

## TÉCNICAS

Centro Nacional de Genética Médica  
Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana

# EXPERIENCIAS TÉCNICAS EN EL USO DE LA PRUEBA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE FRÁGIL X

*Dr. Roberto Lardoejt Ferrer y Dra. Araceli Lantigua Cruz*

## RESUMEN

Se evaluó un método inmunohistoquímico diseñado por *Willemsen* y otros en 1995, para detectar la presencia o ausencia de la proteína FMRP, involucrada en el síndrome de frágil X. Este proceder se fundamenta en una secuencia de reacciones antígeno-anticuerpo, que garantiza la inmunodetección de la proteína, que resulta fácil de realizar con un costo menor a las demás técnicas descritas para el diagnóstico de la afección. No obstante, se hizo una exhaustiva valoración de los posibles errores técnicos, partiendo de la experiencia acumulada durante el pesquiasaje inmunohistoquímico que se aplicó a 6 615 recién nacidos y a 658 individuos varones con retraso mental de etiología no precisada. Se expusieron algunas fotos para ilustrar los errores más frecuentes.

*Palabras clave:* Técnica inmunohistoquímica, síndrome de frágil X, antígeno, anticuerpo monoclonal, pesquiasaje.

El síndrome de frágil X (SFX) constituye la causa más frecuente de retraso mental (RM) ligado al sexo. Representa una de las primeras enfermedades neurogenéticas en las que se identificaron las expansiones trinucleotídicas (mutación dinámica) como mecanismo de herencia, dándose pasos agigantados en las estrategias diagnósticas para su prevención y diagnóstico temprano.<sup>1</sup>

Primero el diagnóstico de la enfermedad era eminentemente clínico atendiendo

a los síntomas y el patrón hereditario familiar peculiar. Luego con el hallazgo de un sitio de constricción en la región cromosómica Xq27.3 conocido con el nombre de sitio frágil FRAXA folato sensible, se avanzó en el estudio del síndrome.<sup>2</sup>

En el año 1991, la identificación, caracterización molecular del gen responsable de la enfermedad, FMR-1, y el descubrimiento de las bases moleculares del defecto genético, permitieron realizar técnicas moleculares

como el *southern blot* y *polymerase chain reaction* (PCR), tomando como muestra biológica el ADN para el diagnóstico directo de la enfermedad.<sup>3</sup>

En el año 1995, el Departamento de Genética de la Universidad de Erasmus, Rotterdam, Holanda, describió un método diagnóstico basado en la especificidad de los anticuerpos monoclonales (AcMs), para poner en evidencia la ausencia de la proteína FMRP en los linfocitos de sujetos varones afectados con la enfermedad: el estudio inmunohistoquímico (TIH) para el diagnóstico del SFX.<sup>4</sup>

Este método resulta barato, rápido y fácil, permitiendo hacer pesquisajes tanto en individuos aparentemente sanos como en subpoblaciones de riesgo: varones con RM de causa desconocida, autistas, así como pesquisajes en cascadas en familiares afectados por el síndrome.

El TIH constituye un instrumento mediador entre la evidencia clínica y la confirmación molecular directa de la mutación, el cual permite excluir de la caracterización molecular a los individuos que a pesar de tener criterios clínicos del síndrome expresan la proteína y por lo tanto, una función conservada del gen.

## FUNDAMENTACIÓN DE LA TÉCNICA

La fundamentación del proceder consiste en una secuencia de reacciones antígeno- anticuerpo (Ag-Ac), que garantizan detectar la presencia del producto proteico del gen FMR-1.

Un primer AcM<sup>1</sup> se une al antígeno (Ag), que en este caso es la proteína FMRP ubicado en el escaso citoplasma de los linfocitos, luego un segundo anticuerpo (Ac) pero biotinilado,<sup>2</sup> resultado del enlace covalente de la biotina con el Ac, reacciona con el primer Ac que a su vez es su Ag.

La elevada afinidad de la estreptavidina garantiza que se una al Ac biotinilado. Finalmente el cromógeno sustrato<sup>3</sup> reacciona con los 3 sitios de unión libres que presenta la estreptavidina a través de 3 moléculas de biotina, lográndose la amplificación de la señal que consiste en la inmunodetección de la proteína FMRP.<sup>5,6,7</sup>

En la figura 1 se muestra la secuencia de reacciones.

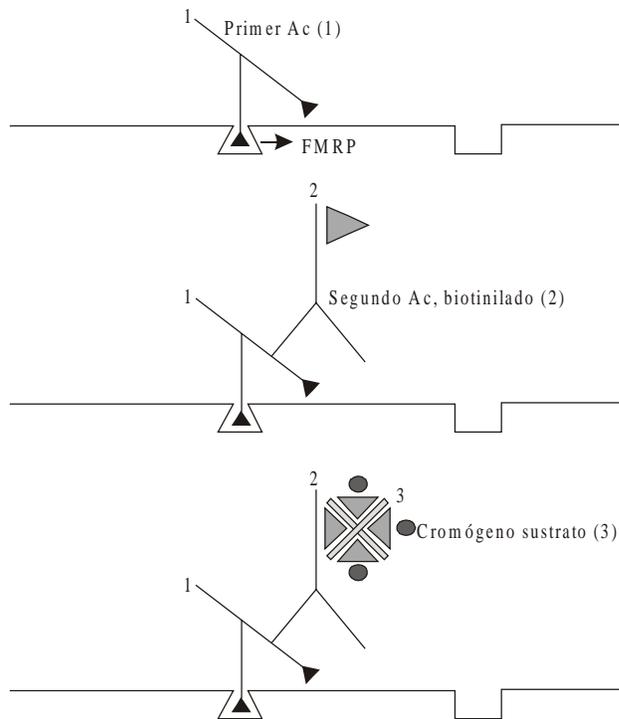
De esta manera se garantiza un método histoquímico que permite a través del color identificar la reacción Ag-Ac y por tanto, determinar la presencia o ausencia de la proteína, en el cual el núcleo del linfocito se tiñe de color rojo y el escaso citoplasma se tiñe de carmelita oscuro, apareciendo un halo que rodea a la célula cuando está presente la proteína (fig. 2).

## ERRORES TÉCNICOS QUE PUEDEN AFECTAR LOS RESULTADOS DEL TIH

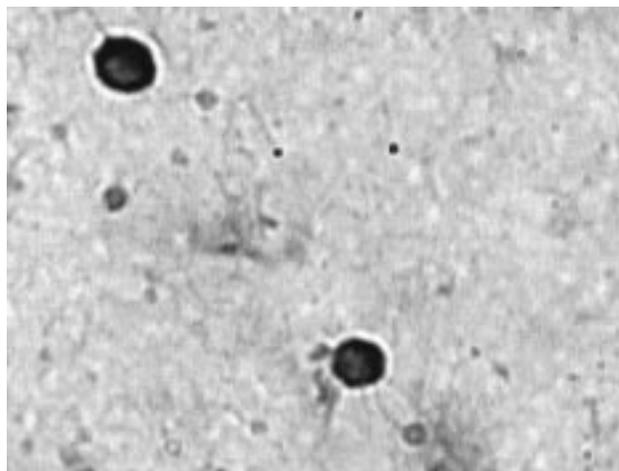
Durante el pesquisaje inmunohistoquímico en una muestra de neonatos aparentemente sanos, a partir de la obtención de la sangre del cordón umbilical y de varones con retraso mental de causa desconocida con el objetivo de detectar la ausencia de la proteína FMRP, se realizó una valoración de los posibles errores técnicos que pudieron estar relacionados con las diferentes etapas del proceder que van desde la obtención de la muestra hasta la preparación final de las láminas portaobjetos:

### 1. Obtención de la muestra.

En este paso es importante destacar que la extensión sanguínea en la lámina se puede realizar con la sangre venosa a través de la venopunción o con la sangre capilar a través de la dígito punción del pulpejo del tercer dedo, depositando una gota fina en el extremo esmerilado de la lámina.



**Fig. 1.** Fundamentación de la técnica inmunohistoquímica. Obsérvese el anticuerpo monoclonal (1) reaccionando con la proteína FMRP; el segundo anticuerpo biotinilado (2) reaccionando sobre el primero; el cromógeno sustrato actuando a través de 3 moléculas de biotina.



**Fig. 2.** Dos linfocitos humanos rodeados de un halo carmelita detectando la presencia de la proteína FMRP.

Se coloca otra lámina, extensora, con un ángulo de 45° con respecto a la primera lámina y se procede a realizar un movimiento rectilíneo uniforme para extender

la muestra sanguínea, quedando lista para su procesamiento técnico.

Uno de los principales errores que se deriva de este paso, es la presencia

insuficiente de linfocitos en la extensión que imposibilite un conteo de 100 células linfocitarias; debido a que la gota sea muy escasa e impida que la extensión sanguínea cubra toda la superficie de la lámina, porque al reducirse el área sanguínea a estudiar se incrementa la probabilidad de no poder realizar un conteo de 100 linfocitos como se requiere para hacer un diagnóstico certero.

Si la gota de sangre es muy gruesa, podría repercutir en un falso positivo por exceso de citoesqueleto, que constituye una barrera física para la reacción del AcM a la proteína FMRP, no visualizándose el halo carmelita como se muestra en la figura 3.

Es preciso señalar, además, la precaución en la angulación de la lámina extensora, porque aún con una gota de sangre adecuada podría limitarse la extensión sanguínea en toda la superficie de la lámina.

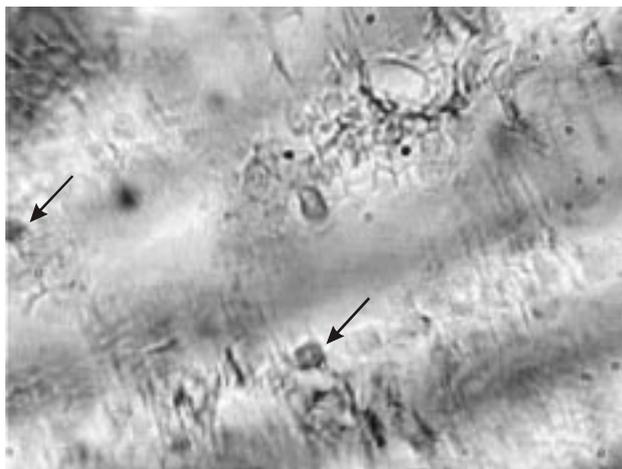
Si se realiza la extensión sanguínea con sangre capilar, se debe desechar la primera gota, y usar la segunda. No tomar en cuenta esta medida implica que se obtenga en una extensión sanguínea muchos linfocitos traumatizados por la punción. También se debe de cumplir con todas las medidas de asepsia y antisepsia.<sup>1</sup>

Además de la muestra sanguínea, se pueden usar las raíces pilosas del cuero cabelludo con propósitos diagnósticos, pero existen diferencias circunstanciales como son:

- Las raíces pilosas pueden ser obtenidas de forma simple y sin apreciable daño para el paciente, el cual tiene considerables ventajas en la toma de muestras en pacientes mentalmente afectados.
- El sangramiento posterior y las infecciones, que son complicaciones en las extracciones sanguíneas, se evitarían.
- No es necesario entrenar personal médico y paramédico para la toma de muestra.
- Grandes cantidades de folículos pilosos de un gran número de individuos pueden ser enviados por correo ordinario hacia los laboratorios de diagnóstico y ser analizados ese mismo día.

2. Fijación con paraformaldehído 3 % y permeabilización con metanol 100 %

Se montan 2 láminas con caras invertidas y se sumergen en una solución de paraformaldehído por espacio de 10 min. Para este primer paso es importante el



**Fig. 3.** Exceso de citoesqueleto producido por una extensión sanguínea muy gruesa. Obsérvese el exceso de detritus celulares que impiden la observación de los linfocitos señalados con la flecha.

pesaje correcto de los reactivos hidrógeno fosfato de sodio monohidratado, hidrógeno fosfato de sodio dihidratado, y paraformaldehído; así como lograr un pH de 7,3 para que la solución cumpla su función.

El objetivo de este paso es evitar la descomposición estructural, impedir la difusión de componentes solubles y fortalecer el tejido. En el TIH, este paso garantiza la eliminación de los glóbulos rojos y otros elementos formes de la sangre, fijando las células linfocitarias, preservando su antigenicidad, seguido de la permeabilización celular con metanol 100 % por 20 min a temperatura ambiente, para lograr el paso de los distintos Acs a través de la membrana celular.

La preservación de la antigenicidad con esta solución es probablemente el factor más importante para el éxito en las TIHs.

Entre los procedimientos usados para este fin se encuentran la fijación con solventes orgánicos como metanol, acetona, en los cuales algunos Acs son removidos; la permeabilización con detergentes no iónicos como el Tritón X-100, usados en estudios del citoesqueleto; la fijación con formaldehído, que constituye el mejor fijador en las TIHs (Tijssen P. Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and Theory of enzyme immunoassays. 1997).<sup>8,9</sup>

#### *Procedimiento de lavados durante la técnica*

Durante el proceder se realizan varios lavados, específicamente con PBS 0,1 M después de la fijación y permeabilización linfocitaria y aplicación de la enzima conjugada; con el PBS+ , después del bloqueo de la peroxidasa endógena, la inmunoincubación con el primer Ac, el Ac biotinilado , y después de la aplicación de la enzima conjugada; y por último, con agua

destilada, después de añadir el cromógeno sustrato.

Estos lavados tienen la función de ir eliminando sustancias o partículas no deseadas que puedan interferir con la calidad del estudio.

#### 3. Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena.

Una vez que se elimina el metanol con PBS 0,1 M durante 5 min se procede a abolir la actividad de la peroxidasa endógena, para que la peroxidasa que se usa como cromógeno sustrato sea la única responsable de darle la coloración carmelita al citoplasma cuando este presente la proteína.

Para ello se debe preparar el PBS bloqueador usando 500 mL de PBS 0,1 M, 12 mL de peróxido de hidrógeno 30 % y 5 mL de ácido zódico 12,5 %.

El no bloqueo de la peroxidasa endógena pudiera ser la causa de falsos negativos, es decir, un individuo con la afección que tenga un conteo de linfocitos marcados dentro de los límites normales.

*Willemsen* y otros, además de usar la peroxidasa, utilizaron la fosfatasa alcalina incubando las láminas con el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina biotinilada por 45 min. En esta situación para bloquear la actividad de la fosfatasa alcalina endógena se le añadió levamisol a la solución sustrato.<sup>4,5-7</sup>

#### 4. Etapas de la inmunoincubación.

La primera inmunoincubación se realiza con un AcM de ratón contra la proteína FMRP (T1A DAKO). Para ello se prepara el AcM en una solución de PBS+ según la cantidad de láminas que se procesen, teniendo en cuenta que por cada 1 000  $\mu$ L de dilución de PBS+ , se debe usar 1  $\mu$ L de Ac. El envejecimiento del Ac puede ser

un factor que impide la formación del halo carmelita, por la pérdida de su especificidad contra la proteína que reconoce.<sup>1,4</sup>

La segunda inmunoincubación se realiza con una inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugada con biotina. Para lograr este paso, se deben depositar 2 gotas de Ac biotinilado (LSAB 2 Link-Biotin) a las láminas, colocando el cubreobjeto durante 10 min a temperatura ambiente.

La tercera inmunoincubación se realiza con la enzima conjugada que consiste en un complejo estreptavidina-peroxidasa biotinilada. Si esta última etapa no ocurre, se bloquea la cascada de reacciones Ag-Ac, no visualizándose el halo carmelita.

Por último, se añaden 100 µL de cromógeno sustrato por lámina durante 40 a 45 min, garantizando el coloreado del citoplasma. Si no se aplica esta sustancia, no aparece la coloración, aun con el cumplimiento de los pasos anteriores. Si por el contrario se añade una sobredosis de cromógeno se incrementa el coloreado de fondo, no permitiendo distinguir el núcleo coloreado de rojo por el *nuclear fast read*, del citoplasma carmelita (fig. 4).

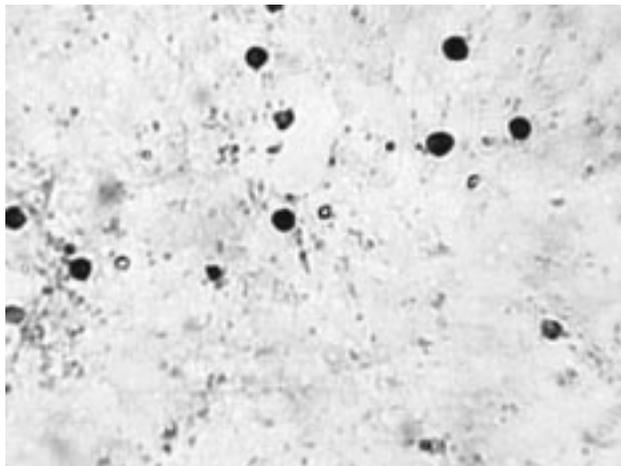
5. Aplicación del *nuclear fast read* y proceso de deshidratación.

El núcleo debe colorearse para permitir la distinción del resto de los elementos formes de la sangre y a su vez visualizar el halo carmelita cuando está presente la proteína FMRP. Se tiñe de azul con el *nuclear fast blue* o de rojo con el *nuclear fast read*. La ausencia de este colorante puede afectar la identificación de la célula linfocitaria así como la distinción del escaso citoplasma carmelita.

Luego las láminas deben procesarse con alcohol etílico que se encuentra en diferentes concentraciones: 70, 80, 90 y 100 %, manteniéndolas 1 min en cada frasco y 2 veces en etanol 100 %. Finalmente se aplica xilol por 1 min.

6. Aplicación del entellán.

Una vez que se escurre el exceso de xilol, se depositan 2 gotas de entellán sobre un cubreobjeto, dejándolo caer sobre la lámina procesada para evitar la formación de vacuolas de aire. Este paso tiene como objetivo fijar la preparación y permitir su



**Fig. 4.** Lámina con exceso de cromógeno sustrato. Nótese que no se identifica el halo y la célula se observa con un color homogéneo.

conservación, durabilidad y visualidad, teniendo la precaución de que al aplicarse el cubreobjeto no queden burbujas de aire que puedan interferir la visualización de los linfocitos.<sup>4</sup>

Una vez concluido el TIH, se procede al análisis microscópico de la lámina para el cual se observa la reacción Ag-Ac en 100 linfocitos, esto evidencia la presencia o

ausencia del halo carmelita citoplasmático. La presencia de coloración en más de 50 linfocitos excluye al hemiciigótico SFX.

Se concluyó que el estricto cumplimiento de los pasos del TIH, así como evitar los posibles errores que se pueden obtener durante su realización, garantizarían de este proceder un método diagnóstico eficaz para la detección del SFX.

## SUMMARY

An immunohistochemical method designed by *Willemsen* and col. in 1995 was evaluated to detect the presence or absence of FMRP protein involved in the fragile X syndrome. This procedure is based on the sequence of antigen-antibody reactions that guarantee the immunodetection of protein, which is easy to carry out at a cost lower than that of the other techniques described for diagnosing the affection. However, it was made an exhaustive assessment of the possible technical errors, starting from the experience accumulated during the immunohistochemical screening that was applied to 6 615 newborns and 658 males with mental retardation of unprecised etiology. Some photos were shown to illustrate the most frequent mistakes.

*Key words:* Immunohistochemical technique, fragile X syndrome; antigen, monoclonal antibody, screening.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mandel JL, Biancalana V. Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Horm IGF Res* 2004;14:158-65.
2. Oostra BA, Willems PJ. A Fragile gene. *Broessays* 1995;17:941-7.
3. Pandey UB, Phadke SR, Mittal B. Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile x mental retardation. *Neurol India* 2004;52:36-42.
4. Willemsen R, Oostra BA. FMRP detection assay for the diagnosis of the Fragile X Syndrome. *Am J Med Genet.* 2000;97(3):183-8.
5. Willemsen R, Smits A, Mohkamsing S. Rapid antibody test for diagnosing Fragile X Syndrome: a validation of the technique. *Hum Genet* 1997;308-11.
6. Willemsen R. Postnatal diagnosis using blood. URL disponible en: <http://www.eur.nl/fgg/ch1/fragx/blood>. (Revisado 16 junio 2004).
7. Willemsen R, Los F, Mohkamsing S, Galjaard H, Oostra B, et al. Rapid antibody test for prenatal diagnosis of Fragile X Syndrome on amniotic fluid cells: a new appraisal. *I Med Genet* 1997;34:250-1.
8. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formaline tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am I Surg Pathol* 2000;24(7):1016-9.
9. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* 2001;49(8):931-7.

Recibido: 6 de agosto de 2004. Aprobado: 8 de septiembre de 2004.

Dr. *Roberto Lardoeyt Ferrer*. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146. Esq. a 31. Reparto Cubanacán, municipio Playa. Teléfono:208 9991-97