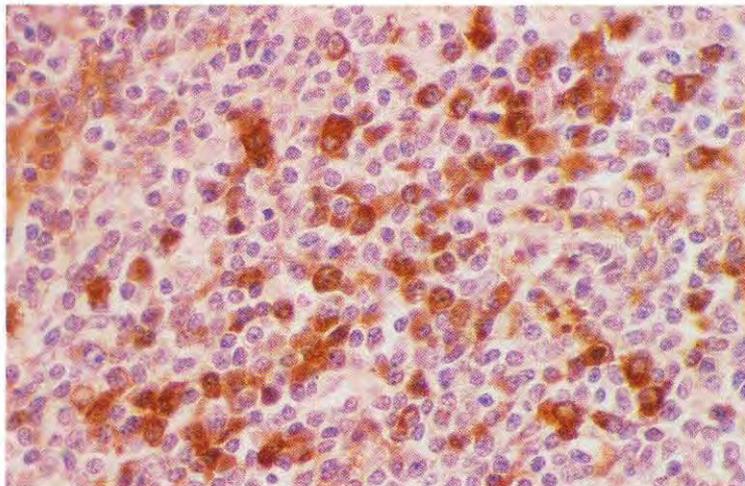
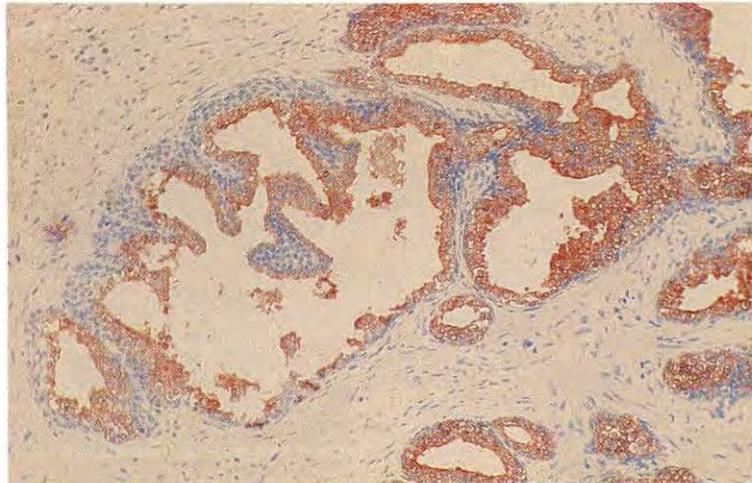


Figura No. 5. Linfoma de tipo monoclonal productor de cadenas livianas tipo kappa detectado por el método de Peroxidasa anti-peroxidasa (40 X).

Figura No. 6. Fuerte reacción positiva de PAP en la detección de la enzima alfa-lantitripsina en un caso de cirrosis hepática.

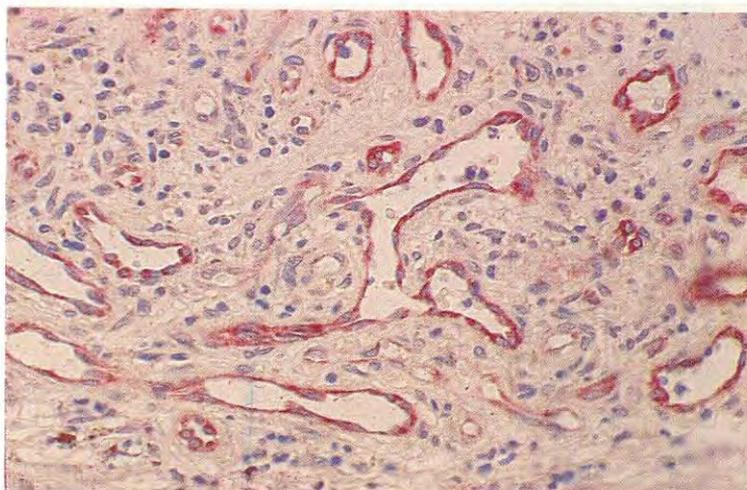
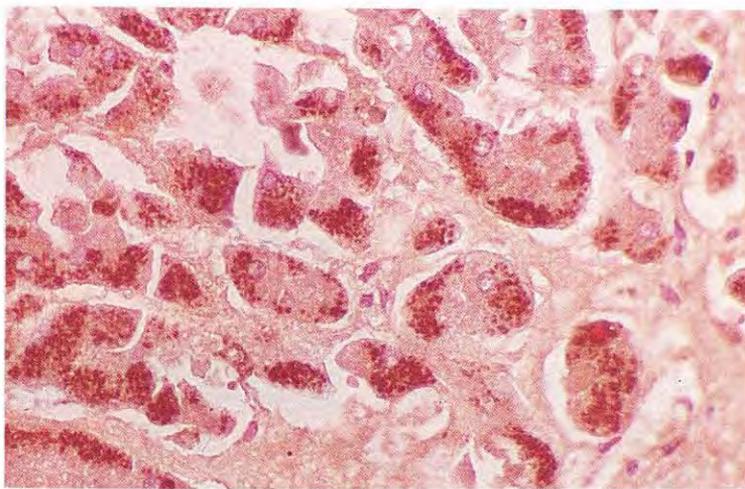
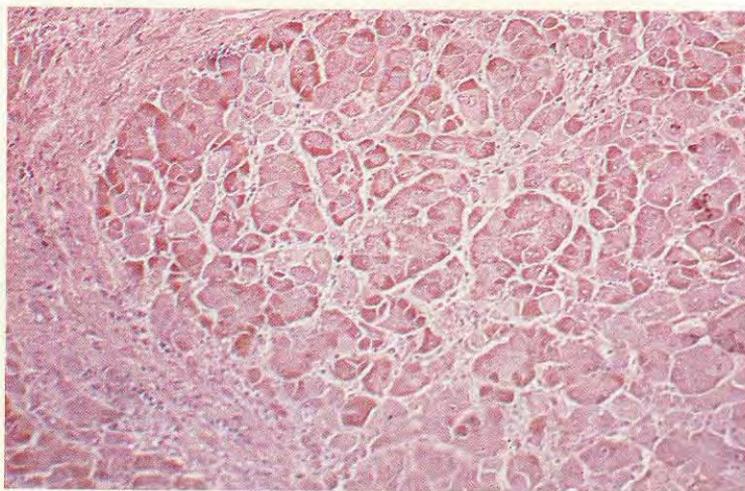


Figura No. 7. Localización inmunocitoquímica del Factor VIII en el endotelio vascular, en un caso de hiperplasia angiolímfica con eosinofilia. Método de PAP (25 X).

Figura No. 8. Reacción positiva de PAP en la detección de antígeno superficial de Hepatitis B (H Bs Ag) en el citoplasma de células hepáticas (10 X).



enzimas conjugadas a anticuerpos y procedimientos enzimáticos sin anticuerpos conjugados. La enzima peroxidasa, glicoproteína extraída de las raíces del rábano, con peso molecular de 40.000 daltones y compuesta por más de 20 iso-enzimas con rango de actividad enzimática entre los pH 5.5 a 7.6, ha demostrado ser un excelente marcador inmunocitoquímico, cuando se la conjuga con inmunoglobulinas del tipo G (IgG) (10).

#### METODOS DE INMUNOPEROXIDASA

##### 1. Métodos de Inmunoperoxidasa con anticuerpos conjugados o marcados

En 1968 Nakane (11), describió el uso de la enzima peroxidasa conjugada a anticuerpos IgG, como marcador inmunocitoquímico aplicado a la demostración de hormonas adenohipofisarias. La inmuno reacción es fácilmente reconocida a nivel tisular mediante el empleo de un substrato cromógeno donador de electrones, la 3,3' diaminobenzidina. Este procedimiento permite la utilización de dos métodos: el directo y el indirecto.

a. Método directo de inmunoperoxidasa con anticuerpos, conjugados o marcados: Consiste en la utilización de un solo antisuero constituido por moléculas de IgG conjugadas con moléculas de peroxidasa y dirigido específicamente a la demostración del antígeno tisular en estudio. (Figura 1A<sub>1</sub>).

b. Método indirecto de inmunoperoxidasa con anticuerpos conjugados o marcados. En este método se utilizan consecutivamente un primer antisuero constituido por anticuerpos específicos contra el antígeno en estudio y un segundo antisuero conjugado con la enzima peroxidasa y dirigido contra la especie animal en el cual el primer antisuero ha sido preparado (Figura 1A<sub>2</sub>).

Aún cuando el grado de especificidad y sensibilidad de ambos métodos es mayor que el obtenido con las técnicas de inmunofluorescencia, este tipo de reacciones por lo general exhiben un grado considerablemente alto de reacción inespecífica de fondo en el

tejido, lo cual dificulta algunas veces la interpretación y lectura de las áreas positivas.

#### METODO DE ENLACE INMUNOGLOBULINA-ENZIMA

Mason *et al* (12), desarrollaron un método que no requiere de la conjugación directa de la enzima peroxidasa a moléculas de IgG, sino que depende de una reacción de enlace de los anticuerpos con moléculas libres de la enzima. La reacción se verifica en cuatro etapas sucesivas. En la primera, los anticuerpos específicos reaccionan con determinantes antigénicos en el tejido. En la segunda etapa se utilizan anticuerpos (IgG) contra la especie animal en la cual fue preparado el primer antisuero. En una tercera etapa se adicionan anticuerpos anti-peroxidasa. Finalmente, en la cuarta etapa, se adicionan moléculas libres de la enzima peroxidasa las cuales son captadas por los anticuerpos de la tercera etapa. (Figura 1B). Este método también presenta el problema de reacción inespecífica de fondo en el tejido debido principalmente a la posibilidad de unión de las moléculas libres de peroxidasa con anticuerpos inespecíficos en el sistema.

#### METODO DE PEROXIDASA ANTI-PEROXIDASA (PAP)

En 1970 Sternberger (13) modificó el método anterior, substituyendo las etapas tercera y cuarta del mismo, con el uso de un antisuero conformado por un complejo inmune de 2 moléculas IgG anti-peroxidasa, unidas a 3 moléculas de la enzima peroxidasa. De esta forma, la posibilidad de reacciones de la enzima libre, con anticuerpos inespecíficos en el sistema fue virtualmente eliminada. La obtención de reacciones limpias, sin problemas de reacciones inespecíficas de fondo, facilitó la lectura e interpretación de las áreas positivas en el tejido (Figura 1C).

#### SISTEMA INMUNO-ENZIMATICO AVIDINA-BIOTINA

Recientemente, Guesdon, *et al* (14), describieron un método para la demostra-

ción de antígenos tisulares, basado esencialmente en la interacción del sistema avidina-biotina.

La biotina o vitamina H, con peso molecular de 244.3 daltones presenta una gran avididad y afinidad para reaccionar en forma rápida y estable con moléculas de avidina.

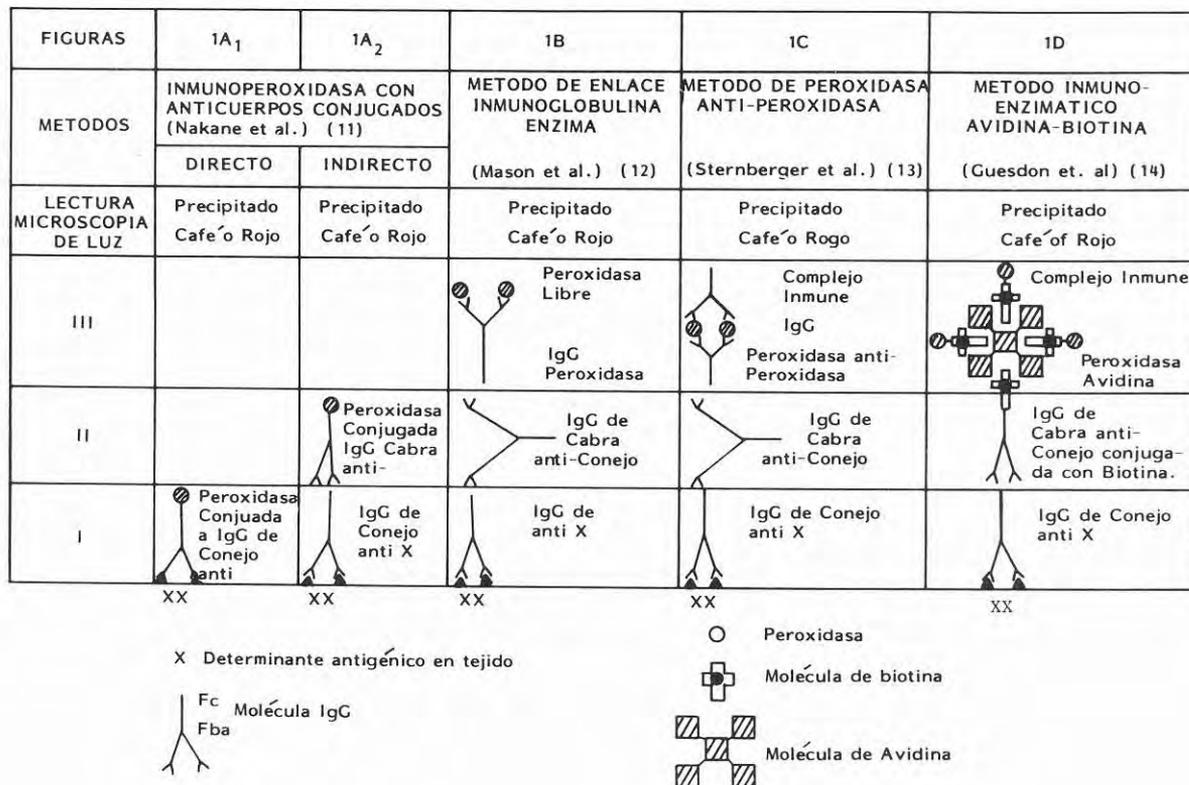
La molécula de biotina puede ser conjugada covalentemente con el residuo amino, carboxilo, sulfhidrilo o tirosilo de grupos protéicos, sin alterarse su capacidad de reacción con la molécula de avidina. Debido a esta propiedad ha sido posible su conjugación con moléculas de inmunoglobulinas (IgG) y también con enzimas como la peroxidasa (15).

La avidina es una glicoproteína aislada de la clara del huevo, tiene un peso molecular de 67.000 daltones, está conformada por 4 subunidades cada una de las cuales presenta un sitio reactivo para una molécula de biotina. Cada molécula de avidina reacciona con cuatro moléculas de biotina, lo cual permite una amplificación de la inmunoreacción incrementándose la visualización, sensibilidad y especificidad en el sitio de localización del antígeno.

El método inmunoenzimático avidina-biotina consiste esencialmente en un tratamiento secuencial de los tejidos con los siguientes reactivos:

- a. Incubación con un antisuero específico contra el antígeno en estudio.

FIGURAS 1A , 1A , 1B , 1D  
METODOS DE IMMUNOPEROXIDASA



- b. Incubación con un antisuero consistente en moléculas IgG conjugadas con biotina y preparado contra la especie animal en la cual el primer antisuero fue obtenido.
- c. Incubación con moléculas de avidina.
- d. Incubación con moléculas de biotina conjugadas a la enzima peroxidasa.
- e. Desarrollo de la reacción cromógena con peróxido de hidrógeno y 3.3'-diaminobenzidina (Figura 1D).

Warnke *et al* (15) también describieron el sistema inmunoenzimático Avidina-Biotina-Conjugado; en este procedimiento las moléculas IgG se conjugan a la biotina y la enzima peroxidasa a la avidina. A pesar de que varias publicaciones señalan que este método es más sensible que el sistema de Peroxidasa-Anti-peroxidasa, su uso es muy limitado aún debido quizás en gran parte a lo muy reciente de su desarrollo.

Esencialmente los cuatro métodos descritos anteriormente representan variaciones de un mismo principio, es decir, el uso de anticuerpos específicos en la detección de antígenos tisulares y la incorporación de la enzima peroxidasa al sistema como marcador inmunocitoquímico. Al comparar el grado de especificidad lograda con estos métodos se debe anotar que los que utilizan moléculas IgG marcadas con la enzima peroxidasa, por lo general son menos específicos que aquellos que utilizan inmuno-complejos tales como los de peroxidasa anti-peroxidasa y el sistema inmunoenzimático avidina-biotina. La decisión de escoger entre ellos en una investigación dada, depende de variables como la posibilidad de obtención de los antisueros utilizados en la inmunorreacción, ya sea comercialmente o preparados en el laboratorio. Otros factores que deben considerarse son la naturaleza del antígeno en estudio y la concentración del mismo en los tejidos. Debido a que el método de peroxidasa anti-peroxidasa ha sido el más ampliamente utilizado en los últimos años, consideramos de utilidad la descripción y discusión detallada de su procedimiento.

## ETAPAS DE LA REACCION DE PEROXIDASA ANTI-PEROXIDASA (PAP)

### PREPARACION DEL ESPECIMEN O TEJIDO

Uno de los principales problemas que enfrenta un inmunocitoquímico es la preparación de los tejidos de manera tal que los procesos de fijación e inclusión en parafina no alteren al antígeno en estudio. La conservación de las características físico-químicas de los determinantes antigénicos en los tejidos es un factor clave en el éxito de la reacción, ya que cuando esto no se logra, otros factores importantes, como el de la especificidad, pierden totalmente su valor.

#### 1. Proceso de fijación

En el método PAP los siguientes fijadores han brindado excelentes resultados: formalina neutra, Bouin, solución de Biclóruro-Formalina-Mercurio, B-5 formaldehído.

A pesar de que la mayoría de determinantes antigénicos en cualquier tejido son destruidos por los anteriores fijadores y por los procedimientos de inclusión en parafina, el método de PAP es extremadamente sensible como para permitir la visualización del antígeno en estudio porque los anticuerpos en dilución son capaces de reaccionar con los pocos determinantes antigénicos que no han sido destruidos por tales procedimientos (16).

#### 2. Inclusión en Parafina

Después de la fijación, los tejidos son incluidos en parafina utilizando los procesos estándares de rutina. En la demostración de lípidos o antígenos asociados a materiales ricos en lípidos, se recomienda el uso de cortes de tejidos obtenidos con vibrotomo (17), pues el tratamiento con parafina y sus solventes, extraen los lípidos presentes en el tejido.

#### 3. Cortes en Parafina

Se recomienda la obtención de cortes de 4 micras de espesor, con un micrótopo convencional. Se recogen en láminas portaobjetos limpias y pre-tratadas con una

solución acuosa de gelatina o albúmina para asegurar buena adherencia de los tejidos a la superficie del vidrio. Por lo general 1 cucharadita de gelatina o albúmina añadida al agua en donde se recogen los cortes, brinda buena adherencia de los tejidos a las láminas. Inmediatamente antes de realizar el proceso de PAP, los cortes deben ser incubados durante 2 a 3 horas a 60°C., lo cual asegura una mayor adherencia.

#### 4. *Uso de cortes por congelación en la prueba PAP*

Existen varios problemas cuando se emplean cortes por congelación en el método de PAP y por lo tanto la recomendación de su uso debe ser limitada a aquellos casos en los cuales no se puedan obtener cortes de parafina. Entre los principales problemas se señalan los siguientes:

- a. Poca adherencia de los tejidos a las láminas. En un proceso con numerosas etapas como lo es el método de PAP, los cortes por congelación tienden a flotar cuando la fijación de los mismos no es total.
- b. Formación de reacción inespecífica de fondo, debida a la presencia de gran número de determinantes antigénicos específicos y no específicos, conservados en el tejido (21).
- c. El uso de una dilución baja (o alta concentración) del antisuero primario, usualmente conduce a la obtención de resultados negativos (18).

En casos en los cuales se haga imprescindible el uso de cortes por congelación, se recomienda fijar los tejidos en etanol al 95% durante 30 minutos para lograr una buena adherencia. Además es aconsejable el uso de diluciones altas del primer antisuero (por Ejem: 1:1,000) con el objeto de evitar reacciones inespecíficas de fondo en el tejido.

#### DESPARAFINIZACION E HIDRATACION DE LOS TEJIDOS

Inmediatamente antes de realizar el método PAP los tejidos son desparafinados

en xilol, dos veces durante 10 minutos e hidratados en un gradiente descendente de etanol (100%, 95%, 75%, 50%, 15%) y agua durante 5 minutos respectivamente, en cada solución.

#### DESTRUCCION DE LA PEROXIDASA TISULAR ENDOGENA

Con el objeto de evitar falsos positivos, es deseable destruir la peroxidasa endógena existente en los tejidos antes de la realización del método de PAP. Los eritrocitos y granulocitos poseen niveles altos de peroxidasa endógena que aparentemente no es destruida durante los procesos de inclusión en parafina. En tejidos ricos en células sanguíneas, en cortes hemorrágicos, en reacciones inflamatorias y en material de biopsia o autopsia, se recomienda la destrucción de la peroxidasa endógena exponiendo los cortes histológicos, después de que han sido desparafinados e hidratados, a la acción de una solución consistente en 100 ml. de metanol absoluto con 1 ml. de peróxido de hidrógeno al 30%, durante 30 minutos. En los cortes muy hemorrágicos el tiempo de exposición puede ser prolongado hasta 45 minutos, sin afectar la morfología histológica (19).

#### BLOQUEO DE DETERMINANTES ANTIGENICOS NO ESPECIFICOS EN EL EN EL TEJIDO

El bloqueo de determinantes antigénicos no específicos en los tejidos se logra tratando los cortes durante 20 minutos con suero normal (20%), de la misma especie animal en la cual se preparó el antisuero secundario. Este tratamiento reduce en forma apreciable las reacciones inespecíficas de fondo en el tejido.

#### INMUNO-REACCION PAP

##### 1. *Consideraciones Generales*

Se obtienen resultados excelentes en la inmuno-reacción de PAP cuando se observan cuidadosamente las siguientes recomendaciones:

- a. Con el objeto de evitar que las soluciones expuestas al tejido se extravasen de

su área, dibuje una línea con un lápiz de diamante siguiendo el contorno de los tejidos en estudio.

- b. Todas las soluciones utilizadas en la inmuno-reacción son aplicadas en gotas sobre el tejido. Usualmente 0.2 ml. de la solución son suficientes para cubrir completamente el área.
- c. Después de cada período de incubación con el respectivo antisuero y con el objeto de remover el exceso de anticuerpos en el tejido, las láminas se sumergen en un lavado con solución tamponada Tris (0.05 M, pH 7.6) (Schwarz/Mann Inc., Spring Valley N.Y. U.S.A.), durante 10 a 15 minutos.

Las láminas expuestas a diferentes antisueños deben ser lavadas todo el tiempo separadamente con el objeto de evitar contaminación de un antisuero con otro. El método es tan sensible que una momentánea exposición de los tejidos con altas diluciones de otro antisuero durante el lavado, puede resultar en una reacción positiva. Por la misma razón se recomienda mantener las láminas en cajas separadas y cubiertas durante todo el proceso.

- d. Con el objeto de evitar que se seque el tejido durante la inmunorreacción, las láminas deben ser colocadas en cámaras húmedas. El uso de cajas de Petri con gasa húmeda en el fondo y envueltas en papel de aluminio, proporciona un ambiente óptimo de humedad para la incubación de las mismas. El resecamiento del tejido debe ser evitado pues altera la estructura terciaria de las inmunoglobulinas impidiendo la inmuno-reacción.

## 2. *Uso del antisuero primario*

Los cortes se incuban con 0.1-0.2 ml. de la dilución de trabajo del primer antisuero, por lo general durante 24 horas a 4°C. Este antisuero consiste en moléculas de IgG específicamente dirigidas contra el antígeno en estudio. Se deben preferir antisueños que contengan la molécula total de IgG, a fracciones de la misma.

La óptima dilución de trabajo del primer antisuero se averigua haciendo una titulación (varias diluciones del mismo), contra un tejido que se sospeche contenga altas concentraciones del antígeno en estudio. Este método permite escoger la mejor dilución del primer antisuero en la cual la concentración de anticuerpos presentes reacciona con una concentración desconocida del antígeno en el tejido; de manera que la reacción positiva está altamente expresada y la reacción inespecífica de fondo es mínima. Por lo general el método PAP trabaja con diluciones altas del primer antisuero; el rango para encontrar una dilución de trabajo determinada puede estar comprendido entre diluciones desde 1:50 a 1:50,000, dependiendo de la concentración de anticuerpos en el antisuero (20).

## 3. *Uso del segundo antisuero*

El segundo antisuero consiste en moléculas de IgG contra la IgG de la especie animal en la cual se obtuvo el primero. La dilución utilizada debe ser baja, por lo general con diluciones de 1:10 a 1:50 con el objeto de asegurar una buena concentración de anticuerpos ligantes de la inmunorreacción. La incubación de los tejidos se realiza durante media hora a 37°C.

## 4. *Uso del tercer antisuero*

El tercer antisuero o complejo inmune de Peroxidasa anti-peroxidasa usualmente se utiliza diluido en un rango de 1:50 a 1:200. La titulación del antisuero se puede verificar utilizando un primer y un segundo antisuero de títulos conocidos. La incubación de los tejidos se realiza durante media hora a 37°C.

## DESARROLLO DE LA REACCION CROMOGENA

### 1. *Principios Generales*

La reacción cromógena se desarrolla por la presencia de tres substancias. Una de ellas es la enzima peroxidasa contenida en el tercer antisuero (Figura 2, etapa III), la cual reacciona con su substrato específico, el peróxido de hidrógeno (Figura 2, etapa IV), para formar un complejo enzima-substrato

(peroxidasa-peróxido de hidrógeno) (Figura 2, etapa V). En presencia de una sustancia donadora de electrones (3.3'-diaminobenzidina o 3-amino-9-etilcarbazol) (Figura 2, etapa VI), ocurre un segundo complejo a través de la oxidación y polimerización de los mismos, (Figura 2, etapa VII), formándose un precipitado café o rojo (Figura 2, etapa VIII), el cual, por ser bastante insoluble, se mantiene pegado al sitio de la inmunorreacción siendo fácilmente reconocido por microscopía de luz.

recomienda el uso de soluciones frescas y filtradas. La actividad oxidativa de la diaminobenzidina u otro donador de electrones varía de lote y de acuerdo con la casa comercial donde se obtiene. Por lo tanto, su titulación (uso de varias concentraciones), contra tejidos positivos es lo más indicado, con el fin de escoger la concentración ideal.

La solución de diaminobenzidina más peróxido de hidrógeno debe ser incolora, antes de sumergir los tejidos en ella. El pH. 7.6 no es el óptimo para la actividad de la enzima peroxidasa, pero se escoge porque la oxidación espontánea de la diaminobenzidina es mínima en el tiempo de incubación fijado, lo cual evita la formación de precipitados muy gruesos sobre el tejido.

El tiempo de incubación por lo general está en los límites de 3 a 8 minutos; sin embargo se recomienda observar, por microscopía de luz y en poco aumento los tejidos, para escoger la incubación que permita una tinción fuerte de las áreas positivas y una mínima de los tejidos circundantes.

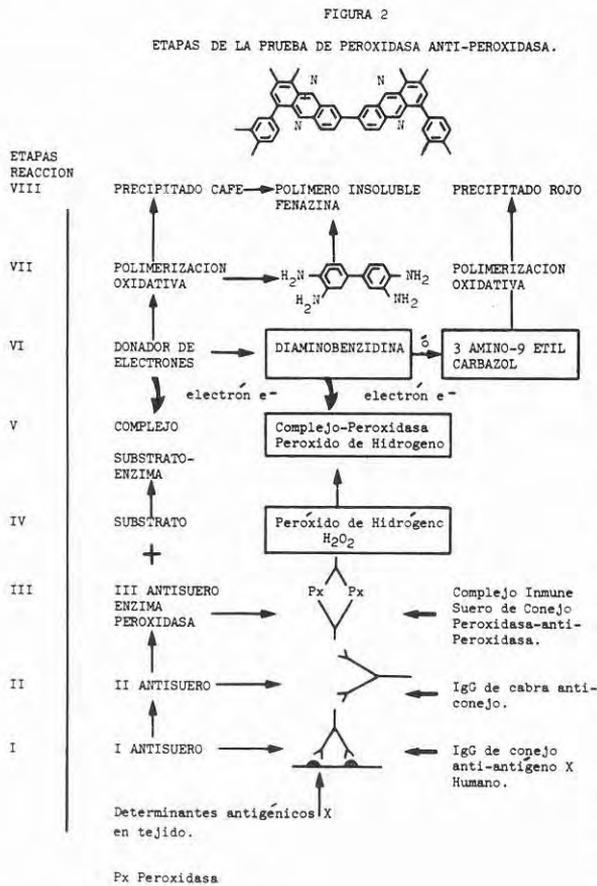
Cuando se utilizan sustancias tales como el 3-amino-9-etil-carbazol y otros donadores de electrones como el 4-cloro-1-naftol, se debe tener en cuenta que sus productos de polimerización no son completamente insolubles y que se verifica una difusión de productos desde el sitio de liberación. En estos casos se sugiere fotografiar las áreas positivas inmediatamente después de la reacción. Además, estas sustancias difieren de la diaminobenzidina en que son liposolubles, por lo tanto se debe evitar el uso de alcoholes y xilol, para la deshidratación y clarificación de los tejidos (20).

### CONTRATINCION, DESHIDRATACION Y MONTAJE

Después de la incubación con la diaminobenzidina, las láminas son sumergidas durante 5 minutos en solución Tris.

#### 1. Contratinción

La contratinción con hematoxilina de Harris durante 5 minutos elimina significativamente la reacción inespecífica de fondo.



## 2. Procedimiento

Como donador de electrones se emplea una solución al 0.05% de diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno al 0.01% disueltos en solución tamponada de Tris 0.05 M, pH 7.6 y en él se sumergen los cortes histológicos. Se

Para tratar trabajos con cultivos celulares, está indicado el uso de colorantes más fuertes como la hematoxilina de Gill No. 3. Además se logra un mayor contraste del color azul, incubando los tejidos en solución saturada de carbonato de litio durante un minuto.

## 2. Deshidratación y montaje

La deshidratación de los tejidos se realiza en un gradiente ascendente de etanol de 15%, 50%, 75%, 95%, 100% y la clarificación en xilol, durante 5 y 10 minutos respectivamente en cada solución. Las láminas así tratadas se montan en Permount. Cuando se trabaja con substancias liposolubles, después de la contratinción las láminas son sumergidas en agua y montadas en glicerol.

## INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La reacción PAP realizada con diamino-benzidina imparte un color café a las áreas positivas, el amino-etil-carbazol da un color rojo, y el cloro naftol un color azul. Por lo general las reacciones intracitoplasmáticas positivas se ven a la microscopía de luz como granulares, ya que la mayoría de los antígenos se encuentran contenidos en gránulos secretorios. La intensidad del color guarda relación directa con la concentración de antígeno celular. En la detección de antígenos intranucleares se sugiere evitar el uso de hematoxilina para favorecer la visualización de los mismos.

Las reacciones inespecíficas de fondo son homogéneas, difusas y por lo general poco intensas. Sitios comunes para este tipo de reacción son: el tejido colágeno, materiales acumulados en vacuolas citoplasmáticas, en el lumen de glándulas y en secreciones extracelulares.

## FOTOGRAFIA

Con el uso de película Tungsteno Ektachrome de Eastman-Kodak, se obtienen fotografías casi similares en colorido a la reacción original. Cuando se trabaja con cultivos celulares o en caso de reacciones débiles, el uso de filtros puede ayudar a contrastar las áreas positivas.

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA DE PAP

El método de PAP demuestra antígenos que conservan su estructura antigénica a través de los rigores de la muerte, procesos de fijación, inclusión en parafina, cortes histológicos y tinción. No se pueden esperar resultados satisfactorios en las siguientes situaciones: autólisis en material de autopsia, inadecuada fijación, soluciones con pH ácidos o muy alcalinos y excesivo calor durante los procesos de inclusión. El material necrótico o células en proceso de degeneración conllevan reacciones no específicas; por ello, en la interpretación de resultados, solamente se deben estudiar células intactas.

## CONTROLES DE ESPECIFICIDAD EN EL METODO PAP

Con el fin de evaluar la especificidad de la inmunorreacción de PAP se requiere de la utilización de rigurosos controles (22).

## CONTROLES PARA PROBAR LA MONOESPECIFICIDAD DEL PRIMER ANTISUERO

Tres métodos se pueden utilizar para probar la mono-especificidad del primer antisuero:

### 1. Adsorción con antígeno específico

En este procedimiento, previa realización del método de PAP, el primer antisuero se adsorbe con su antígeno específico. Se utiliza el antígeno en exceso, en relación con la concentración de anticuerpos presentes en el antisuero. El antisuero así tratado se incuba durante 24 horas a 4°C y se centrifuga durante 10 minutos en centrífuga Eppendorf (15.000 r.p.m.), conservándose el sobrenadante para la prueba de PAP. Si el antisuero es mono-específico, los resultados al realizar el método de PAP deben ser negativos.

### 2. Substitución por suero pre-inmune o no inmune

En este método se substituye el primer antisuero por suero pre-inmune o no inmune

del mismo animal o de la misma especie animal en el cual se obtuvo el primer antisuero. Se deben obtener resultados negativos al aplicar el método de PAP.

### 3. *Substitución por antisuero no relacionado*

El método consiste en la substitución del antisuero primario por un antisuero no relacionado con el antígeno en estudio. Además de comprobar la monoespecificidad, este método permite investigar problemas de inmunidad cruzada entre antisueños primarios.

## CONTROLES PARA EL SEGUNDO Y TERCER ANTISUERO

### 1. *Supresión del segundo antisuero*

La supresión del segundo antisuero en el método de PAP, permite determinar la especificidad de la reacción con los antisueños primero y tercero. Deben obtenerse resultados negativos.

### 2. *Actividad de Peroxidasa en el tercer antisuero*

Para determinar la actividad de la peroxidasa contenida en el tercer antisuero, se tratan cortes histológicos con éste, diamino-benzidina y peróxido de hidrógeno siguiendo las recomendaciones del método de PAP. Se deben esperar reacciones inespecíficas en estructuras tales como colágeno y fibras reticulares (21). Este tipo de reacciones son imposibles de eliminar en el sistema. Las presuntas áreas inmunorreactivas del tejido deben resultar negativas con el anterior tratamiento. Para la interpretación de los resultados, se advierte que solo deben utilizarse cortes histológicos en los cuales previamente se haya bloqueado la acción de la peroxidasa endógena.

## REACCIONES INESPECIFICAS DE FONDO EN LOS TEJIDOS CON EL METODO DE PAP

### *Reacciones inespecíficas del tejido*

Las reacciones inespecíficas de fondo por lo general interfieren con la interpretación

precisa de las inmunorreacciones. Una variedad de causas se pueden citar como las productoras de estos problemas.

## *Causas y Acciones correctivas*

### 1. *Medio de inclusión residual*

Los residuos de parafina en los cortes conducen a reacciones inespecíficas en el método de PAP. El problema se evita con calentamiento previo de los cortes durante 10 minutos, antes de ser expuestas al xilol o extendiendo el tiempo de tratamiento con xilol.

### 2. *Acción de la peroxidasa endógena*

Ver el bloqueo de su actividad.

### 3. *Inmunoglobulinas no específicas*

La presencia de inmunoglobulinas no específicas en los antisueños puede eliminarse mediante tratamiento de los mismos con macerados de tejidos obtenibles comercialmente (por ej.: polvo de hígado de ratón). La incubación del antisuero con el macerado de tejido en proporción de 1 ml. de antisuero por 1 mg. de tejido durante 24 horas a 4°C y seguida de centrifugación (centrífuga Eppendorf) son suficiente para eliminar el problema.

### 4. *Anticuerpos de especificidad no deseada*

La presencia de anticuerpos de especificidad no deseada en un antisuero puede ser eliminada mediante adsorción de los mismos con antígenos específicos. El empleo de anticuerpos monoclonales (obtenidos de hibridomas), asegura totalmente la monoespecificidad de un antisuero, eliminando este tipo de problema.

### 5. *Actividad del complemento*

Los antisueños primarios utilizados en el método de PAP deben ser inactivados en su actividad de complemento durante 30 minutos a 56°C previa realización del método de PAP.

PRECAUCIONES AL TRABAJAR CON LOS METODOS DE INMUNOPEROXIDASA

Algunos de los reactivos utilizados en estas pruebas pueden ser tóxicos y por lo tanto se recomienda observar ciertas precauciones en su manipulación.

La 3.3'-diaminobenzidina (DAB), si se inhala o absorbe a través de la piel puede causar irritación severa; sus vapores producen irritación intensa en los ojos; por consiguiente debe manipularse en cámaras especiales con sistema de extracción y ventilación adecuadas, además del empleo de lentes protectores, máscaras faciales y guantes de vinilo o caucho. Aún cuando no se ha podido probar su actividad carcinogénica en ratas controles, este factor no puede ser descartado (63). Se sugiere que todo el material contaminado con DAB se sumerja durante 6 horas en una solución de 1:1 (agua y clorox), pues aparentemente el cloro inactiva la sustancia.

El peróxido de hidrógeno al 30% es un oxidante fuerte y deben tomarse precauciones para evitar el contacto con la piel.

BIBLIOGRAFIA

1. Harris T J, Mihm MC: Cutaneous immunopathology. The diagnostic use of direct and indirect immunofluorescence techniques in dermatologic disease. *Hum. Pathol* 1979; 10: 625.
2. Spargo BH, Seymour AE, Ordoñez NG. Renal Biopsy Pathology, with diagnostic and therapeutic implications. John Wiley and sons publications. I Ed. New York, 1980.
3. Huang SN: Immunohistochemical demonstration of Hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab. Invest.* 1975; 33: 88.
4. Herberman RB: Immunological tests in the diagnosis of cancer. *Am J Clin Pathol.* 1977; 68: 688.
5. DeLellis RA. Diagnostic immunohistochemistry. Masson Publishing, USA. Inc. I Ed. New York, 1981.
6. Taylor CR: Immunoperoxidase techniques. Practical and Theoretical aspects. *Arch Pathol Lab. Med.* 1978; 102: 113.
7. Taylor CR.: Immunocytochemical methods in the study of lymphoma and related conditions. *J Histochem Cytochem.* 1978; 26: 496.

8. Sternberger LA.: Immunocytochemistry. Secod Ed. John Wiley, New York, 1979.
9. Escovar G.: Localización inmunocitoquímica de la hormona gonadotropina coriónica en la placenta humana y en células tumorales. Aceptado para publicación en la *Revista Biomédica.* 1982; 2: No. 2.
10. Nakane PK, Pierce GB.: Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 1966; 14: 929.
11. Nakane PK.: Simultaneous localization of multiple tissue antigens utilizing the peroxidase-labeled antibody method: A study on pituitary glands of the rat. *J. Histochem Cytochem.* 1968; 16: 557.
12. Mason TE, Phifer RF, Spicer SS, Swallow Ra and Dreskin RB.: An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J Histochem Cytochem.* 1969; 17: 563.
13. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in the identification of spherocytetes. *J Histochem Cytochem.* 1970; 18: 315.
14. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S.: The use of avidin biotin interaction in immunoenzymatic techniques *J Histochem Cytochem.* 1979; 27: 1131.
15. Warnke R, Levy R.: Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: A biotin-avidin horseradish peroxidase method *J Histochem Cytochem.* 1980; 28: 771.
16. Petralli JP, Hinton DM, Moriarty GG, Sternberger LA.: The unlabeled antibody enzyme method of immunocytochemistry. Quantitative comparison of sensitivities with and without peroxidase-antiperoxidase complex (PAP) *J Histochem Cytochem.* 1974; 22: 782.
17. Sternberger NH, Itoyama Y, Kies MW, Webster H de F.: Immunocytochemical method to identify basic protein in myelin-forming oligodendrocytes of newborn rat CNS. *J Neurocytol.* 1978; 7: 251.
18. Linder E, Miettinen A.: Prozone effects in indirect immunofluorescence. *Scand. J Immunol.* 1976; 5: 514.
19. Streefkerk JG.: Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxidase following methanol. *J Histochem Cytochem.* 1972; 20: 829.
20. Bigbee JW, Kosek JC, Eng LF.: Effects of primary antiserum dilution of antigen rich tissues with the peroxidase anti-peroxidase techniques *J Histochem Cytochem.* 1977 25: 443.
21. Sun JS, French SW.: Peroxidase antiperoxidase complex. Binding by Mallory bodies in unfixed tissues. *Arch Pathol lab. Med.* 1976; 100: 550.
22. DeLellis RA. Basic techniques of immunohistochemistry. in: I Ed. New York, 1981.

GENARINA ESCOVAR V., HENRY HANSEN V., GONZALO URIBE BOTERO

23. Uribe BG, Escovar G.: Ultraestructura de las células de la Adenohipófisis humana. Aceptado para publicación en la Revista Antioquia Médica, Medellín, septiembre 30, 1981.
24. Nakane PK.: Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem* 1970; 18: 9.
25. Escovar G, Hanssen H, Uribe G.: Estudio Inmunoquímico de las hormonas de la Adenohipófisis humana. I. Hormona del Crecimiento. *Acta Médica Col.* 1981; 6: 257.
26. Escovar G, Hanssen H, Uribe G.: Estudio Inmunoquímico de las Hormonas de la adenohipófisis humana. II. Hormona Prolactina. Aceptado para publicación. *Acta Médica Col.* marzo de 1982.
27. Escovar G, Uribe BG, Corredor D.: Localización Inmunoquímica del Polipéptido Pancreático Humano por microscopia de luz y electrónica *Acta Médica Col.* 1982; 7: 61.
28. Arnold R, Deuticke V, Freirichs H, Creutzfeldt W.: Immunohistological investigations of human insulinomas. *Diabetología.* 1972; 8: 250.
29. Creutzfeldt W, Arnold R, Creutzfeldt C, Track NS.: Pathomorphologic biochemical and diagnostic aspects of gastrinomas (Zollinger Ellison Syndrome). *Hum. Pathol.* 1975; 6: 47.
30. DeLellis Ra, Gagel RF, Kaplan MM, Curtis LE.: Gastrinoma of duodenal G cell origin. *Cancer.* 1976; 38: 201.
31. Gagel RF, Constanza ME, DeLellis RA, Norton RA, Boom SR, Miller HH, et al: Plasma vasoactive intestinal peptide and tumor response in streptozotocin treated Verner-Morrison syndrome. *Arch Inst. Med.* 1976; 136: 1429.
32. Ordoñez NG, Ayala AG, von Eschenbach AC, Mackay B, Hanssen G.: Immunoperoxidase localization of prostatic acid phosphatase in prostatic carcinoma with sarcomatoid changes. *Urology.* 1982; 19: (2) 210.
33. Wolfe HJ, Palmer PE, Alpha-1-antitrypsin: its Immunohistochemical localization and significance in diagnostic pathology. In: DeLellis, RA *Diagnostic Immunohistochemistry.* Masson Publishing, Inc. I. Ed. N.Y. 1981; 227-238.
34. Kurman RJ, Scardino PT, McIntire KR, Waldman TA, Javadpour N.: Cellular Localization of alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in germ cell tumors of the testis using and immunoperoxidase technique A new approach to classification utilizing tumors markers. *Cancer.* 1977; 40: 2136.
35. Mwas C, Kohen M, Lemerle J, et al: Serum alpha-fetoprotein (Fetuin) in children with malignant ovarian or testicular teratomas. Preliminary results. *Int. J Cancer.* 1969; 4: 76.
36. Walker RA.: The demonstration of alpha-lactalbumin in human breast carcinoma. *J. Pathology.* 1979; 129: 37.
37. Clayton FC, Ordoñez NG, Hanssen G, Hanssen H.: Immunoperoxidase localization of Lactalbumin in Breast Neoplasms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1982; 106: 268.
38. Clayton FC, Sibley RK, Ordoñez NG, Hanssen G.: Argyrophilic Breast Carcinomas. Evidence of lactational Differentiation. Has been accepted for publication in: *The American Journal of Surgical Pathology.* Sept. 1981.
39. Mendelsohn J, Eggleston JA, Weisburger WR, Grann DS, Baylin SB.: Calcitonin and histaminase in C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma, a light microscopic and immunohistochemical study. *Am. J. Pathol.* 1978; 92: 35.
40. DeLellis RA, May L, Tashjian AH Jr, Wolfe HJ.: C-cell granule heterogeneity in man. An Ultrastructural immunocytochemical study. *Lab. Invest.* 1978; 38: 263.
41. Wolfe HJ, Melvin KEW, Cerci-Skinner SJ, Al Saadi, AA, Juliar JF, Jackson CE, Tashjian AH. Jr.: C-cell hiperplasia preceding medullary thyroid carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1973; 289: 437.
42. Goldenberg DM, Sharkey RM, Primus FJ.: Immunocytochemical detection of carcinoembryonic antigen in conventional histopathology specimes. *Cancer.* 1978; 43: 1546.
43. Primus FJ, Sharkey RM, Hanssen HJ, Goldenberg DM.: Immunoperoxidase detection of carcinoembryonic antigen An Overview. *Cancer.* 1978; 42: 1540.
44. VanNagell JR, Donaldson ES, Gay EC, Hudson S, Sharkey RM, Primus FJ, Powell DF, Coldenberg DM.: Carcinoembryonic antigen in carcinoma of the uterine cervix. 2. Tissue localization and correlation with plasma antigen concentration. *Cancer.* 1979; 44: 944.
45. Perkin E, Engeler JE. Jr. Edson M, et al: The value of serial measurement of both human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein for monitoring germinal cell tumors. *Cancer.* 1976; 37: 215.
46. Nochomovitz LE, Lange PH, Fraley EE, Rosai J.: Testicular seminoma with human chorionic gonadotropin (HCG) reproduction: A study of 16 cases with special reference to anaplastic seminoma. *Lab. Invest.* 1980; 42: 140.
47. Yorde DE, Husa RO, Garancis JC, et al.: Immunocytochemical localization of human choriogonadotropin in human malignant trophoblast. Model for human Choriogonadotropin Secretion. *Lab. Invest.* 1979; 40: (3) 391.
48. Nadji M, González MS, Castro A, Morales AR.: Factor VIII- Related antigen: An endothelial cell marker. *Lab. Invest.* 1980; 42: 139 (Abstract).
49. Banks PM, Keller RH, Ki C-Y, White WL.: Malignant lymphoma of plasmablastic identity. A neoplasm with both "immunoblastic" an plasmacellular features. *Am J Med.* 1978; 64: 906.

## TECNICAS DE INMUNO-PEROXIDASA EN LA DETECCION DE MARCADORES....

50. Pangalis GA, Rappaport H.: Common clonal origin of lymphoplasmacytic proliferation and immunoblastic lymphoma in intestinal alpha chain disease. *Lancet*. 1977; 2: 880.
51. Taylor CR, Russell R, Chandor S.: An immunohistologic study of multiple myeloma and related conditions using a immunoperoxidase method. *Am J. Clin. Pathol.* 1978. 70: 612.
52. Taylor CR, Burns J.: The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin containing cells in formalin-fixedparaffin-embedded tissues using peroxidase labelled antibody. *J. Clin. Pathol.* 1974; 27: 14.
53. Filippa DA, Lieberman PH, Erlandson RA, Koziner B, Siegal FP, et al.: A study of malignant lymphomas using light and ultramicroscopic cytochemical and immunologic technics: Correlation with clinical features. *Am J. Med.* 1978; 64: 259.
54. Masson DY, Taylor CR.: The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. *J. Clin. Pathol.* 1975; 28: 124.
55. Mukai K, Rosai J, Hallaway BE.: Localization of myoglobin in normal and neoplastic skeletal muscles cells using an immunoperoxidase method. *Am J. Surg. Pathol.* 1979; 3: 373.
56. Horne CHW, Bremmer RD.: Pregnancy proteins as tumors markers. In *Cancer Markers, Diagnostic and Developmental Significance*. S. Sell, Ed. Humana Press, N.J., 1980.
57. Taylor CR, Kurman RJ, Warner NE.: The potential value of immunohistochemical techniques in the classification of ovarian and testicular tumors. *Hum. Pathol.* 1978; 9: 417.
58. Kase N.: Steroid synthesis in abnormal ovaries. II. Granulosa cell tumor *Am J. Obstet Gynecol.* 1964; 90: 1262.
59. Dralle H, Bocker W.: Immunohistochemical and electron microscopic analysis of adenomas of the Thyroid Gland. *Virchows Arch Pathol Anat.* 1977; 374: 285.
60. Theodoropoulos G, Nakopoulou K, Repanti M, et al.: Detection of hepatitis B surface antigen in fixed tissues of patients with cirrhosis and hepatoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Hist.* 1979; 382: 293.
61. Ray MB, Desmet VJ, Bradburne Af, Desmyter J, Fevery J, et al.: Differential distribution of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in liver of hepatitis B patients. *Gastroenterology.* 1976; 71: 462.
62. Kurchak M, Dubbs DR, and Kit S.: Detection of herpes simplex virus related antigens in the nuclei and cytoplasm of biochemically transformed cells with peroxidase anti-peroxidase immunological staining and indirect immunofluorescence. *Int. J. Cancer.* 1977; 20: 371.
63. Griswold DP, Gasey AE, Weisburger EK, Weisburger JH.: The carcinogenicity of Multiple Intra gastric Doses of Aromatic and Heterocyclic Nitro or Amino Derivate in young female Sprague Dawley rats. *Cancer Res.* 1968. 28: 924.

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

1. Biomédica la revista del Instituto Nacional de Salud recibirá para publicación únicamente artículos originales e inéditos.
2. La revista aceptará artículos que contribuyan a ampliar los conocimientos sobre biomedicina realizadas, tanto en el Instituto Nacional de Salud como en cualquier otro centro investigativo.

Dichos artículos deberán llenar los siguientes requisitos:

- a) Ser enviados al editor de la revista, Apartados 80334 y 80080, Zona 6, Bogotá, D.E., Colombia S.A.
- b) Ser escritos a máquina, a doble espacio, en original y una copia, dejando márgenes de 4 cms. a la izquierda y 2 cms. a la derecha. El original en papel blanco, grueso, tamaño carta.
- c) Ser escritos en español con resúmenes en español e inglés.
- d) Tener un título conciso. Podrán tener, si fuere necesario, un subtítulo explicativo.
- e) Llevar los nombres del autor o los autores inmediatamente después, indicando con asteriscos, en el pie de página, su título académico y la institución en la cual se realizó el trabajo.
- f) Incluir en el texto del trabajo: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones y Referencias Bibliográficas.
- g) Las citas bibliográficas se harán en el texto en forma consecutiva, utilizando números arábigos y deberán aparecer, en el mismo orden numérico de citación. La referencia se presenta así: apellido del autor, seguido de las iniciales de su nombre, título del artículo, nombre abreviado de la revista, año de publicación, volumen, número y página. Ejemplo: Barrow CH. Criptococcosis in animals. J.A. M.A. 1955, 127: 125.

Para la citación de libros se seguirá un orden similar, así: Pearse A., *Textbook of Biochemistry*. Saunders Edt., 1979; pp 49-50.

- h) Los cuadros, gráficas y figuras deben numerarse en forma consecutiva con números arábigos y ser presentados en papel fotográfico brillante, en blanco y negro, manteniendo individualmente una proporción de 2 x 3. Dicho material debe ser de calidad y presentación impecables. En hoja aparte se incluirá la leyenda respectiva.
3. La revista también aceptará para publicación: actualizaciones, memorando, revisiones, comunicaciones breves, cartas al editor, revisión de resúmenes e informes técnicos.
  4. Todo material propuesto para publicación será revisado por el Comité Editorial. El Editor informará a los autores, tanto sobre la recepción de los trabajos, como sobre la decisión final que se tome.
  5. La revista se reservará el derecho de aceptar o rechazar los artículos y podrá hacer sugerencias que tiendan a mejorar su presentación. Para un mejor cumplimiento de esta función el Comité Editorial podrá consultar a especialistas en la materia.
  6. Los originales de los artículos publicados permanecerán en los archivos de la revista; aquellos no aceptados para publicación, serán devueltos a sus autores.
  7. El autor principal recibirá libre de costo 5 ejemplares de la revista. Los reimpresos deberán ser sufragados por el autor.

NOTA: Las personas interesadas en adquirir la revista podrán hacerlo en la biblioteca del Instituto Nacional de Salud, a un costo de ciento veinticinco pesos m/cte. (\$ 125.00) cada ejemplar, o tomando una suscripción anual.