

IMMUNOHISTOLOGIA EN LA DETECCIÓ DELS FENÒMENS D'AUTOIMUNITAT

MARGARIDA BOFILL

Royal Free Hospital. School of Medicine. Londres

La resposta immunitària té lloc en els diferents òrgans limfàtics tant primaris (tim i moll d'os) com secundaris (melsa, nòduls limfàtics i teixit limfàtic associats al pulmó i a l'intestí). Com veurem més endavant, els diferents òrgans limfàtics tenen un microambient molt complex on un gran nombre de diferents tipus de cèl·lules interaccionen i autocontrolen. En cas de malalties o d'infeccions es pot produir una resposta localitzada en la zona de la lesió que, una vegada controlada, desapareix (Roit I., Brostoff J., Male D. 1985).

La composició i la funció de les diferents cèl·lules immunitàries s'ha estudiat exhaustivament tant en individus sans com en individus que presenten problemes d'autoimmunitat o immunodeficiència. Per a la majoria d'aquests estudis s'utilitzen poblacions o subpoblacions de sang perifèrica, o suspensions cel·lulars de diferents òrgans limfàtics, però fins ara ha estat impossible reproduir *in vitro* la gran complexitat d'organització del microambient dels òrgans limfàtics *in situ* (Stites D.P. i als. 1986). A pesar que aquests òrgans no són estàtics, i que les cèl·lules circulen contínuament per via limfàtica i sanguínia, la presència de cèl·lules en la sang no és un reflex fidel del que té lloc en la resposta local, i fins i tot de vegades presenta una imatge invertida oposada a la real perquè les cèl·lules rellevants es concentren en el camp d'acció. D'aquí la necessitat d'estudiar localment la resposta immunitària.

Durant molts anys els histopatòlegs han estudiat la composició i alteracions locals produïdes en diferents malalties basant-se fonamentalment en la morfologia o la presència d'enzims endògens dels diferents tipus cel·lulars. Però especialment en teixits limfàtics, cèl·lules que tenen una morfologia pràcticament idèntica, poden exercir funcions totalment diferents o fins i tot contràries (Henry K., Farrer Brown G. 1981). Afortunadament en molts casos hi ha una correlació entre la funció de la cèl·lula i la presència d'antígens o marcadors de membrana que són fàcilment detectables amb anticossos específics. La producció d'anticossos monoclonals ha facilitat enormement l'estudi d'aquests antígens, ja que és possible obtenir una gran quantitat de reactiu totalment idèntic i específic per a cada tipus de cèl·lula (Beverly P.C.L., 1986). A part d'aquests tipus de marcadors, algunes cèl·lules expressen antígens que estan relacionats amb els diferents graus d'activació o amb el cicle cel·lular, i per tant en molts casos és possible no tan sols saber quin tipus de cèl·lula es troba en un determinat lloc en un determinat moment sinó també la seva funció i el seu grau

d'activació. Finalment, moltes cèl·lules en estat de funcionament produeixen hormones o limfocines que són essencials per a la regulació o activació d'altres. Desafortunadament moltes de les substàncies produïdes són solubles i per tant difícils de detectar amb anticossos. Recentment diferents grups intenten detectar en aquests casos no la presència de les limfocines produïdes sinó la presència de RNA missatger *in situ*. En lloc d'utilitzar com a marcadors anticossos utilitzen sondes o seqüències de RNA o DNA complementàries a la del RNA missatger (Robert J.L., Wilcox J.N., 1986).

Immunofluorescència i immunohistologia

Aquests mètodes es basen en la utilització d'anticossos per detectar la presència de cèl·lules que presenten un determinat antigen en teixits. Per visualitzar aquestes cèl·lules els reactius es marquen ja sigui amb un fluorocrom (tal com isotiocianat de fluoresceïna o de rodamina, ficoeritrina, etc. que en ser excitats per la llum ultraviolada emeten una llum visible de determinades longituds d'ona) (Janossy G., Bofill M., Poulter L.W., 1986), o amb enzims (que es poden detectar utilitzant substractes que per l'acció de l'enzim s'insolubilitzen i canvien de color) (Mason D.Y. i als.), o fins i tot partícules d'or, que poden detectar-se tant en microscòpia òptica com electrònica (De Mey J. i als. 1986). Els anticossos poden marcar-se directament (mètode directe) o utilitzar un segon anticòs marcat, normalment un anticòs heteròleg dirigit contra la primera espècie (mètode indirecte).

El mètode directe té l'avantatge que el temps de detectació és curt i que poden utilitzar-se dos anticossos a la vegada fins i tot si són de la mateixa espècie i subclasse. Té el desavantatge, però, que el mètode no és gaire sensible i que cal marcar cada anticòs individualment. El mètode indirecte és més llarg però molt més sensible i s'hi pot utilitzar una mateixa segona capa per detectar una gran varietat d'anticossos.

Dobles marcadors

Quan es vol estudiar un teixit amb un sol marcador els mètodes més adequats són els enzimàtics, ja que permeten visualitzar l'anticòs i al mateix temps veure la morfologia de la cèl·lula, però quan el que s'intenta veure és si una mateixa cèl·lula expressa més d'un antigen a la vegada es recomana utilitzar doble immunofluorescència, ja que si s'utilitza doble enzimologia moltes vegades l'antigen expressat en grans quantitats pot emascarar l'expressió de l'expressat en poca densitat, i la interpretació dels resultats és difícil i a vegades dubtosa. En canvi en el cas de doble immunofluorescència aquest problema no es presenta perquè els dos fluorocroms es miren amb diferents filtres i un color no emascara l'altre. Per a la doble immunofluorescència es poden utilitzar dos anticossos marcats amb diferents fluorocroms, dos reactius produïts en diferents espècies i dues segones capes dirigides contra cada una de les espècies, o dos anticossos que encara que siguin de la mateixa espècie pertanyin a dues subclasses diferents, i utilitzar com a segones capes anticossos específics de subclasse. En el cas d'haver d'utilitzar dos anticossos de la mateixa subclasse poden marcar-se amb diferents haptens (biotina i àcid arsenilic, per exemple), i utilitzar anticossos específics per a l'haptè. En la taula 1 s'il·lustren alguns dels sistemes utilitzats més correntment. Per incrementar la sensibilitat de la reacció poden utilitzar-se bàsicament dos tipus de mètodes: els que fan servir un nombre més llarg d'anticossos i els que augmenten o amplifiquen la intensitat dels substrats.

TAULA I. Sistemes immunològics utilitzats més correntment

	Primera capa	Segona capa	Tercera capa
Mètodes directes	Anticòs heteròleg* Anticòs monoclonal*		
Mètodes indirectes	Anticòs monoclonal	Cabra anti-IgS de ratolí*	
PAP	Anticòs monoclonal	Conill anti-IgS de ratolí*	Porc anti-IgS de conill*
APPAP	Anticòs monoclonal	Cabra a-IgS** de ratolí PA**	PA Ac. Mc# a-PA PA etc.
Doble fluorescència			
Sèrum heteròleg	Cabra a-IgS humana##		
Ac.Mc.# muri	Anticòs minoclonal	Cabra a-IgS de ratolí	
2 Ac. Mcs# de diferent subclasse	Ac. Mc. Classe IgM Ac.Mc. Classe IgG de	Cabra a-IgM de ratolí## Cabra anti-IgG de ratolí ##	
Ac.Mc. Biotinilitat	Ac.Mc. Biotinilitat	Avidina Estreptoavidina##	
Ac.Mc. Arsenilat	Ac.Mc. Arsenilat	Conill antiarsenilic àcid	Porc anti-IgS de conill##

* anticòs marcat amb fluorocrom o amb enzims

** Fosfatasa alcalina

Ac, Mc, Anticòs monoclonal

Ac. marcat amb fluoresceïna o rodamina

Mètodes

Per aplicar aquests tipus de tècniques els teixits congelats són òptims ja que quan s'inclouen teixits en parafina o plàstic es destrueixen molts dels antígens cel·lulars, especialment els localitzats a la membrana. Desgraciadament, el fet d'utilitzar teixits congelats té els seus inconvenients: el teixit s'ha de congelar ràpidament després de la seva extracció, i un cop congelat té una vida limitada de 4 a 12 mesos, però, principalment, la morfologia de les cèl·lules després del seu processament no és òptima i en alguns casos bastant insatisfactòria. Afortunadament cada vegada hi ha més anticossos que funcionen en parafina, però encara no suficients per a un estudi exhaustiu.

Així doncs és recomanable, un cop obtingut el teixit a estudiar, incloure'l en OCT i congelar-lo amb nitrogen líquid. S'obtenen talls d'aproximadament 6 micròmetres que es deixen assecar a temperatura ambient durant unes 24 hores. Es recomana una fixació lleugera que pot variar segons l'antigen a estudiar, però en general una fixació amb etanol or acetona durant 10 minuts a temperatura ambient és adequada en més del 95% de casos. Una vegada fixats els talls es poden tenir o guardar congelats durant fins i tot un parell o tres d'anys.

Els talls a estudiar es rehidraten en sèrum salí tamponat i s'incuben en una dilució adequada per a cada anticòs durant uns 45 minuts. Després es renten els talls amb solució salina i si és pertinent s'incuben successivament amb les altres capes. És recomanable en aquest punt fixar lleugerament els talls durant 5 minuts amb una solució tamponada de formaldehid del 4%. En el cas d'immunofluorescència els talls es poden muntar amb una solució de sèrum fisiològic i glicerol (2 vol. a 8 vol.) en el qual es pot incloure un 0,01% de

parafenildiamida per impedir que la fluorescència desaparegui. En el cas d'utilitzar anticossos marcats amb fosfatasa alcalina els talls es revelen amb una solució que conté 0,02% de fast vermell o fast blau (segons vulgui obtenir-se un precipitat vermell o blau), 0,04% de Naphtol AS BI fosfat en tampó TRIS C1 0.01M pH 8.2. durant un parell d'hores a temperatura ambient. Per a la peroxidasa, el substrat més utilitzat és la diaminobenzidina que es dissol al 0,02% final en tampó fosfat 0.01M pH 6.8 que contingui 0,01% d'aigua oxigenada. En aquest punt es pot amplificar la reacció amb precipitació d'argent de la següent manera: els talls s'incuben durant 5 minuts a temperatura ambient amb una solució de Cl_4NaAu d'1 mgr / ml, es renten amb aigua destil·lada desionitzada i s'incuben en una solució de sulfat de sodi 0.1 mol ph 7.5. Es tornen a rentar els talls amb aigua desionitzada i s'incuben durant 6 minuts en el reactiu d'argent que es prepara de la següent manera: *Reactiu A*: solució de carbonat sòdic a 2.5 mgr/ml, *Solució B1*: citrat amònic mgr/ml, *Solució B2*: nitrat d'argent a 1 mgr/ml, *Solució B3*: : àcid dodecatungstosílic a 10 mgr/ml, *Solució B4*: formaldehid al 40%. Es barregen un ml de les solucions B1, B2 i B3 en un tub de plàstic que conté 1 ml d'aigua destil·lada desionitzada i s'hi afegeixen 5 ul. de la solució B4, amb la qual cosa s'obté la solució B. Es barregen les solucions B i A volum per volum just abans d'incubar els talls. Aquesta reacció és estable durant 30 minuts a llum ambiental (Burns J. i als.). Un cop incubats els talls es renten durant 15 minuts en una solució d'àcid acètic a l'1% i després en aigua destil·lada.

La majoria de reaccions enzimiques es poden contratenyir amb hematoxilina, colorant de Giemsa o altres colorants utilitzats en histologia convencional, deshidratar amb una sèrie d'alcohols, xilè i muntar en DPX.

Cèl·lules immunitàries i els seus marcadors

A causa de la gran proliferació d'anticossos monoclonals i la confusió de reactivitats i noms que han aparegut en la bibliografia, s'han agrupat els diferents anticossos en grups de diferenciació que defineixen els anticossos dirigits contra un mateix antigen d'un determinat pes molecular (McMichael A.J., 1987). Els antigens de diferenciació més comuns estan resumits en la taula 2. La combinació d'aquests anticossos i de reactius heteròlegs més convencionals ha fet possible la classificació, localització i diferenciació de les diferents línies cel·lulars hematològiques.

Utilització de la immunohistologia per estudiar les malalties autoimmunitàries

Myasthenia gravis

La *myasthenia gravis* és una malaltia autoimmunitària que afecta la unió neuro-muscular i que es caracteritza per una debilitat muscular que s'incrementa amb l'esforç. En un 15% de casos aquesta malaltia està associada amb timoma, i en un 80% amb alteracions tímiques a les quals s'associa una presència alta d'autoanticossos, entre els quals destaquen anticossos contra múscul estriat i contra el receptor de l'acetilcolina. Aquests anticossos interaccionen amb cèl·lules epitelials i miodes del tim. La patologia dels malalts millora amb l'extirpació tímica. El tim d'aquests pacients té una característica única que és la presència de quatre microambients immunitaris que normalment no es troben junts (Bofill M. i al. 1985). El còrtex té una aparença normal i és format per una xarxa de cèl·lules epitelials per timòcits immadurs rics en l'enzim transferasa terminal del desoxinucleotidil

TAULA II. Grups d'antígens de diferenciació

Antígens	Pes molecular (kDa)	Distribució	Comentaris
CD1a	49	Timòcits immadurs. Cèl Langerhans	
CDb1	45	Tomòcits	
CD1c	43	Timòcits	
CD2	50	Cèl. T.	Receptor per als eritròcits de be
CD3	20,26	Cèl. preT en el citoplasma i cèl. T en la membrana	
CD4	60	Subpoblació de cèl. T de tipus <i>helper</i>	
CD5	67	Cèl. T i subpoblació de cèl. B dels noduls primaris	
CD6	120	Cèl. T	
CD7	40	Cèl. pre T i cèl. T. Leucèmies limfoblàstiques de tipus T	
CD8	32	Subpoblació de cèl. T de tipus supressor i citotòxic	
CD9	24	Monòcit cèl. preB i plaquetes	
CD10	100	Cèl. preB i leucèmia limfoblàstica com una aguda	
CD11a	189 (95)	Leucòcits	
CD11b	160 (95)	Monòcits i granulòcits	
CD11c	150 (95)	Monòcits i granulòcits	
CDw12		Defineix un grup de macròfags molt heterogeni, amb reactius que cobreixen tots els macròfags o reactius que cobreixin subpoblacions	
CD13	150	Granulòcits i monòcits	
CD14		Monòcits	
CD15		Granulòcits	
CD18	95	Leucòcits	Cadena beta dels antígens associats a la funció leucocitària
CD19	95	Cèl. preB i cèl. B	
CD20	35	Cèl. B i cèl. fol·liculo-dendrítiques	
CD21	140	Cèl. B i cèl. fol·liculo-dendrítiques	Receptor del factor C3d del complement
CD22	135	Cèl. preB citoplasmàtica cèl. B	
CD23	45	Subpoblació de cèl. B Cèl. fol·liculo-dendrítiques	
CD24	45, 55, 65	Cèl. B granulòcits	
CD25	55	Cèl. T activades	Receptor de la interleucina 2
CD33	67	Cèl. mieloides i leucèmies mieloides	
CD45	220, 205, 190,180	Leucòcits	Família de l'antigen comú leucocitari
CD45R	220, 205	Subpoblació de cèl. B de cèl. T	Possible marcador de cèl·lules verges
(UCHL-1)	180	Subpoblació de cèl·lules T i monòcits	Possible marcador de cèl. de memòria

(TdT), que expressen CD7, CD2, CD5 i coexpressen CD4 i CD8. Aquests limfòcits encara no expressen tot el receptor de cèl·lules T, sinó només la seva cadena beta. El CD3 és localitzat en el citoplasma (Campana: manuscrit en preparació). La medul·la tímica és formada per un epitelí molt ric en hormones tímiques, cèl·lules mioides, cèl·lules interdigitades o presentadores d'antigen, per les cèl·lules T que expressen molt fortament tots els antigens dels diferents *loci* dels antigens d'autocompetibilitat de classe II. Els limfòcits presents en la medul·la tenen totes les característiques dels limfòcits perifèrics madurs. Han perdut el TDT, expressen tot el receptor T, i el CD3 es troba a nivell de membrana i només es detecta CD4 o CD8 però no tots dos (Janossy G. 1986).

Per altra banda, els nòduls limfàtics tenen dos microambients clarament definits: les àrees B constituïdes per fol·licles primaris o secundaris, i les àrees T o paracòrtex. Les àrees B són formades per cèl·lules presentadores d'antigen anomenades cèl·lules fol·liculars dendrítiques (CFD), que expressen una gran quantitat de receptors per diferents factors del complement i que fixen immunocomplexos circulants. Les CFD estan voltades en els fol·licles primaris per una corona de limfòcits B amb característiques perifèriques que expressen immunoglobulines de membrana de classe IgM i IgD, i els CD19, 20, 21 i 22. En els fol·licles secundaris es troba una corona de cèl·lules B perifèriques amb les mateixes característiques que les cèl·lules dels nòduls primaris, i els centres germinals amb cèl·lules blàstiques anomenades centroblast i centròcits que estan en constant divisió. Els blasts expressen només IgM però no IgD, i els antigens de diferenciació CD19, 20, 21 i 22. També es troben un gran nombre de macròfags altament fagocítics (RFD9) que s'encarreguen d'eliminar les cèl·lules que moren en els centres germinals (Mason D.J., 1982). És important notar que en els centres germinals es troben un petit nombre de limfòcits CD4 positius CD4R negatius UCH-L1 positius als quals s'atribueix una funció *helper* per als limfòcits B (Bofill M: manuscrit en preparació).

En el paracòrtex es troben cèl·lules interdigitades i limfòcits tant CD4 com CD8 en una proporció de 3 a 1. Aquestes àrees estan pavimentades per fibres riques en fibronectina i col·lagen que no es troben en la medul·la tímica.

En el cas de *miastenia gravis* el tim és infiltrat per aquests dos últims microambients, i tenim doncs la coexistència anormal de cèl·lules epitelials, especialment riques en hormones tímiques, cèl·lules mioides, cèl·lules T en contacte amb les seves cèl·lules presentadores d'antigen, i centres germinals ben desenvolupats. És doncs fàcil especular que en aquest microambient especial és possible la sensibilització a antigens, que poden interaccionar amb substàncies semblants al receptor de l'acetilcolina en el múscul estriat.

Artritis reumatoide

L'artritis reumatoide és una malaltia crònica repetitiva que afecta principalment les articulacions que presenten una inflamació crònica amb erosió del cartilagi i fins i tot de l'os. Les cèl·lules plasmàtiques de la sinòvia produeixen factor reumatoide o anticossos dirigits contra IgG humana. Hi ha una infiltració local de la sinòvia formada principalment per cèl·lules interdigitades presentadores d'antigen i limfòcits T, que pertanyen a la subpoblació *helper* (Janossy G. i als. 1981).

Tant la subpoblació *helper* com la supressora citotòxica poden expressar dos tipus d'anticossos pertanyents a la família d'antigens comuns leucocitaris. Com es pot veure en la taula II, aquesta família d'antigen és composta de quatre cadenes dels pesos moleculars següents: 220, 205, 190 i 180. Les subpoblacions tant en sang perifèrica com en nòduls

limfàtics poden expressar o bé CD45R, que reconeix les cadenes 220 i 205, o bé UCHL-1, que reconeix la cadena 180. Estudis funcionals han demostrat que les cèl·lules que presenten el fenotip CD45R després d'estimulades, tant en mitògens com en una reacció de cultiu mixte canvien de fenotip, perden el CD45R i adquireixen UCHL-1. Almenys en cultiu aquest segon tipus de cèl·lules manté el segon fenotip i no reinverteix en el primer grup. A més, en una segona estimulació reaccionen com cèl·lules estimulades en una reacció secundària. Això fa pensar que les cèl·lules CD45R positives pertanyen al *pool* de cèl·lules verges, mentre que les cèl·lules UCHL-1 positives pertanyen al grup de cèl·lules de memòria (Akbar A. i als. 1980). El 95% de cèl·lules dels infiltrats sinovials d'artritis reumatoide presenten el segon fenotip. A més, aproximadament el 25% tenen receptors per a la interleucina 2 (CD25) i la gran majoria expressen antígens de classe II.

Tenim doncs en aquestes lesions totes les cèl·lules necessàries per a la perpetuació d'una resposta antigènica: cèl·lules interdigitades o presentadores d'antigen, cèl·lules CD4 activades de tipus *helper*, i molt poques cèl·lules CD8 positives supressores per controlar la resposta, cosa que pot explicar la cronicitat de la informació.

Conclusió

Les tècniques immunoenzímiques juntament amb doble immunofluorescència són ràpides i complementàries les unes de les altres. Són una arma molt útil per estudiar la resposta immunitària local a causa de la gran proliferació d'anticossos monoclonals dirigits contra diferents tipus de cèl·lules i dels seus diferents estats de proliferació.

Bibliografia

1. AKBAR A.N., TERRY L. TIMMS A. BEVERLY P.C.L. JANOSSY G. (1988). Unidirectional phenotypic changes within the T200 complex during activation of T cells. *J of Immun.* In press.
2. BEVERLY P.C.L. (1986). Monoclonal antibodies. *Methods in haematology*. Churchill Livingstone.
3. BOFILL M. JANOSSY G. WILCOX N. CHILOSI M. TREJDOSIEWICZ L.K. (1985). Microenvironment in the normal thymus and in the thymus of misatonia gravis. *Am J. of Path.*; 119: 462-77.
4. BURNS J. CHAN V.T.W. JONASSON J.A. FLEMING K.A. TAYLOR S. McGEE J.O.D. (1985). Sensitive system for visualising biotinylated DNA probes hybridised in situ: rapid sex determination of intact cells. *J. Clin. Path* 38: 1085-92.
5. DEMEY J. HACKER G.W. DEWAELE M. SPRINGALL D.R. (1986). Gold probes in light microscopy. *Immunocytochemistry*. Wright: 71-88.
6. HENRY K., FARRER BROWN G. (1981). A colour atlas of thymus and lymph node histopathology. Wolfe Medical Publications.
7. JANOSSY G. PANAYI G.S., DUKE O., BOFILL M., POULTER L.W., GOLDSTEIN G. (1981). Rheumatoid arthritis: a disease of T lymphocytes / macrophages immunoregulation. *Lancet* ii: 839-842.
8. JANOSSY G., BOFILL M., TREJDOSIEWICZ L.K., WILLCOX N., CHILOSI M. (1986). Cellular differentiation of lymphoid subpopulations and their microenvironments in the human thymus. *Current topics in pathology* Vol 75. Springer-Verlag: 89-125.
9. JANOSSY G., BOFILL M., POULTER L.W., (1986). Two colour immunofluorescence: analysis of the lymphoid system with monoclonal antibodies. *Immunocytochemistry*. Right: 438-54.

10. MASON D.Y., NAIEM M., ABDULAZIZ Z., NASH J.R., GATTER K.C., STEIN H. (1982). Immunological applications of monoclonal antibodies. *Monoclonal antibodies in clinical medicine* Ac. Press: 585-635.
11. ROITT I., BROSTOFF J., MALE D. (1985). *Immunology*. Gower.
12. STITES D.P., STOBO J.D., FUDENBERG H.H., WELLS J.V. (1982). *Basic and clinical immunology*. Lange.