

DETECCION INMUNOHISTOQUIMICA (IHQ) DE MARCADORES TUMORALES (MT)

ANTONIO PALACIN FORGUE

Profesor Titular de Anatomía Patológica - Facultad
de Medicina - Universidad Barcelona - HCP Servicio
Anatomía Patológica Hospital Central Alianza

DESARROLLO DE LAS TECNICAS IHQ

La caracterización morfológica de las neoplasias por parte del anatomopatólogo, como intento de establecer un "marcador" que nos permitiese identificar y tipificar la transformación neoplásica maligna, mediante el estudio de cortes tisulares o de células aisladas, se ha visto potenciada por la aportación de datos objetivables obtenidos gracias a la aplicación de técnicas histoquímicas de alta afinidad y especificidad.

Estas técnicas se basan en el establecimiento de uniones altamente específicas y afines entre dos moléculas bien definidas desde el punto de vista bioquímico, con el único propósito de identificar y localizar en el seno de los tejidos y de las células la presencia y distribución de determinados componentes bioquímicos (6,55). De entre ellas las más importantes serían aquellas que se basan en la alta especificidad y afinidad demostrada por el anticuerpo frente al antígeno correspondiente.

Este principio fue utilizado por COONS y cols. (13) en 1942 para detectar antígenos pneumocócicos en tejidos mediante el concurso de un anticuerpo específico. Para que éste fuese visible al microscopio lo marcó previamente con un fluorocromo (Fluoresceína). Así se iniciaba una nueva tecnología que a pesar de brindar enormes posibilidades de estudio, quedó restringida a la investigación de parcelas muy concretas de la Anatomía Patológica como puede ser la patología glomerular renal, en las que demostró la transcendental importancia de este procedimiento diagnóstico.

No sería hasta un cuarto de siglo más tarde cuando gracias a las decisivas aportaciones de GRAHAM y KARNOVSKY (1966) (46), de NAKANE y PIERCE (1966) (51), de ABRAMEAS y URIEL (1966) (2) y de MASON (1969) (42), cuando STERNBERGER (1970) (64) pudo desarrollar su célebre mé-

todo PAP de la peroxidasa antiperoxidasa. Procedimiento que ha supuesto una masiva generalización de la utilización de las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) en los laboratorios de Anatomía Patológica (18, 19, 50).

Más recientemente GUESDON y cols. (1979) (20) y HSU (1981) (26, 27) han introducido la técnica de la Avidina-Biotina como alternativa al método PAP, basándose en la alta especificidad y afinidad demostrada por la Avidina o la Estreptavidina por la Biotina (Tabla I). Los procedimientos inmunocoloidales, (HOLGATE, 1983) (24, 25, 41) en los que se utiliza un coloide metálico de oro o plata como identificador microscópico al final de la cadena de uniones Antig-Antic o de Avi-Bio, representarían los más recientes perfeccionamientos de estas técnicas.

También otra posibilidad de explorar las modificaciones expresadas por las células neoplásicas a nivel de los glicoconjugados celulares es la utilización de Lectinas específicas para grupos oligosacáridos integrantes de las cadenas glicídicas de las glicoproteínas y de los glicolípidos (1, 7, 9, 61). También cabe la posibilidad de detectar la presencia de receptores hormonales y su variabilidad.

CAMPO DE APLICACIONES DE LAS TECNICAS IHQ

El campo de aplicación de las técnicas IHQ comprende tres aspectos fundamentales: a) Detección de la expresión fenotípica celular como intento de caracterización celular tanto en las fases de desarrollo embrionario y fetal como en el seno de tejidos y células en estados de normalidad o patológicos (Fig. 1). b) Identificación de sustancias que intervienen en las reacciones de hipersensibilidad como pueden ser Igs, fracciones del complemento, fibrinógeno, etc.; y

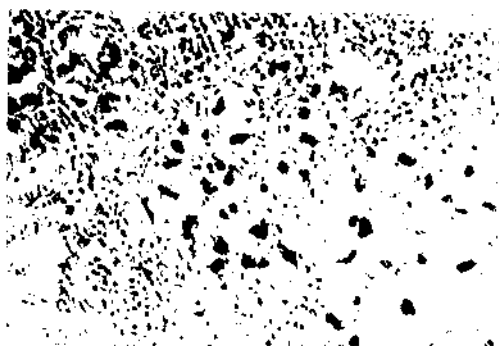


Figura 1.
Mucosa de antro gástrico. Identificación de células secretoras de gastrina. Antisuero frente a gastrina, DAKO A568, 1:200; AVI-BIO:PR/DAB/H.

c) Identificación de agentes biológicos causantes de procesos patológicos tales como: protozoos, clamidias, virus, etc. (54) (Fig. 2 y Tabla II).

El concepto de "marcadores tumorales", ("MT") al englobar aquellas sustancias producidas y contenidas en las células tumorales, y liberadas a los fluidos intersticiales, siendo más o menos específicas de aquellas, caería de lleno dentro del apartado de detección de la expresión fenotípica celular, pudiendo ser explorada por las técnicas IHQ.

Lo que genéricamente se conoce como

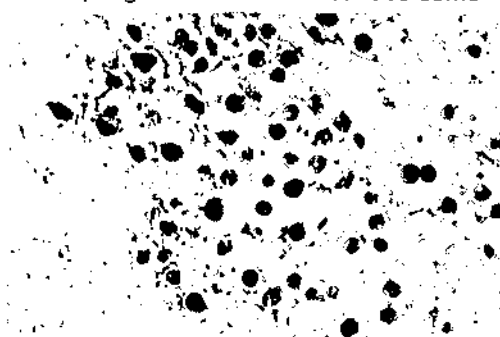


Figura 2.
Mucosa de colon en la que aparecen grupos de amebas teñidas selectivamente utilizando un suero antiamebas. Behring, 1:5, AVI-BIO:PR/DAB/H.

TABLA I

ESQUEMA GRAFICO DE LAS TECNICAS
IHQ MAS USUALES

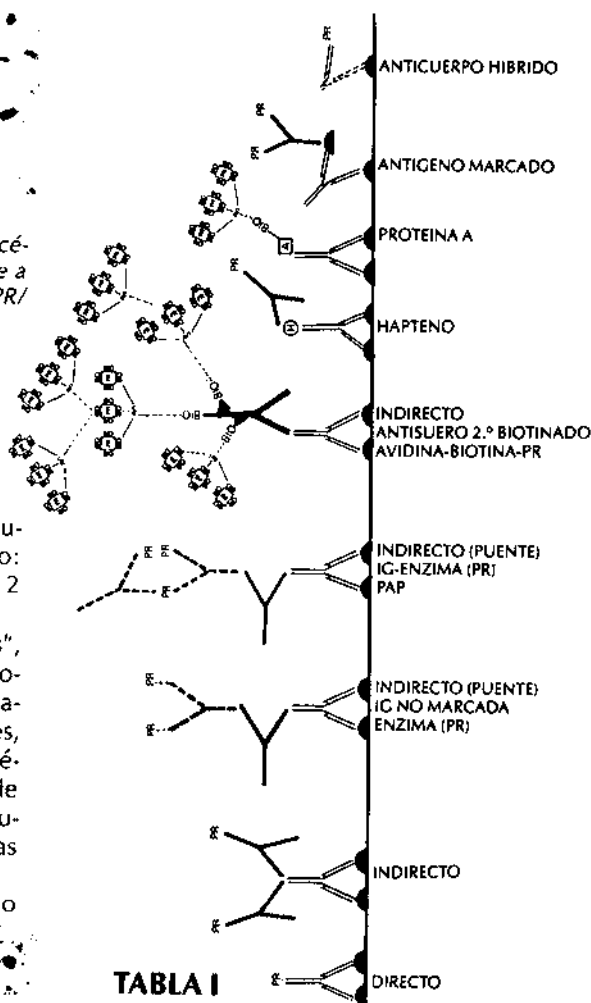


TABLA I

TABLA II

CAMPO DE APLICACION DE LAS TIHQ

- DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN FENOTÍPICA CELULAR
- IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS QUE INTERVIENEN EN LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD
- IDENTIFICACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS CAUSANTES DE PROCESOS PATOLÓGICOS

"marcadores tumorales" no son más que moléculas proteicas o no, presentes en las células tumorales, pero que también pueden identificarse en células normales en la vida postnatal o en alguna fase del desarrollo embrionario o fetal. Por consiguiente no son en absoluto exclusivas ni características del proceso neoplásico, si bien en éste sus cifras de producción son más elevadas y por ello sus valores en el suero del paciente se incrementan notoriamente, y de ahí su indudable valor clínico, especialmente en el seguimiento de pacientes neoplásicos.

Por estas consideraciones y desde el punto de vista IHQ, sería más preciso al referirnos a ellos denominarlos marcadores moleculares de la diferenciación y especialización celular, como manifestación de la expresión fenotípica celular.

La detección de una sustancia por métodos IHQ en células determinadas, no quiere significar necesariamente que sea producida por ella; puede haber sido incorporada a la célula por un proceso de endocitosis. Si no se tiene en cuenta esta posibilidad podemos caer en errores de interpretación.

Para asegurar que una sustancia determinada ubicada en el seno de una célula es producida por ella deberemos recurrir a otras técnicas como pueden ser la incorporación de precursores radioactivos *in vitro* o *in vivo*, la presencia de dicha sustancia en el medio de cultivo o bien la identificación del RNAm responsable de su síntesis, mediante técnicas de Hibridización DNAC-RNAm "in situ".

UTILIDAD CLINICA DE LA DETECCION IHQ DE MARCADORES TUMORALES

Aparte de la utilidad propiamente diagnóstica en el campo de la Anatomía Patológica, como lógica de la identificación de los "MT" en células y tejidos, ésta complementa los datos aportados por las técnicas Bioquímicas, las cuales no pueden establecer una relación precisa entre los niveles de "MT" determinados en el suero y su distribución en los diferentes clones celulares identificables en el tumor.

La contribución, que la determinación IHQ de los "MT" ha aportado, en un intento de proporcionar datos objetivos que nos permitan llegar a un diagnóstico más preciso los podemos resumir en cinco apartados

(22). (Tabla III):

TABLA III

UTILIDAD DE LA DETECCION IHQ DE MARCADORES TUMORALES

- IDENTIFICACION TUMOR PRIMARIO
- D.D. DE LESIONES MORFOLOGICAS SIMILARES O COMPLEJAS
- CLASIFICACIONES MORFOFUNCIONALES
- ORIENTACION PRONOSTICA
- PREDICCION DE MARCADORES TUMORALES

1) **Identificación de la localización primaria del tumor** cuando la primera expresión de éste es una metástasis de origen desconocido. Es el caso de las metástasis óseas o ganglionares del cancer de próstata como primer hallazgo. La demostración del antígeno prostático específico (APE) o de la fosfatasa ácida prostática (FAP) nos permiten asegurar que el tumor primario se ubica en la próstata (49). Es decir identificamos la estirpe celular pero no la condición de neoplasia maligna, la cual inferimos del hecho de encontramos ante una metástasis. Tanto el APE como la FAP se pueden detectar en epitelio prostático normal, hiperplásico o neoplásico (48). (Fig. 3).

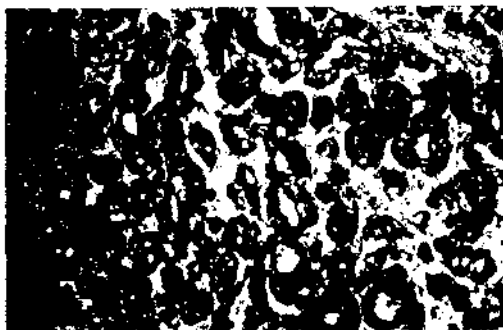


Figura 3.
Adenocarcinoma de próstata. Identificación del antígeno prostático específico. Antisuero frente a APE, DAKO A562, 1:1000, AVI-BIO:PR/DAB/H.

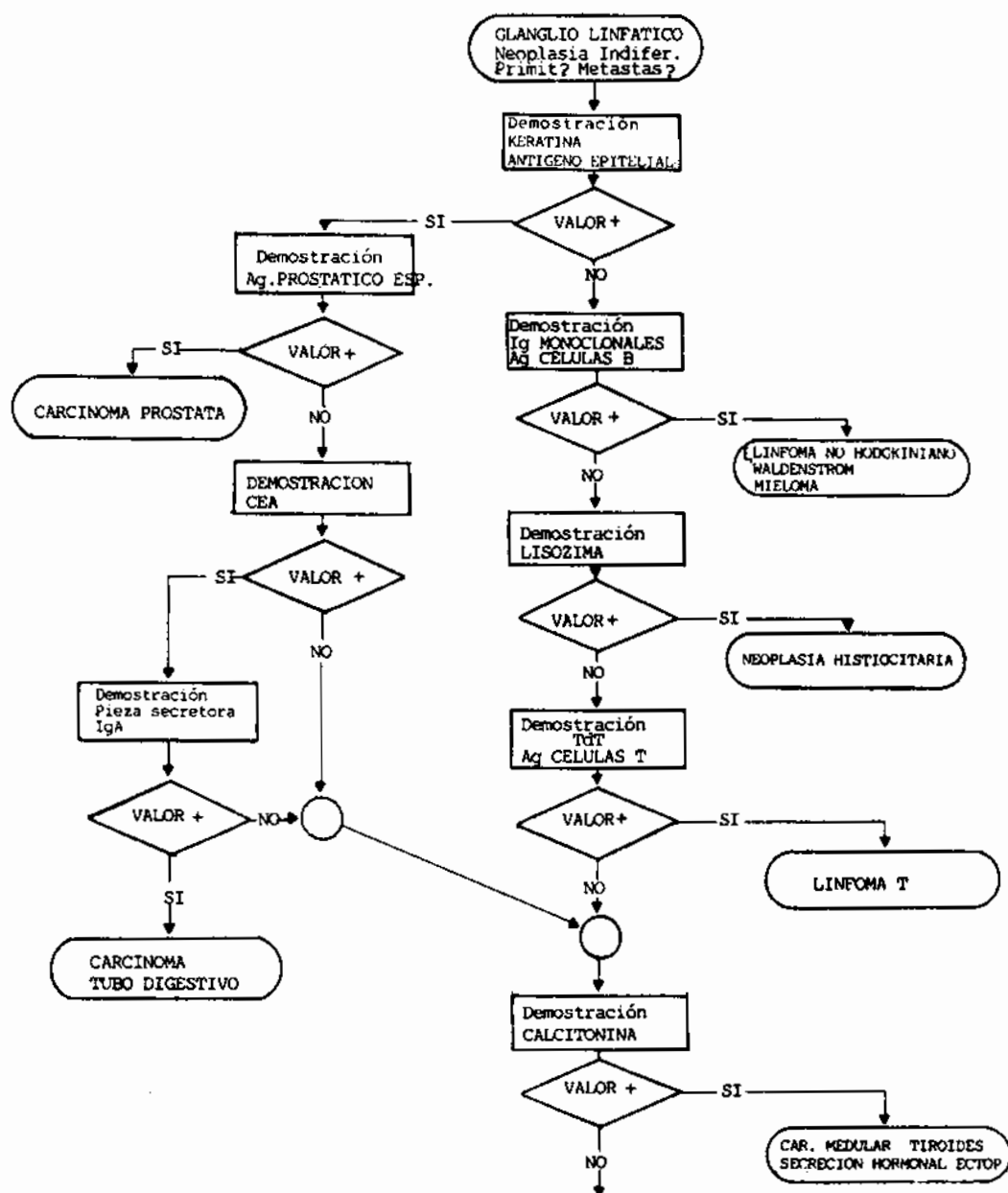


TABLA IV

**DIAGRAMA DEL ALGORITMO DE TIPIFICACION IHQ DE
UNA NEOPLASIA INDIFERENCIADA EN GANGLIO LINFATICO**

II) Diagnóstico diferencial de neoplasias morfológicamente similares. En aquellas neoplasias en las que los aspectos puramente morfológicos son insuficientes para filiar su histogénesis, las técnicas IHQ pueden aportar datos objetivos de expresión fenotípica que nos permiten superar las limitaciones de los marcadores morfológicos y tipificarlas adecuadamente.

Un ejemplo muy demostrativo podría ser el diagnóstico diferencial de un carcinoma indiferenciado gástrico frente a un linfoma primitivo de dicha localización. Agotados los estudios morfológicos sin podernos decantar hacia uno u otro diagnóstico nos cabe el recurso de indagar la posible manifestación de dos grupos antigénicos. Uno correspondiente a células epiteliales: antígeno de membrana epitelial (EMA) (62), antígeno polipeptídico tisular (TPA) (4,52) (Fig. 4) y queratinas de bajo peso molecular (40,45 y 52 KD = MOLL 19,18 y 8) (14,45) y el otro a células linfoides: antígeno común leucocitario (ACL). La positividad de uno u otro grupo nos llevará a un diagnóstico correcto.

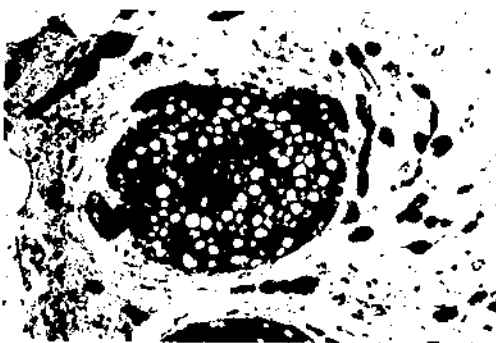


Figura 4.
Carcinoma lobulillar de mama. Identificación de células neoplásicas aisladas que infiltran el estroma. Antisúero frente a antígeno polipeptídico tisular. Santeg TPA:B1; AVI-BIO:PR/DAB/H.

Una situación similar se presenta cuando en un ganglio linfático se alberga una neoplasia indiferenciada. El establecer una pauta de investigación de diversos grupos antigénicos, siguiendo un algoritmo preestablecido nos va a permitir, descartando sucesivamente determinadas neoplasias, alcanzar el diagnóstico histogenético preciso en muchos casos. (Tabla IV).

Otro ejemplo puede ser el diagnóstico diferencial entre un adenocarcinoma de próstata y un carcinoma transicional de vejiga o bien con un adenocarcinoma de recto en determinadas situaciones (39).

III) Formulación de clasificaciones morfofuncionales. En estos casos la tipificación morfológica, a veces poco elocuente, se ve enriquecida por la aportación de datos que añaden una dimensión funcional. Es el caso de las neoplasias que asientan en órganos endocrinos y cuyo exponente más evidente sería la clasificación de los adenomas hipofisarios, no en cuanto a sus apetencias tóxicas sino en función a las hormonas que producen: HGH, PrLH, ACTH, FSH, etc. (15). (Fig. 5). La identificación de neoplasias con secreciones hormonales inadecuadas o ectópicas constituye otro ejemplo.

La clasificación inmunomorfológica de los linfomas no hodquiniianos, basada en los aspectos morfológicos tisulares y citoló-



Figura 5.
Adenoma hipofisario en el que se detecta la presencia de prolactina. Antisúero frente a prolactina DAKO A569, 1:100; AVI-BIO:PR/DAB/H.

gicos, así como en la caracterización de diferentes marcadores fenotípicos expresados a nivel de la membrana celular o bien en localización intracitoplásmica (Igs), constituye un claro exponente de los avances realizados en este campo durante los últimos años (23).

IV) Orientación pronóstica. La detección IHQ de diversos "MT" como base para establecer una orientación pronóstica ha sido descrita si bien con resultados dispares. No debemos olvidar que cuanto más diferenciado es un tumor mayor es la posibilidad de que se expresen determinados

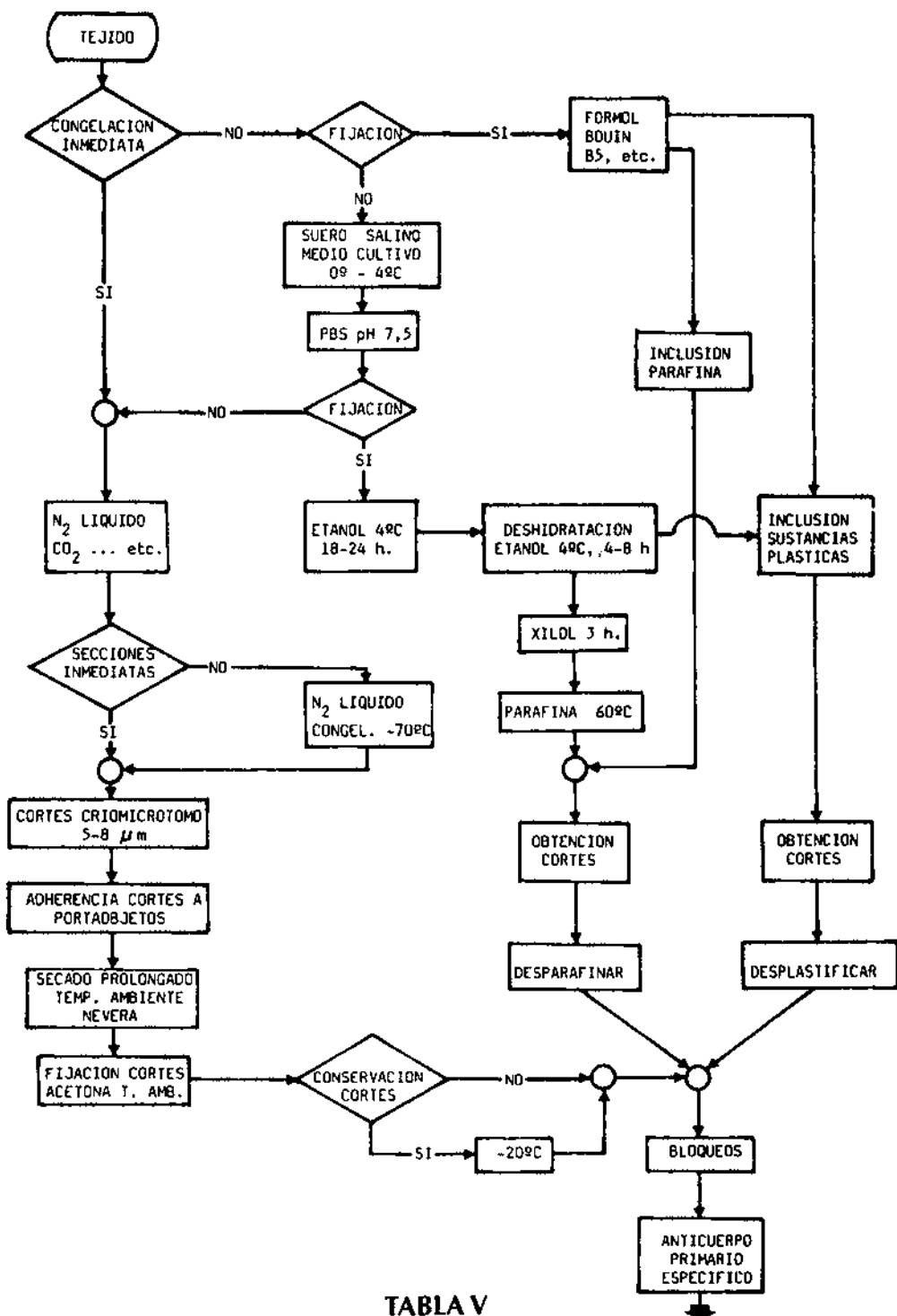


TABLA V

DIAGRAMA DEL ALGORITMO DE PROCESAMIENTO DE UNA MUESTRA TISULAR PARA TECNICAS IHQ

"MT". Lo contrario, para las neoplasias diferenciadas también es válido. La detección de HCC a nivel de las células epiteliales del carcinoma de colon (8) o la desaparición del antígeno de grupo sanguíneo correspondiente en las células de los carcinomas uroteliales deben interpretarse como hechos que comportan un mal pronóstico (12,40).

V) Predicción de "marcadores tumorales". Las técnicas IHQ pueden identificar en el seno de las células tumorales aquellos "MT" que pueden pasar a los líquidos corporales donde pueden ser detectados por procedimientos bioquímicos, con el fin de reconocer aquellos más útiles para establecer un seguimiento del curso biológico del proceso neoplásico. Cabe así constatar la respuesta favorable o desfavorable a la terapéutica, desarrollar los métodos de inmunodetección de recidivas o metástasis e incluso poder aplicar una inmunoterapia efectiva al paciente. (Fig. 6).

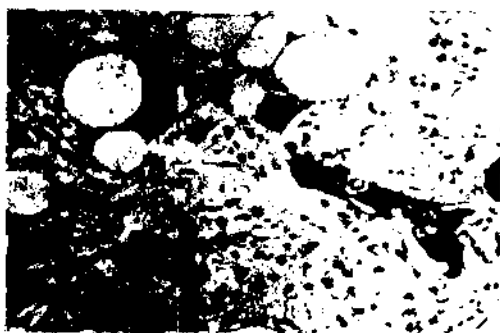


Figura 6.
Carcinoma de colon. Células neoplásicas positivas al antisuero frente a Ca 19.9 CIS AB1, AVI-BIO:PR/DAB/H.

CONDICIONANTES QUE REPERCUTEN EN LA FIABILIDAD DE LOS RESULTADOS IHQ

Tres aspectos fundamentales van a influir decisivamente en la valoración y rendimiento de los resultados obtenidos como consecuencia de la aplicación de las técnicas IHQ para la detección de "MT". A ellas nos referiremos seguidamente comentando aquellos hechos que pueden influir decisivamente en los resultados.

Preservación de la reactividad de los grupos antigénicos

No es necesario insistir que si queremos demostrar en una célula o tejido un determinado antígeno éste debe conservar la reactividad inmunológica frente al anticuerpo correspondiente. No todos los grupos antigénicos son igualmente resistentes a la acción de los diversos agentes físicos y químicos a los que va a ser sometida la muestra tisular durante el proceso de fijación e inclusión. Así nos hallaremos desde antígenos que resisten todo tipo de manipulaciones, fijación, inclusión en parafina, hasta otros que tan sólo serán verificables si el tejido ha sido preservado por procedimientos de congelación. Por ello en cada caso en particular deberemos utilizar aquellas técnicas de fijación e inclusión que más garanticen la inmunoreactividad de los grupos antigénicos que investigamos (21,34,58). (Tabla V). El tratamiento enzimático con tripsina o pepsina de los cortes, previamente a la aplicación del anticuerpo primario, tiene por objeto contrarrestar los efectos nocivos que la fijación ocasiona en algunos casos, ocultando los grupos reactivos de los antígenos, los cuales serían desenmascarados por dicho tratamiento (3,29,44).

Utilización de anticuerpos primarios específicos

La identificación de un grupo antigénico, tisular o celular, requiere la aplicación de un anticuerpo primario específico frente a aquél.

De la selectividad de este primer paso ineludible, depende en gran parte el éxito de la técnica IHQ. Podemos recurrir a dos posibilidades o bien utilizar anticuerpos policlonales o bien monoclonales (5,63).

En el primer supuesto, el contar con anticuerpos altamente específicos es difícil ya que a pesar de los procedimientos de purificación podemos detectar en ellos pequeñas proporciones de anticuerpos dirigidos frente a otros antígenos. La utilización de elevadas diluciones del anticuerpo primario nos obviará dicho inconveniente al reducir a proporciones prácticamente insignificantes dichos anticuerpos contaminantes.

Los anticuerpos monoclonales al ir dirigidos frente a epitopos determinados de la

molécula antigénica serán absolutamente específicos frente a dichos epitopos, pero debemos tener presente, a la hora de valorar los resultados, que antígenos diferentes pueden compartir epitopos comunes. La utilización de anticuerpos monoclonales nos obligará a ser más exigentes en la preservación de los antígenos así como de sus diferentes epitopos (47).

En algunos casos para evitar la falta de unión del anticuerpo monoclonal con su epitopo correspondiente, por pérdida de reactividad de éste último como consecuencia de las manipulaciones tisulares previas, y por lo tanto la imposibilidad de detección del antígeno, podemos recurrir a utilizar una mezcla de varios anticuerpos monoclonales dirigidos frente a diferentes epitopos del mismo antígeno, lo cual contrarrestaría la posibilidad de que algunos epitopos hayan sido destruidos o alterados.

Con el fin de optimizar los resultados obtenidos con las técnicas IHQ, generalmente utilizamos aquellos procedimientos en que el anticuerpo primario no se halla marcado con ninguna sustancia directa o indirectamente visible al microscopio, con el fin de preservar al máximo su reactividad. Es decir aplicamos técnicas indirectas que por otro lado al amplificar la reacción antígeno anticuerpo son más sensibles. (Tabla VI).

Controles de especificidad.

Con el fin de que los resultados obtenidos por la aplicación de las técnicas IHQ sean fiables, tenemos que efectuar rigurosos controles de la especificidad de la técnica. No basta con utilizar anticuerpos altamente específicos, sino que debemos también estar seguros de que no se han producido uniones inespecíficas de dichos anticuerpos con diversos componentes tisulares y celulares, los cuales falsearían los resultados (17,65).

Con estos propósitos utilizamos controles negativos, en cortes seriados, en los que se interrumpe a diferentes niveles la cadena de uniones antígeno-anticuerpo, aplicando anticuerpos primarios absorbidos con su antígeno correspondiente o sustituyendo anticuerpos por sueros no inmunes o tampón fosfato salino (PBS).

Para los controles positivos utilizamos muestras tisulares en las que tenemos abso-

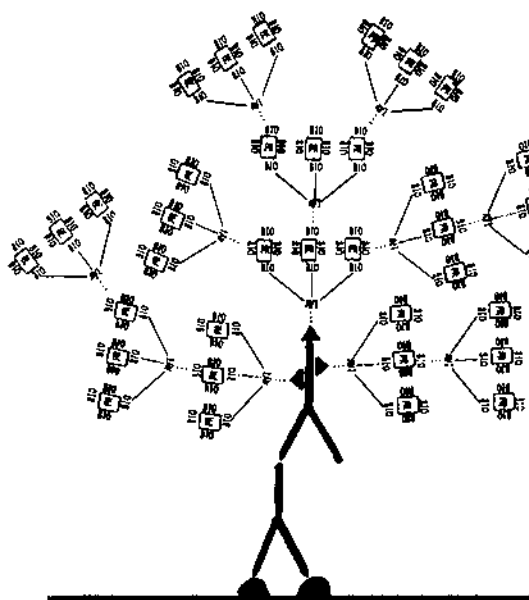


TABLA VI

AMPLIFICACION DE LAS REACCIONES
AG-AC MEDIANTE LA UTILIZACION
DEL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA-PR.

luta certeza de que se halla presente el antígeno a detectar y que además su reactividad inmunológica se halla conservada.

OTROS PROCEDIMIENTOS DE INVESTIGACION MORFOFUNCIONAL DE LAS NEOPLASIAS

Otros campos de investigación morfofuncional, dentro de los procesos neoplásicos, pueden ser desarrollados para un mejor conocimiento e interpretación de la biología tumoral. Especialmente dos nuevos aspectos son muy prometedores.

El primero de ellos hace referencia a la posibilidad de reconocer las modificaciones acaecidas en los grupos oligosacáridos de los gliconjugados celulares en el proceso de transformación neoplásica por mediación de las lectinas. (53).

Estas son proteínas obtenidas fundamentalmente de semillas vegetales pero que también podemos aislar de otros seres vivos (Tablas VII y VIII). Tienen la propiedad de unirse selectivamente con determinados oligosacáridos, mostrando incluso especificidad para la localización terminal o interna del oligosacárido en la fracción carbohidrato. Estas propiedades particulares de las lecti-

TABLA VII y VIII

RELACION DE LAS LECITINAS MAS UTILIZADAS SEÑALANDO EL GRUPO OLIGOSACARIDO PARA EL QUE ES MAS ESPECIFICA CADA UNA DE ELLAS.

nas nos permiten anticipar una sutil modificación en cuanto a la estructura bioquímica y al comportamiento biológico celular, previo a un cambio en la morfología. (28, 32, 33, 35, 60).

Otro aspecto no menos interesante es la determinación a nivel celular de la presencia de receptores hormonales como primer eslabón de la actuación hormonal, lo cual condiciona de algún modo los procesos de síntesis proteica citoplásmica y de proliferación celular neoplásica. (43) Especialmente han sido investigados los receptores para estrógenos (ER) y para progesterona (PgR)

en el cáncer de mama. Se han desarrollado técnicas por LEE y por PERTSCHUK (36, 37, 38, 56, 57) en las que se utiliza un ligando, estrógeno o progestágeno, marcado con un fluorocromo.

Más recientemente se han desarrollado anticuerpos monoclonales frente a la molécula del receptor para estrógenos, pudiéndose localizar ésta exclusivamente a nivel nuclear mediante un procedimiento PAP (16, 31, 59), o bien frente a la proteína D5 asociada a la molécula de ER y que muestra una ubicación citoplásmica. (10, 11, 30).

Esta determinación IHQ de receptores hormonales constituye una aportación más al conocimiento de la biología tumoral, complementando los datos aportados por la investigación bioquímica, al poder deslindar las diferentes poblaciones neoplásicas en cuanto al contenido en dichos receptores.

Agradezco a la Srta. P. Pérez, Dipl. Enf. del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central de QS Alianza y a la Srta. L. Fresno Dipl. Enf. del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Barcelona por la realización de las técnicas Inmunohistoquímicas.

TABLA VII

DENOMINACION LECTINAS		PROCEDENCIA	CARBOHIDRATO AFIN
APA	ABRUS PRECATORIUS	JEQUIRITY BEAN	β -D-Gal > α -D-Gal
AAA	ANGUILA ANGUILA		α -L-Fucosa
PNA	ARACHIS HYPOGEA	PEANUT	β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3), D-GalNAc > D-GalNH ₂ α -D-Gal α -D-Gal > D-GalNAc
GSA I	BANDEIRAEA O GRIFFONIA		
GSA II	SIMPLICIFOLIA		β -D-GluNAc = α -D-GluNAc
BPA	BAUHINIA PURPUREA		β -D-Galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 3)- 2-Acetamindo-2-deoxi- D-Galactosil > D-Gal α -D-Man > α -D-Glu > α -D-GluNAc
CONA	CANAVALIA ENSIFORMIS	JACK BEAN	β -D-GluNAc (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GluNAc
CSA	CYTISUS SESSILIFOLIUS		β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-GluNAc
DSA	DATURA STRAMONIUM	JIMSON WEED	α -D-GalNAc > D-Gal
DBA	DOLICHOS BIFLORUS	HORSEGRAM	D-Gal- β -(1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc > D-GalNAc
ECA	ERITRINA CRISTAGALLI		α -D-Gal-(α -D-Fuc (1 $\rightarrow$ 2)- (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal- (1 $\rightarrow$ 3 6 4)- β -D-GluNAc
EEA	EUONYMUS EUROPEUS		

DENOMINACION LECTINAS		PROCEDENCIA	CARBOHIDRATO AFIN
SBA	GLYCINE MAX	SOYBEAN	α -D-GalNAc = β -D-GalNAc > α -D-Gal
HPA	HELIX POMATIA	EDIBLE SNAIL	α -D-GalNAc > α -D-GluNAc > α -D-Gal
LCA	LENSCULINARIS	LENTIL	α -D-Man > -D-Glu; α -D-GluNAc
LFA	LIMAX FLAVUS	SLUG	Ac. Siálico (N-acetil Neuraminic acid)
LPA	LIMULUS POLYPHEMUS	HORSESHOE CRAB	Ac. Siálico
LOTUSA	LOTUS TETRAGONOLOBUS	ASPARAGUS PEA	α -L-Fuc (1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4) GalNAc
LEA	LYCOPERSICON ESCULENTUM	TOMATO	D-GluNAc
MPA	MACLURA POMIFERA	OSAGE ORANGE SEED	α -D-Gal

TABLA VIII

LBA	PHASEOLUS LIMENSIS	LIMA BEAN	α -D-GalNAc > α -D-Gal
PHA	PHASEOLUS VULGARIS	RED KIDNEY BEAN	D-GalNAc; β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 3,4) β -D-GluNAc (1 $\rightarrow$ 2), D-Man
PWA	PHYTOLACCA AMERICANA	POKE WEED	β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-GluNAc
PSA	PISUM SATIVUM	PEA BEAN	α -D-Man > α -D-Glu; α -D-GluNAc
PPA	PTILOTA PLUMOSA	RED MARINE ALGAE	α -D-Gal
RCA I	RICINUS COMMUNIS	CASTOR BEAN	β -D-Gal > α -D-Gal
RCA II			α o β -Gal = D-GalNAc
STA	SOLANUM TUBEROSUM	POTATO	β -D-GluNAc [(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GluNAc-(1 $\rightarrow$ 4)] ₂
SJA	SOPHORA JAPONICA		α -D-GalNAc
WGA	TRITICUM VULGARIS	WHEAT GERM	β -D-GluNAc-(1 $\rightarrow$ 4)GluNAc
WGAS			GluNAc
UEA I	ULEX EUROPEUS	GORSE SEEDS	α -L-Fuc
UEA II			L-Fuc (1 $\rightarrow$ 2)-D-Gal- (1 $\rightarrow$ 4), D-GluNAc (1 $\rightarrow$ 6) 2-Fucosyllactosa
VFA	VICIA FABA	BROAD BEAN	α -D-Man > α -D-Glu > α -D-GluNAc
VVA	VICIA VILLOSA		D-GalNAc
VAA	VISCUM ALBUM L	MISTLETOE	D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)
WFA	WISTARIA FLORIBUNDA		D-GalNAc

BIBLIOGRAFIA

1. ALROY J., ORCAD U, UCCI AA, PEREIRA MEA. Identification of glycoprotein storage diseases by lectins: A new diagnostic method. *J. Histochem Cytochem.* 32,1280-1284, 1984.
2. AVRAMEAS S., URIEL J. Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C.r. hebdo. Seance Acad. Sci Paris.* 262,2543-2545, 1966
3. BARSKY SH, RAO NC, RESTREPO C, LIOTTA LA. Immunocytochemical enhancement of basement membrane antigens by pepsin: Applications in diagnostic Pathology. *Am J. Clin Pathol.* 82,191-194, 1984.
4. BJORKLUND V., BJORKLUND B., WITTEKIND C., VON KLEIST S. Immuno-histochemical localization of tissue polypeptide antigen (PA) an carcino-embryonic antigen (CEA) in breast cancer. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect A.* 90,471-476, 1982.
5. BOROWITZ M., STEIN R. Diagnostic applications of monoclonal antibodies to human cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 108,101-105, 1984.
6. BOURNE, JA. Handbook of immunoperoxidase staining methods. 1.^a ed. California: Dako Corporation, 1983.
7. BOWLES DJ. El enigma de las lectinas. *Mundo Científico.* 2,886-887, 1982.
8. CAMPO GUERRI E. Estudio inmunohistoquímico de marcadores tumorales y receptores de lectinas en la mucosa colónica normal y patológica. Barcelona. Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona. Tesis Doctoral, 1985.
9. COGGI G., DELLORTO P., BONOLDI E., DOI P., VIALE G. Lectins in diagnostic pathology. En BOL-HAUSEN TC ED. *Lectins biology, biochemistry, clinical biochemistry*, vol 3. Berlin: Walter de Gruyter. 87-104, 1983.
10. COFFER AI., LEWIS KM, BROCKAS AJ, KING JB. Monoclonal antibodies against a component related to soluble estrogen receptor. *Cancer Res.* 45,3686-3693, 1985.
11. COFFER AI, SPILLER GH, LEWIS KM, KING JB. Immunoradiometric studies with monoclonal antibody against a component related to human estrogen receptor. *Cancer Res.* 45,3694-3698, 1985.
12. COON JS., WEINSTEIN RS, SUMMERS JL. Blood group precursor T-antigen expresion in human urinary bladder carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 77,692-699, 1982.
13. COONS AH, CREECH HJ, JONES RN, BERLINER E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* 45,159-170, 1942.
14. COOPER D., SCHERMER A., SUN TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest.* 52,243-256, 1985.
15. DE LELLIS R., WOLFE H. Contributions of immunohistochemistry to clinical Endocrinology and endocrine Pathology. *J. Histochem Cytochem.* 31,187-192, 1983.
16. DE SOMBRE ER, GREENE GL, KING WJ, JENSEN EV. Estrogen receptors, antibodies and hormone dependent cancer. En: Liss AR, Inc. *Hormones and Cancer.* New York. 1-21, 1984.
17. DRANOFF G., BIGNER DD. A word of caution in the use of neuron-specific enolase expression in tumor diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 108,535, 1984.
18. FALINI B, TAYLOR CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch Pathol Lab Med.* 107,105-117, 1983.
19. FIELD A., Technical aspects of immunocytochemistry and its applications in routine histopathology. Qualityline Europe. Miles Scientific No 1, 1983.
20. GUESDON JL, TERNYNCK T., AVRAMEAS S., The use of avidin-biotin interacción in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem Cytochem.* 27,1131-1139, 1979.
21. HANCOCK WW., BECKER CJ, ATKINS RC. A comparison of fixatives and immunohistochemical techniques for use with monoclonal antibodies to cell surface antigens. *Am J. Clin Pathol.* 78,825-831, 1982.
22. HEYDERMAN E. Tumour markers. En POLAK JM, VAN NOORDEN S. Eds *Immunocytochemistry: Modern methods and applications.* 2.^a edition. Bristol: Wright. 502-532, 1983.
23. HOFFMANN-FEZER, LOHMEYER J, STUNKEL K, RIEBER EP, KUMMER U, EULITZ M, THIERFELDER S. Monoclonal antibodies against T-cell antigens studies by immunohistochemistry. *Blut.* 44,275-288, 1982.
24. HOLGATE CS, JACKSON P, COWEN P, BIRD CC. Immunogold-silver staining: New method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J. Histochem Cytochem.* 31,938-944, 1983.
25. HOLGATE CS, JACKSON P, LAUDER I, COWEN PN, BIRD CC. Surface membrane staining of immunoglobulins in paraffin sections of non-Hodgkin's lymphomas using immunogold-silver staining technique. *J. Clin Pathol.* 36,742-746, 1983.

26. HSU, S.M., RAINE, L., FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29, 577-580, 1981.
27. HSU, S., COSSMAN, J., JAFFE, E.S. A comparison of ABC, unlabeled antibody and conjugated immunohistochemical methods with monoclonal and polyclonal antibodies—An examination of germinal center of tonsils. *Am J. Clin Pathol*, 80, 429-435, 1983.
28. HSU, S., REEH, J., Histochemical studies on lectin binding in reactive lymphoid tissues. *J. Histochem Cytochem*, 31, 538-546, 1983.
29. HUANG, S.N., MINASSIAN, H., MORE J.D. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest*, 35, 383-390, 1976.
30. KING, R.J., COFFER, A.I., GILBERT, J., LEWIS, K., NASH, R., MILLIS, R., RAJU, S., TAYLOR, R.W. Histochemical studies with a monoclonal antibody raised against a partially purified soluble estradiol receptor preparation from human myometrium. *Cancer Res*, 45, 5728-5733, 1985.
31. KING, W.J., GREENE, C.L. Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, 307, 745-747, 1984.
32. KLEIN, P.J., VIERBUCHEN, M. et al. Hormonal abhängige Lektin-Bindungsstellen: II: Lektin-rezeptoren als Indikator einer Hormonsensibilität von Mammakarzinomen. *Tumor Diagnostik*, 2, 240-245, 1981.
33. KLUSLENS, L.F., KLUSKENS, J.L., BIBBO, M. Lectin binding in endometrial adenocarcinoma. *Am J. Clin Pathol*, 82, 259-266, 1984.
34. LEATHEM, A., ATKINS, N. Fixation and immunohistochemistry of lymphoid tissue. *J. Clin Pathol*, 36, 747-750, 1983.
35. LEATHEM, A., ATKINS, N. Lectin binding to formalin-fixed paraffin sections. *J. Clin Pathol*, 36, 747-750, 1983.
36. LEE, S.H. Cytochemical study of estrogen receptor in human mammary cancer. *Am J. Clin Pathol*, 70, 197-203, 1978.
37. LEE, S.H. Cancer cell estrogen receptor of human mammary carcinoma. *Cancer*, 44, 1-12, 1979.
38. LEE, S.H. Cellular estrogen and progesterone receptors in mammary carcinoma. *Am J. Clin Pathol*, 73, 323-329, 1980.
39. LEWIS, R.E., JOHNSON, W.W., CRUSE, J.M. Pitfalls and caveats in the methodology for immunoperoxidase staining in surgical pathologic diagnosis. *Surv Synth Path Res*, 1, 134-152, 1983.
40. LIMASC, LANGE, P., A, B, H antigen detectability in normal and neoplastic urothelium. Influence of methodologic factors. *Cancer*, 49, 2476-2484, 1982.
41. LUCOCQ, J.M., ROTH, J. Colloidal gold and colloidal silver-metallic markers for light microscopic histochemistry. In BULLOCK, G.R., PETRUSZ, P. eds. *Techniques in Immunocytochemistry*. Vol. 3. London: Academic Press Inc, 203-236, 1985.
42. MASON, T.E., PHIFER, R.F., SPICER, S.S., SWALLOW, R.S., DRESKIN, R.D. An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J. Histochem Cytochem*, 17, 563-569, 1969.
43. McCARTY, K.S., Jr., McCARTY, K.S. Steroid hormone receptors in the regulation of differentiation. *Am J Pathol*, 86, 704-744, 1977.
44. MEPHAN, B.L., FRATER, W., MITCHELL, B.S. The use of proteolytic enzymes to improve immunoglobulin staining by the PAP technique. *Histochemical J*, 11, 345-357, 1979.
45. MOLL, R., FRANKE, F.F., SCHILLER, D.L. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cell. *Cell*, 31, 11-24, 1982.
46. MONTERO, C. Immunocytochemical methods and their achievements in Pathology. In: JASMIN, G., CANTIN, M. eds. *Methods and achievements in Experimental Pathology*. Basel: S. Karger Publ, 1-36, 1981.
47. MORIMOTO, C., SCHLOSSMAN, S.F., REINHERZ, E.L. Use of monoclonal antibodies in the study of autoimmunity and immunodeficiency. In: HAYNES, B.F., EISENBARTH, G.S. *Monoclonal Antibodies. Probes for the study of autoimmunity and immunodeficiency*. Orlando: Academic Press Inc., 1-19, 1983.
48. MOROTE ROBLES, J. Utilidad de la dosificación del antígeno prostático específico (PSA) en clínica humana. Barcelona: Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona. Tesis Doctoral. 1966.
49. NADJI, M., TABEL, S.Z., et al. Prostatic-specific antigen: an immunohistologic marker for prostatic neoplasms. *Cancer*, 48, 1229-1232, 1981.
50. NADJI, M., MORALES, A.R. Immunoperoxidase: Part II. Practical applications. *Laboratory Med*, 15, 33-37, 1984.
51. NAKANE, P.K., PIERCE, G.B. Enzyme-Labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem Cytochem*, 14, 929-931, 1966.

52. NATHARATH WBJ, HEIDENKUMMER P, BHORKLUND V., BJORKLUND B. Distribution of tissue polypeptide antigen (TPA) in normal human tissues. Immunohistochemical study on unfixed, methanol, ethanol and formalin fixed tissues. *J. Histochem Cytochem.* 33,99-109, 1985.
53. NICOLSON G. Lectin interactions with normal and tumor cells and the affinity purification tumor cell glycoproteins. In Sell S, ed. *Cancer Markers. Diagnostic and developmental significance.* New Jersey: The Humana Press. 403-443, 1980.
54. PALACIN FORGUE A. Detección inmunohistoquímica de marcadores tumorales. En: FERNANDEZ JL, GASALLA R, GOMEZ JM, GUTIERREZ A, MONTERO M, eds. *Actualidades en el Laboratorio Médico* 1985. Madrid: Graymo SA. 37-63, 1985.
55. PALACIN FORGUE A. Técnicas Inmunohistoquímicas. Aspectos Teórico-Prácticos. 2.ª Ed. Barcelona: Atom SA. 1986.
56. PERTSCHUK LP, TOBIN EH, BRIGATI DJ, GAETJENS E. Morphologic assay of steroid hormone receptors in human neoplasia. In: SOMMERS SC, ROSEN PP eds. *Pathology annual.* New York: Appleton-Century-Crofts, Part. 2,15,143-180, 1980.
57. PERTSCHUCK LP, DAYAN SA, CARTER AL, EISENBERG KB, FELDMAN JG. Comparison of estrogen binding localization with monoclonal estrophilin antibodies and fluorescent estrogen ligands. *Am J. Clin Pathol*, 81,797, 1984.
58. PIRIS J, THOMAS ND. A quantitative study of the influence of fixation on immunoperoxidase staining of rectal mucosal plasma cells. *J. Clin Pathol.* 33,361-364, 1980.
59. PRESS MF, GREENE G. Methods in laboratory investigation. An immunocytochemical method for demonstrating estrogen receptor in human uterus using monoclonal antibodies to human estrophili. *Lab Invest.* 50,480-486, 1984.
60. ROTH J. Applications of immunocolloids in light microscopy. II Demonstration of lectin-binding sites in paraffin sections by use of lectin-gold or glycoprotein-gold complexes. *J. Histochem Cytochem.* 31,547-552, 1983.
61. SHARON N. Lectinas. *Invest. Ciencia (Scientific Am)* n.º 11. 90-100, 1977.
62. SLOANE JP, ORMEROD MG. Distribution of epithelial membrane antigen in normal an neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer.* 47,1786-1795, 1981.
63. SOLOMON A. Monoclonal immunoglobulins as biomarkers of cancer. In: SELL S, ed. *Cancer Markers. Diagnostic and developmental significance.* New Jersey: The humana Press, 57-87, 1980.
64. STERNBERGER LA. *Immunocytochemistry.* 3.ª ed. New York: John Wiley & Sons, 1979.
65. WILSON AJ. Factor VIII-related antigen staining by immunoperoxidase technic in smaller laboratories: A potencia problem. *Am J. Clin Pathol.* 81,117-120, 1984.