

DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA O LA “REVOLUCIÓN MARRÓN” AL DESARROLLO DE LA BIOPSIA LÍQUIDA EN PATOLOGÍA TUMORAL

Luisa Ricaurte-Archila¹, María del Pilar Archila-Gomez¹, Orlando Ricaurte-Guerrero²

Resumen

Los avances en el ámbito de la patología y cirugía realizados entre 1500 y 1750 sirvieron como base para su desarrollo en los siglos XVIII y XIX, comprendiendo la naturaleza y composición macroscópica y microscópica de los tumores benignos y malignos. Desde entonces, los conceptos se volvieron a enfocar desde el órgano al tejido y a la célula, afectando el nacimiento de la histopatología que ha dominado esta ciencia durante siglo y medio. Luego, cuando el segundo milenio se acercaba a su fin, nuevas y poderosas tecnologías comenzaron a forzar una nueva revisión de las ideas alrededor de la patología convencional, desde las enfermedades basadas en alteraciones celulares hacia las enfermedades basadas en genes, pasando por el estudio de moléculas individuales y su interacción. El auge de la medicina de precisión comenzó en la década de 1980 con el desarrollo de la inmunohistoquímica. Este método permitió a los patólogos investigar rápidamente la expresión de proteínas en piezas obtenidas de muestras quirúrgicas. Estos niveles de expresión pronto serían relevantes para las subclasificaciones de los tumores que no eran accesibles por la microscopía óptica clásica. Recientemente, la introducción de la patología molecular tuvo un impacto positivo en el manejo de los pacientes con cáncer, especialmente para seleccionar terapias dirigidas y permitir el uso de técnicas como las biopsias líquidas que establecieron un nuevo estándar para los regímenes de monitorización continua durante el curso de la enfermedad. Esta técnica permite la detección de las recurrencias de la enfermedad antes que la radiología, lo que permite adaptar las terapias con anticipación. Además, también puede detectarse el desarrollo de mutaciones somáticas asociadas con la resistencia a las intervenciones realizadas.

Palabras Clave: *Patología; inmunohistoquímica; pruebas moleculares; medicina de precisión.*

1 Sección Patología, Fundación para la Investigación Clínica y Molecular Aplicada del Cáncer, Bogotá, Colombia.
2 Departamento de Patología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

FROM IMMUNOHISTOCHEMISTRY OR THE “BROWN REVOLUTION” TO THE DEVELOPMENT OF LIQUID BIOPSY IN TUMOR PATHOLOGY

Abstract

Advances made between 1500 and 1750 in pathology and surgery served as grounds for further progress in the 18th and 19th centuries in understanding the nature and the macroscopic and microscopic composition of benign and malignant tumors. Since then, concepts were re-focused from organ to tissue, to cell, ever smaller, affecting histopathology's birth that has held sway in pathology for just a century and a half. Then, as the second millennium drew to a close, powerful new technologies began to force yet another revision of conventional pathology ideas, from cell-based disease to gene-based disease, to individual molecules and their interplay. The rise of precision medicine began in the 1980s with the development of immunohistochemistry. This method permitted pathologists to quickly investigate various proteins' expression on histological slides obtained from surgical specimens. These expression levels would soon become relevant for subclassifications of tumors that were not accessible by light microscopy alone. Recently, the introduction of molecular pathology positively impacted cancer patient management, especially for selecting targeted therapy and the use of techniques like liquid biopsies that establish a new standard for continuous monitoring regimens during disease. This technique allows the detection of cancer recurrences earlier than radiology, thus allowing to adapt therapies earlier. Besides, the development of gene mutations associated with resistance to administered therapies might also be detected.

Keywords: *Pathology; immunohistochemistry; molecular tests; precision medicine.*

Introducción

Hasta la primera mitad del siglo XX, los estudios histopatológicos se basaban en la identificación de los diferentes tipos celulares presentes en los tejidos, el reconocimiento de patrones morfológicos característicos de los diferentes procesos patológicos y en la detección de sustancias diversas y de microorganismos, mediante una amplia gama de técnicas de histoquímica (coloraciones especiales), adaptadas de reacciones químicas y de tinciones usadas en microbiología. A

partir del decenio de 1940 empezaron a introducirse metodologías biotecnológicas. Inicialmente, en la medida que mejoraba el conocimiento de la inmunología empezaron a desarrollarse las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoenzimáticas, y una década después con el mejor conocimiento de la biología de los ácidos nucleicos, se desarrollaron la hibridación *in situ*, la PCR y la secuenciación. Estas técnicas se han perfeccionado y diversificado progresivamente, luego se han automatizado gracias al desarrollo de instrumentos y plataformas para garantizar su uso a gran escala de

forma homogénea, mejorándose con ello su difusión con rigurosos estándares de calidad. La introducción de estas técnicas en investigación biomédica y particularmente en patología, ha contribuido a mejorar enormemente el conocimiento de diferentes enfermedades, entre las que se destacan las neoplasias. Su introducción progresiva al diagnóstico patológico rutinario ha permitido proporcionar mayor información adicional sobre factores pronóstico y predictivos, contribuyéndose con ello a mejorar notablemente la atención de los pacientes.

Antecedentes

La inmunohistoquímica es una técnica utilizada en patología, basada en el uso de anticuerpos como reactivos altamente específicos para identificar una innumerable gama de macromoléculas denominados marcadores en cortes histológicos o preparaciones citológicas, por medio de la visualización en el microscopio de reacciones antígeno-anticuerpo. En su concepción más amplia, incluye tanto las técnicas predecesoras de inmunofluorescencia como las inmunoenzimáticas desarrolladas posteriormente.

Los antecedentes de estas pruebas se remontan al reconocimiento de las propiedades de las inmunoglobulinas para identificar de manera específica antígenos diversos como parte de la respuesta inmune humoral, para luego eliminarlos por medio de la activación del complemento y de la quimiotaxis de fagocitos y luego brindar inmunidad gracias a la activación clonal de los linfocitos B de memoria y su diferenciación a plasmocitos, al volver a ponerse el individuo en contacto con dichos antígenos, produciendo nuevamente anticuerpos contra ellos a gran escala.

Posteriormente fueron reconocidos los diferentes tipos de inmunoglobulinas, sus funciones en la respuesta inmune – La IgM, pentamérica que participa en la fase inicial de la respuesta a agentes infecciosos, seguida

por la producción de IgG e IgA dimérica, ésta última presente en superficies de las mucosas, la IgE en el reconocimiento de alérgenos etc.- y en la generación de las reacciones de hipersensibilidad, mediando el desarrollo de una amplia gama de enfermedades. Luego se develó su estructura, demostrándose en la cadena pesada (fragmento Fc) las secuencias de aminoácidos propias de cada tipo de inmunoglobulina y específicas de cada especie animal en que se producen y en la región hipervariable de las cadenas livianas, secuencias que les confieren su capacidad para reconocer específicamente innumerable variedad de antígenos y sus epítopes. Luego, a partir de estos conocimientos se definieron las bases de las pruebas serológicas para determinar la exposición previa a diferentes agentes infecciosos y se ideó la producción de sueros inoculando animales como parte del tratamiento de diferentes enfermedades. El origen de la inmunohistoquímica se remonta a 1941, cuando Albert Coons (1912- 1978) en la Universidad de Harvard ideó una prueba para reconocer de manera específica neumococos en un microscopio de fluorescencia, mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluoresceína (1).

Lógicamente el desarrollo de esta prueba requirió del reconocimiento previo desde finales del siglo XIX de las sustancias fluorescentes, moléculas que al ser expuestas a luz ultravioleta tienen la capacidad de emitir luz en el espectro visible: verde para la fluoresceína, rojo para la rodamina etc., que hicieron merecedor del Premio Nobel de Química en 1905 al químico alemán Adolf von Baeyer (1835- 1917). Para principios del siglo XX se habían descubierto una enorme gama de estas sustancias y en 1913, los físicos Otto Heimstaedt y Heinrich Lehmann, desarrollaron el microscopio de fluorescencia, cuyo principio se basa en la utilización de lámparas de mercurio, fuente de luz ultravioleta para excitar los fluorocromos y un complejo sistema de filtros para evitar la exposición del observador a la luz ultravioleta y a la vez seleccionar la luz emitida por cada fluorocromo para su visualización.

La técnica desarrollada inicialmente por Coons se denomina inmunofluorescencia directa, considerando que cada anticuerpo se encuentra acoplado en su fragmento Fc a un fluorocromo. Posteriormente se desarrolló la inmunofluorescencia indirecta, que permite obtener preparaciones más limpias, económicas y versátiles, en la que se utilizan dos anticuerpos obtenidos de dos especies de animales diferentes, el primario obtenido por ejemplo a partir de conejos inoculados con el antígeno objeto de estudio, al cual reconocen específicamente, mientras el secundario obtenido a partir de la inoculación de animales de otra especie, por ejemplo cabro con inmunoglobulinas de conejo y que se conjugan con el agente fluorescente que reconoce la secuencia de aminoácidos propia del fragmento Fc de conejo (Figura 1). Estas técnicas siguen siendo ampliamente utilizadas en diagnóstico patológico en el estudio de enfermedades mediadas por mecanismos inmunológicos, en cortes histológicos de tejido congelado, particularmente de biopsias de piel y de riñón en los cuales la epidermis, los vasos dérmicos y los glomérulos son fácilmente identificables en el campo oscuro al visualizarlos en el microscopio de fluorescencia.

Luego se intentó introducir las para el estudio de otras enfermedades como neoplasias pobremente diferenciadas para complementar el estudio morfológico, precisando más específicamente su diferenciación al identificar moléculas propias de su origen histogenético. Sin embargo, estos intentos inicialmente prometedores en investigación, resultaron siendo infructuosos para su uso a gran escala y en diagnóstico, por las dificultades que planteaba en esa época disponer rutinariamente de muestras de tejido congelado en instituciones de salud, por la insuficiente disponibilidad de microscopios de fluorescencia y sus dificultades para su uso, que llevarían posteriormente a su perfeccionamiento con el desarrollo de microscopios de epifluorescencia –con la lámpara de mercurio dispuesta en la porción posterior del equipo y un juego de prismas que dirigen la luz a través del objetivo hacia la preparación histológica–, más fáciles de utilizar. Por otra parte, la transitoriedad de estas preparaciones, debido al agotamiento de los fluorocromos (efecto “*fading*”) para emitir luz en el espectro visible luego de ser expuestos a la luz ultravioleta, determinaba la necesidad de mantenerlos almacenados en la oscuridad, de fotografiarse para obtener un

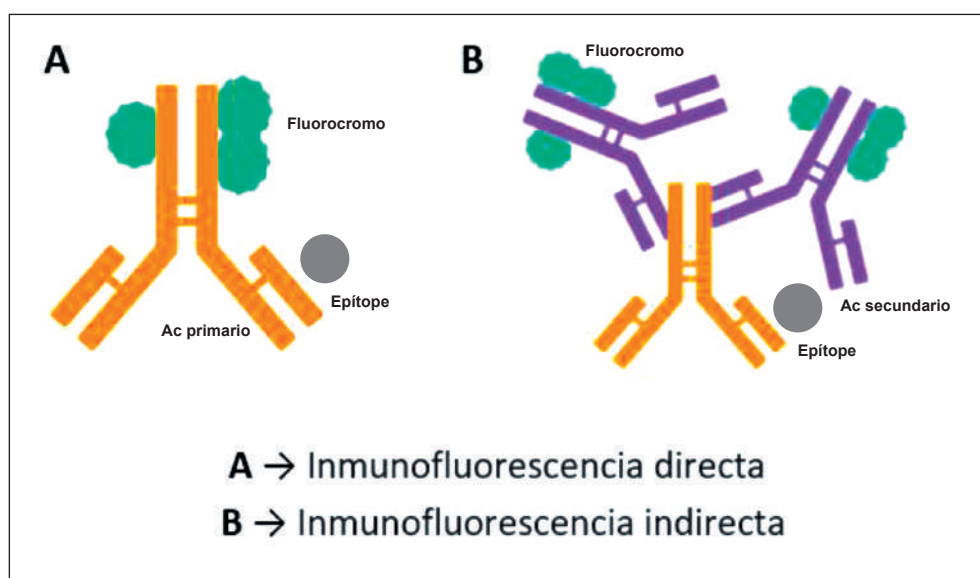


Figura 1. Representación esquemática de las técnicas de inmunofluorescencia.

registro duradero y por supuesto por la imposibilidad para obtener preparaciones adecuadas para interpretación en cortes de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, debido a que en el campo oscuro no es posible discernir con precisión los rasgos morfológicos para su adecuada interpretación (2, 3).

Más recientemente, gracias al desarrollo la hibridación *in-situ* fluorescente y de la microscopia confocal, ampliamente utilizada hoy en investigación biomédica, la inmunofluorescencia ha cobrado importancia muy relevante, facilitando por ejemplo la identificación de varios antígenos simultáneamente mediante anticuerpos marcados con fluorocromos diferentes, permitiendo evaluar dinámicamente sus interrelaciones por localización en cultivos celulares.

El advenimiento de las pruebas inmunoenzimáticas

Debido al gran potencial que representaban los principios de la inmunohistoquímica para caracterizar poblaciones celulares en diferentes procesos patológicos neoplásicos y no neoplásicos y para hacer más objetivo y preciso el diagnóstico de tumores pobremente diferenciados, luego de la imposibilidad de adaptar la inmunofluorescencia al estudio de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, empezaron a explorarse otras alternativas para revelar la reacciones antígeno-anticuerpo en los tejidos. Al mismo tiempo, laboratorios y empresas de biotecnología habían perfeccionado las metodologías para obtener una gama creciente de anticuerpos policlonales para identificar antígenos celulares, en la medida que progresaba el conocimiento de la biología celular y de la bioquímica. Los anticuerpos seguían utilizándose en investigación usando las pruebas de inmunofluorescencia.

Finalmente en 1967, Nakane y Pearce y otros grupos de investigadores, encontraron como alternativa a los fluorocromos acoplados a los anticuerpos, enzimas

que al interactuar con ciertos sustratos denominados cromógenos generaban una reacción coloreada, que permitía revelar las reacciones antígeno- anticuerpo en cortes de tejidos (4-6). Estas enzimas se caracterizaban por su estabilidad y permanecer activas a temperatura ambiente en una solución tamponada a pH fisiológico (7,1- 7,4); la primera enzima que garantizó resultados reproducibles fue la peroxidasa obtenida de rábano picante, utilizando como cromógeno la diaminobenzidina que se colorea de marrón, al cual el desarrollo de las pruebas inmunoenzimáticas debe el nombre de “revolución marrón” y con los que fue posible obtener preparaciones permanentes contrastadas con tinción nuclear de hematoxilina, inicialmente en cortes de tejidos frescos congelados y en 1974 Taylor y Burns en la Universidad de Oxford lograron su aplicación en cortes de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (7, 8), con rendimiento significativamente mejor que la inmunofluorescencia (9). Otro cromógeno alternativo debido al potencial carcinógeno de la manipulación de diaminobenzidina pura, es el aminoetilcarbazol.

El camino para el desarrollo de las pruebas inmunoenzimáticas no estuvo exento de dificultades, que motivaron hacer modificaciones en el proceso histotecnológico y que exigían la estandarización de cada anticuerpo con el uso de cortes de tejidos con el antígeno a determinar usados como controles positivos y controles negativos, correspondientes a cortes del tejido estudiado a los que no se agregaba el anticuerpo primario, para evaluar eventuales artificios y garantizar la adecuada interpretación de las pruebas inmunoenzimáticas (10-13).

La fijación tisular además de preservar la morfología celular, debía entonces garantizar la preservación de los determinantes antigénicos para su identificación con los anticuerpos, lo cual llevó al abandono de gran número de soluciones fijadoras, algunas usadas desde el siglo XIX que brindaban una preservación morfológica excelente, dentro de ellas se destacan el fijador de Bouin preparado con ácidos acético y pícrico, los

fijadores a base de cloruro de mercurio, usado para mejorar el detalle nuclear en las soluciones de Zenc-ker, B5 y FMA usados en nefro, hemato y dermatopatología. Incluso el formol al 10%, fijador más ampliamente usado hasta entonces por su disponibilidad, fácil preparación y bajo costo, debió modificarse, por que el formaldehído al oxidarse espontáneamente se transforma en ácido fórmico, acidificándose con ello la solución fijadora, lo cual induce modificaciones del punto isoeléctrico y cambios de la conformación tridimensional de las proteínas que constituyen una gran proporción de antígenos celulares, interfiriéndose así las reacciones antígeno- anticuerpo. Para evitar estos efectos se recomendó el uso universal de formol tamponado neutro al 10%, utilizando tampones de fosfato o tris, entre otros (14-16). Más recientemente se ha propuesto la utilización de sustitutos del formol tamponado, algunas comerciales para obtener mejores resultados en estudios de inmunohistoquímica y moleculares (17-20).

Para preservar los anticuerpos concentrados deben mantenerse congelados durante su transporte y almacenamiento, lo cual requiere cadenas de frío.

Desde el inicio de su uso fue evidente la necesidad de encontrar para cada anticuerpo la dilución más apropiada en la que se produce la reacción antígeno anticuerpo. Para obviar tener que diluir los anticuerpos concentrados, empezaron a comercializarse anticuerpos prediluidos que pueden almacenarse refrigerados a 4 grados centígrados, pero su tiempo de uso es limitado, requiriéndose entonces, prolongar el tiempo de incubación para seguir obteniendo resultados adecuados.

Inicialmente empezaron a usarse las técnicas directa e indirecta, similares a las utilizadas en inmunofluorescencia, pero pronto fue evidente la necesidad de desarrollar complejos inmunoenzimáticos para minimizar artificios como la inespecificidad de fondo por la precipitación del cromógeno, así como para amplificar la reacción antígeno anticuerpo y mejorar la sensibilidad de las pruebas. Los primeros complejos que se desarrollaron fueron la peroxidasa anti peroxidasa (9, 21, 22), la avidina biotina peroxidasa y posteriormente la estreptavidina biotina peroxidasa (23, 24) (Figura 2), con las cuales empezó la difusión global de la técnica para diagnóstico a finales del decenio de los años ochenta.

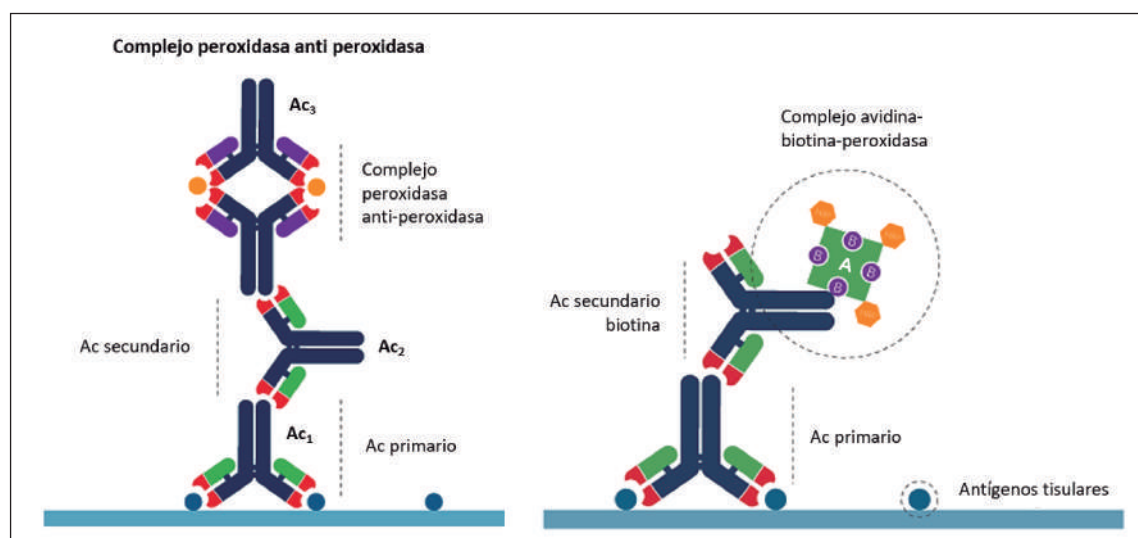


Figura 2. Representación esquemática de las técnicas de inmunohistoquímica: Complejos inmunoenzimáticos.

La actividad de peroxidasa endógenas en algunos tipos celulares como los hematíes y fagocitos fue otro factor determinante de artificios por dar lugar a reacciones inespecíficas con los cromógenos, que determinaron muy rápidamente el desarrollo de alternativas para su bloqueo, lo cual se logra con el pretratamiento de los cortes de tejido con soluciones de peróxido de hidrógeno (25-27). Otra fuente de inespecificidad de fondo identificada inicialmente, estaba determinada por la presencia de biotina en los cortes de tejido hepático en el cual se recomendaba usar otro complejo.

Como alternativa a la peroxidasa se introdujeron otras enzimas como la fosfatasa alcalina (28, 29) y la glucosa oxidasa (30) que interactuaban con los cromógenos fast red y fast blue para la primera y tetrazolium blue para la segunda, de tonalidades diferentes que ofrecían alternativas por ejemplo para el estudio de proliferaciones melanocíticas con pigmento melánico, difíciles de discernir usando peroxidasa y diamino bencidina y además se convertían en una opción para la identificación simultánea de dos marcadores identificables con cromógenos diferentes (31). Para ello también se desarrollaron técnicas de inmunomarcación usando oro y plata conocidas como immunogold (32, 33), que evitan confusiones con la reactividad de fondo por peroxidasa endógena y se usan en inmunoelectromicroscopía como una adaptación de la inmunohistoquímica para la identificación ultraestructural de marcadores, utilizando oro coloidal acoplado a los anticuerpos en investigación (34, 35).

El efecto de la fijación del formol reconocido desde mediados del siglo XX es debido a la producción de puentes de hidrógeno con las diferentes macromoléculas y entre ellas, el cual se acentúa con el tiempo de fijación (16, 36, 37), lo cual puede interferir la detección de los antígenos por un efecto de enmascaramiento, el cual empezó a contrarrestarse con el pretratamiento de los cortes de tejido con enzimas como tripsina, pronasa y quimotripsina (38, 39).

Otra dificultad que debió enfrentarse fue el desprendimiento de los tejidos de las láminas portaobjeto al aplicar estas pruebas, debido a la duración de su exposición al medio acuoso en que se desarrollan la incubación con los anticuerpos, complejos inmunoenzimáticos, el bloqueo de la peroxidasa endógena y los lavados con soluciones tamponadas entre los diferentes pasos antes de aplicar la coloración nuclear de contraste, para lo cual empezaron a utilizarse láminas pretratadas con soluciones de y gelatina y poli L lisina y luego empezaron a comercializarse láminas cargadas.

La especificidad de los anticuerpos utilizados en estas técnicas mejoró notoriamente con la introducción de la técnica del hibridoma que hiciera merecedores del premio Nobel en 1984 a Kohler, Milstein y Jerne, para la producción in vitro de anticuerpos, que se basa en la fusión en cultivos celulares de células neoplásicas de plasmocitomas con células B estimuladas con un antígeno para la producción de anticuerpos monoclonales. Estos a diferencia de los anticuerpos policlonales obtenidos inoculando animales con antígenos que reconocen varios determinantes antigénicos, identifican un epítotope específico (40).

Todas estas modificaciones se desarrollaron realizando múltiples ensayos a lo largo de casi dos decenios hasta finales de los años 70, permitiendo algo más de una década después, la introducción de las técnicas inmunoenzimáticas para diagnóstico en un número creciente de laboratorios de patología, inicialmente en países del primer mundo y luego en la medida en que más patólogos y laboratoristas se familiarizaban con su uso, su expansión permitió la reducción de sus costos y su uso se difundió globalmente. Con la aparición de estos métodos se generó una nueva área de la industria biotecnológica, que incluso dio lugar a la aparición de conglomerados industriales, donde empezaron a producirse masivamente los insumos requeridos para su creciente aplicación en los laboratorios de patología, que debieron dedicar áreas de sus instalaciones cada vez mayores. Estos desarrollos determinaron el reque-

rimiento a la industria de estrictos controles de calidad para garantizar la especificidad de los anticuerpos y el adecuado funcionamiento de los “kits” de detección, brindar la información pertinente a los usuarios sobre las características de los reactivos e instrucciones detalladas para almacenamiento, su uso (40) y también la adopción de controles de calidad en cada laboratorio llevando registros correspondientes sobre las propiedades de los reactivos y la aplicación de las pruebas para garantizar los mejores resultados (10, 11, 13, 41-44), desde la fase preanalítica con recomendaciones para el mejor manejo inicial de los diferentes tipos de muestras, para garantizar la aplicación de pruebas de inmunohistoquímica y luego moleculares (45), hasta la fase posanalítica con indicaciones para garantizar que el archivo del material histológico se realice en las mejores condiciones por tiempos prolongados, debido a la observación de degradación de determinantes antigénicos y otras macromoléculas en cortes de tejidos incluidos en parafina (46, 47), para beneficio de los pacientes por el desarrollo de nuevos tratamientos basados en la aplicación de pruebas asociadas.

Desarrollos posteriores

Se desarrollaron nuevos métodos de recuperación antigénica para optimizar el uso de las preparaciones a par-

tir de tejidos fijados en formol tamponado e incluidos en parafina, con el fin de contrarrestar la formación de puentes de hidrógeno con el formaldehído y entre las macromoléculas usando soluciones tamponadas de citrato en medio ácido y de EDTA en medio alcalino de acuerdo con las propiedades de los antígenos y de los anticuerpos y sometiéndolas a calor, utilizando hornos microondas o recipientes con presión provistos de termostatos para mantener temperaturas estables (48-52).

Para mejorar la sensibilidad de las pruebas, se diseñaron alternativas a los complejos inmunoenzimáticos, desarrollando polímeros de dextrano o multímeros acoplados a los anticuerpos secundarios (Figura 3), con los cuales la proporción de moléculas de enzimasustrato por anticuerpo aumentó notoriamente (50, 53-58).

Un número creciente de marcadores, además de su identificación cualitativa requiere de la cuantificación de su expresión, para lo cual se idearon escalas análogo- visuales que permiten hacer al patólogo una valoración semicuantitativa de rangos de expresión que empezaron a utilizarse rutinariamente, por ejemplo con el sistema Allred para la evaluación de los receptores hormonales (58- 59), para el valorar la extensión de la expresión de Her 2 (59, 60) y Ki- 67 en cáncer

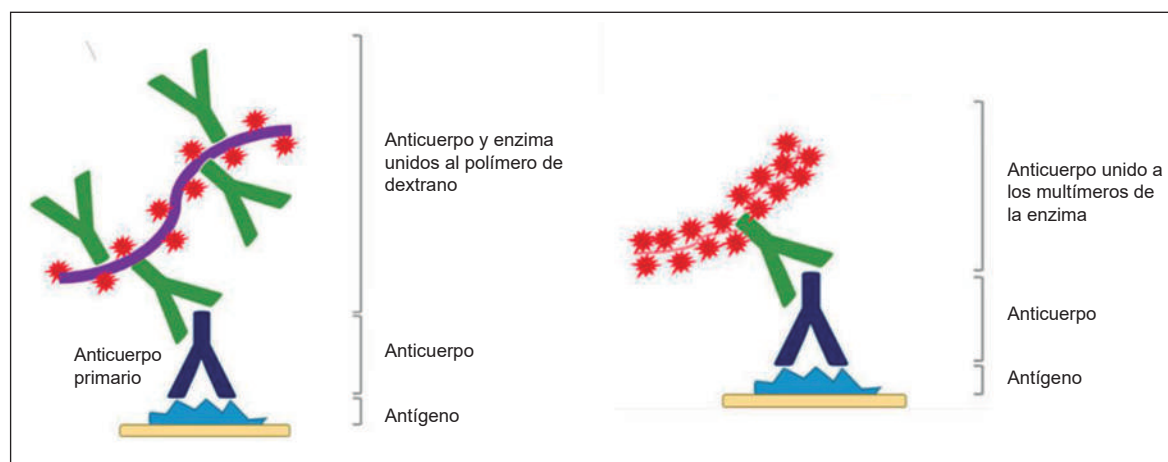


Figura 3. Representación esquemática de los complejos inmunoenzimáticos con polímeros y multímeros.

de mama, o en los tumores neuroendocrinos bien diferenciados. Con el fin de hacer una valoración más precisa, particularmente en casos con expresión cercana a puntos de corte para definir pronóstico o tomar decisiones terapéuticas se ha introducido la utilización de analizadores de imagen (61, 62), herramientas de software utilizadas inicialmente en imágenes obtenidas con cámaras de video acopladas a los microscopios ópticos y más recientemente incorporadas a los nuevos microscopios digitales.

Inicialmente las pruebas de inmunohistoquímica se realizaban manualmente, posteriormente en la medida en que aumentaba el volumen de este tipo de pruebas en los laboratorios de patología, empezaron a desarrollarse equipos para su automatización, inicialmente similares a los equipos diseñados para histoquímica y luego con especificaciones que permitían homogenizar su realización o para mejorar la reproducibilidad, garantizando que no se omitieran pasos durante la realización de la prueba o que los diferentes anticuerpos, reactivos y tampones con los que se tratan los cortes de tejido fueran completamente cubiertos por estos durante todo el desarrollo de la prueba, con lo cual además de mejorarse los estándares de calidad (63-65), se optimizó el uso del tiempo del personal de los laboratorios, lógicamente estas adaptaciones aumentaron los costos en laboratorios de bajo volumen y las industrias de biotecnología empezaron a utilizar los modelos de negocio que se habían implementado en los laboratorios clínicos, asumiendo la dotación de los laboratorios con equipos en comodato a cambio de la fidelización de los laboratorios con los anticuerpos y demás kits de reactivos de su marca.

Con el advenimiento de la inmunoterapia, ha surgido más recientemente la necesidad de conocer más a fondo la respuesta inmune a los tumores, la relación de las células tumorales con los linfocitos intratumorales y el estroma tumoral con el fin de diseñar alternativas de tratamiento (66, 67). En este contexto se ha propuesto defi-

nir la composición de los infiltrados linfoides asociados a los tumores haciendo un “*immunoscore*”, identificando marcadores asociados a respuestas inmunes eficientes o a su supresión. Cada marcador se identifica por separado, o a lo sumo por pares, utilizando dos enzimas con sus respectivos cromógenos para revelarlos, pero con el fin de evaluar simultáneamente varios marcadores, tomando como referencia la experiencia de la citometría de flujo en el estudio de las leucemias, han empezado a desarrollarse sistemas de inmunohistoquímica multi-detección (68). Su análisis, sin embargo, requiere además del uso de analizadores de imagen para determinar con precisión las proporciones de los marcadores, de programas de inteligencia artificial para evaluar las relaciones entre las señales de las diferentes células caracterizadas con esta metodología (69). Estas herramientas por ahora tienen un prometedor campo de aplicación en investigación, pero pronto se prevé, empezarán a migrar al diagnóstico.

Evolución de la Utilización de las Pruebas Inmunoenzimáticas en Diagnóstico

El desarrollo de las pruebas inmunoenzimáticas generó inicialmente enormes expectativas en el ejercicio de la patología, considerando que su uso permitiría impactar el diagnóstico en situaciones en las que la subjetividad del análisis de imágenes generaba grandes dificultades para efectuar diagnóstico específico, incluso llegó a pensarse que la inmunohistoquímica podría reemplazar el análisis de patrones morfológicos en patología tumoral por la identificación de marcadores propios de cada tipo celular. De hecho, inicialmente se creía que los diferentes antígenos para los cuales se desarrollaban anticuerpos eran específicos de cada tipo celular, sin embargo, su uso creciente demostró muy pronto la ubicuidad de un número significativo de estos marcadores en variable número de tipos celulares, generándose con ello decepción, incluso el surgimiento de detractores de la prometedora técnica, lo cual obligó a replantear su utilización, siempre tomando

como punto de partida la identificación de los rasgos morfológicos del análisis patológico clásico, para la selección de paneles de marcadores para establecer diagnósticos diferenciales, identificando la co-expresión de algunos marcadores y la ausencia de otros antígenos, definiéndose con ello el uso de perfiles de expresión de marcadores que permitieron establecer con mayor precisión diagnósticos diferenciales.

Un aspecto relevante del uso de la inmunohistoquímica en el estudio de procesos patológicos, particularmente neoplásicos ha sido la confirmación de los criterios de clasificación histopatológica con base en rasgos morfológicos, sólo ocasionalmente su uso ha determinado un replanteamiento radical de las clasificaciones morfológicas. Por el contrario, la identificación de perfiles de expresión de marcadores ha permitido separar mas claramente entidades nosológicas o identificar subcategorías adicionales de procesos patológicos con comportamiento biológico diferente. El ejemplo mas llamativo de este impacto ha sido la hematopatología, área pionera en el uso de la IHQ, que determinó muy pronto grandes aportes al sistema de clasificación vigente de Rappaport para los linfomas no Hodgkin (70): su uso determinó el planteamiento de la clasificación de Lukes y Collins en Norteamérica, basado en criterios de inmunofenotipo lukes(71). La aparición simultánea de nuevas nomenclaturas y el uso por diferentes grupos de investigadores en el mundo de anticuerpos que identificaban los mismos marcadores pero denominados con nombres diferentes, generaron una gran confusión, que se solucionó por una parte con la creación de la nomenclatura de consenso el “Working Formulation” para homologar los sistemas de clasificación (72) y la creación de una nomenclatura internacional para denominar los marcadores usados en hematopatología el “*cluster differentiation o CD*” (73, 74).

La creciente aparición de nuevos marcadores, determinó un notorio incremento de la literatura para recomendar su aplicación en situaciones específicas y

la formulación de algoritmos para la aplicación de los diferentes paneles de anticuerpos para facilitar su utilización racional en el diagnóstico de las neoplasias.

Por ejemplo, para el diagnóstico de tumores indiferenciados de origen desconocido, de acuerdo con sus características morfológicas, se plantea el uso de un panel inicial para determinar la estirpe celular, usando marcadores de amplia distribución en células epiteliales, hematolinfoides, mesenquimales y por supuesto los melanomas que por su morfología variable simulan neoplasias de otros orígenes. Una vez se establece la línea de diferenciación se solicita un panel adicional para determinar con mayor precisión el origen del tumor con base en la identificación de perfiles de marcación característicos. Para el caso de tumores epiteliales metastásicos de origen desconocido los algoritmos recomiendan el uso inicial de paneles de origen mas probable de acuerdo con el órgano afectado: ganglios linfáticos de diferentes localizaciones, hígado, pulmón, hueso, sistema nervioso, etc. (75, 76).

En algunos órganos como pulmón e hígado, donde son más frecuentes los tumores metastásicos y estos comparten rasgos morfológicos con algunos tumores primarios particularmente del tipo adenocarcinoma, los cuales tienen un tratamiento diferente, la inmunohistoquímica permite la exclusión de metástasis mediante paneles con marcadores que permiten definir con precisión neoplasias primarias. En pulmón, este aspecto se hizo especialmente relevante con el surgimiento de tratamientos con moléculas pequeñas y anticuerpos monoclonales efectivos, dirigidos a blancos y más recientemente con el advenimiento de la inmunoterapia, que empezaron a mejorar significativamente el tiempo sobrevida global y libre de recaída de los pacientes, lo cual determinó el reto de optimizar las limitadas muestras de biopsias transbronquiales y por punción, para que además de precisar el diagnóstico sirvieran posteriormente para efectuar los estudios moleculares pertinentes para definir los blancos terapéuticos (77).

Aplicaciones en Medicina Personalizada

El otro aspecto en el cual la inmunohistoquímica empezó a tener un papel muy relevante fue el teranóstico propiamente dicho (78-80), término proveniente de la industria farmacéutica, acuñado por John Funkhouser “CEO” de Pharma Netics, en 2007 (83, 84), aunque su práctica precede su origen lingüístico, considerando que su uso a gran escala se inició en el decenio de los 80 para el tratamiento hormonal del cáncer de seno con tamoxifen dirigido a los receptores de estrógenos, inicialmente determinados por métodos bioquímicos que fueron exitosamente reemplazados por las novedosas técnicas de inmunohistoquímica (81-83).

En el decenio de 1990, hubo otro descubrimiento sorprendente que permitiría esclarecer el misterioso origen de los tumores estromales gastrointestinales, más frecuentes en estómago, los cuales hasta entonces solían diagnosticarse como leiomiomas, leiomiomas o tumores derivados de la vaina neural, por su variada morfología fusocelular o epitelioides con rasgos que sugerían estos orígenes, no obstante ser negativos para marcadores de músculo liso y nervio periférico, hasta que se identificó la expresión de C-Kit o CD117 en las células tumorales, demostrándose al mismo tiempo su origen a partir de las células intersticiales de Cajal que regulan el peristaltismo en el tubo digestivo y determinando al mismo tiempo con ello un blanco terapéutico para imatinib (glivec) (88, 89), con el cual se habían obtenido excelentes resultados en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, convirtiéndola de una neoplasia indolente que tarde o temprano cobraba la vida de los pacientes afectados por ella a convertirse en una enfermedad crónica con una prolongada vida libre de enfermedad (84, 85).

Por esa misma época, fue evidente la presencia en un grupo de carcinomas mamarios con pobre pronóstico, caracterizados por la significativa amplificación del

factor de crecimiento epidérmico de tipo II o Her 2 neu, que da lugar a una proliferación celular incontrolada por la activación de una vía tirosina quinasa (86), para el cual se desarrolló una prueba de inmunohistoquímica para determinar su sobreexpresión, otra de hibridación in-situ para demostrar la amplificación del gene en los casos ambiguos por inmunohistoquímica (59, 60, 87) y un anticuerpo monoclonal humanizado, el trastuzumab (Herceptin) para tratamiento dirigido contra este blanco, con el cual empezaron a obtenerse excelentes resultados (88).

Para los linfomas no Hodgkin B, empezó a desarrollarse una alternativa similar con el rituximab (Rituxan), un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra CD20, el cual empezó a incorporarse a los esquemas de quimioterapia o conjugándolo con radioisótopos (89).

Con el progresivo desarrollo de la medicina personalizada en oncología, recientemente el número de blancos terapéuticos susceptibles de identificarse por inmunohistoquímica en diferentes tipos de neoplasias se ha incrementado notoriamente, convirtiéndose en una actividad rutinaria creciente en los laboratorios de patología en todo el mundo. Para ello se han desarrollado los “Companion Test”, pruebas de inmunohistoquímica diseñadas por la industria farmacéutica y aprobados por las agencias estatales reguladoras para seleccionar específicamente los pacientes candidatos a terapia personalizada dirigida a blancos terapéuticos e inmunoterapia, utilizando clones de anticuerpos dirigidos a epítopes específicos, revelados con “kits” de detección definidos y procesados en plataformas definidas, para garantizar resultados homogéneos con altos estándares de calidad que incluyen la capacitación de patólogos para la interpretación de las pruebas en laboratorios de referencia (79, 80, 90). Desde la descripción de las primeras técnicas inmunoenzimáticas su aplicación en investigación y diagnóstico ha aumentado enormemente como lo muestra la literatura (91).

Hibridación *in-situ*

El primer campo de aplicación rutinaria de la citogenética en la patología fueron las leucemias, inicialmente con la identificación del cromosoma Filadelfia en leucemia mieloide crónica (92) y luego con la descripción creciente de otras anomalías cromosómicas (duplicaciones, translocaciones, genes de fusión, deleciones), cuya identificación se incorporó progresivamente con fines de diagnóstico y pronóstico en hematopatología (93) y más recientemente en el estudio de tumores sólidos.

El conocimiento progresivo sobre la estructura de los ácidos nucleicos y la biología de los procesos de replicación, transcripción y síntesis proteica a partir de los trabajos de Watson y Creek (94, 95), que les hiciera merecedores del premio nobel de Medicina y Fisiología en 1962, dio lugar a la aparición de nuevas metodologías para su aplicación inicial en investigación biomédica y luego en diagnóstico. El desarrollo de las técnicas de citogenética y de hibridación *in situ* se aceleró notoriamente desde los años 70, dando lugar al desarrollo de una amplia gama de pruebas diagnósticas con una creciente aplicación en genética y patología

molecular durante el siglo XXI (96-100), determinando que, desde su descripción, aumentara de manera exponencial su aplicación en investigación, como lo muestra la literatura (24).

En 1969 Gall y Pardue (101) y John, Birnstiel y colaboradores (102), desarrollaron simultáneamente la prueba de hibridación *in-situ* en preparaciones citológicas, cuyo principio se basa en la identificación de secuencias de nucleótidos con una sonda complementaria marcada inicialmente con isótopos radioactivos mediante autorradiografía, luego en preparaciones histológicas (103) y su aplicación empezó una década después (104), cuando se desarrollaron las pruebas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH por su acrónimo en inglés), directas con el fluorocromo conjugado a la sonda e indirectas cuando se conjugan con un hapteno o etiqueta como digoxigenina o biotina, que en un paso posterior son reconocidos respectivamente por un anticuerpo antidigoxigenina o avidina acoplados con el fluorocromo o una sustancia quimioluminiscente. Las sondas por su parte pueden ser de DNA monocatenario o RNA (96-100) (Figura 4).

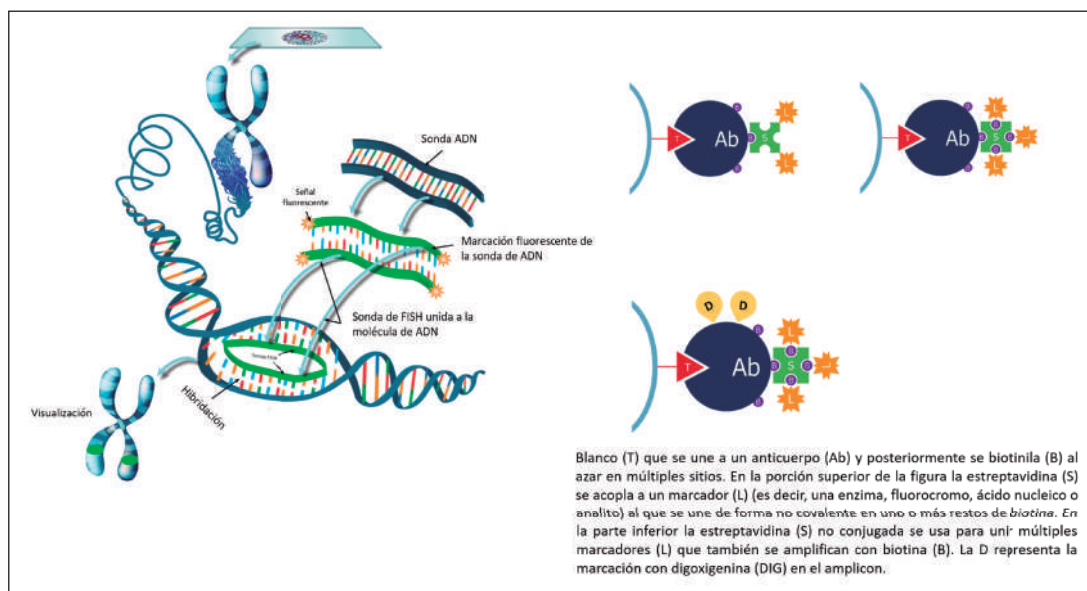


Figura 4. Representación esquemática de la hibridación *in-situ*.

Con estas pruebas pueden identificarse secuencias de DNA y RNA, estas últimas requieren de un óptimo manejo de los tejidos en la fase preanalítica para garantizar su preservación debido a su labilidad; al igual para que las pruebas inmunoenzimáticas, empezaron a realizarse en láminas pretaratadas con gelatina o poli L lisina y luego en láminas cargadas para evitar el desprendimiento de los cortes por requerir múltiples pasos en medio acuoso, entre los que se destacan un pretratamiento con proteasas, generalmente proteinasa K, la denaturación del DNA para separar las dos cadenas, seguida por la hibridación que generalmente se hace durante la noche y lavados con soluciones tamponadas entre los diferentes pasos; para facilitar la identificación de los núcleos se utilizan fluorocromos con gran afinidad por el DNA bicatenario como el DAPI (4',6-diamino -2-fenilindol), que brindan una coloración azul de contraste (105, 106). Para la interpretación se analiza un número representativo de células o núcleos identificando las señales fluorescentes marcadas.

El FISH, ampliamente extendido hoy en investigación, diagnóstico y en la evaluación de factores de pronóstico y predictivos, adolece de los mismos inconvenientes de la inmunofluorescencia: preparaciones transitorias por el efecto de agotamiento (“*fading*”) de los fluorocromos que requieren fotografías para su documentación y archivo y la necesidad de utilizar microscopio de fluorescencia. Para obviar estas dificultades posteriormente se desarrolló la hibridación *in situ* cromogénica (CISH), con base en algunas adaptaciones procedentes del desarrollo de la inmunohistoquímica, como el uso de complejos inmunoenzimáticos o plata, con las cuales además de obtenerse preparaciones permanentes. con preservación de los rasgos morfológicos resaltados con la coloración de hematoxilina usada para dar contraste nuclear, se analizan en microscopios convencionales (107, 108).

Para facilitar la evaluación se desarrollaron también pruebas duales, con las cuales además de las secuen-

cias problema a identificar, suelen evaluarse simultáneamente sondas marcadas con otro fluorocromo o cromógeno de secuencias de los centrómeros de los cromosomas, donde se encuentran los genes que se están evaluando, con la finalidad de facilitar el análisis (109). Adicionalmente se han desarrollado pruebas multicolor, más utilizadas en estudios citogenéticos.

La hibridación *in situ* es una prueba accesible a los laboratorios de patología, Inicialmente empezó a utilizarse en preparaciones citológicas, mielogramas, extendidos de sangre periférica, improntas, cortes de tejidos frescos congelados, luego en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina; también es usado en investigación en cultivos celulares. Desde su descripción, esta metodología se ha difundido masivamente en el estudio de múltiples procesos patológicos dentro de los que se destacan neoplasias, enfermedades infecciosas etc. En hematología, empezó a utilizarse para el diagnóstico rutinario de leucemias, luego de linfomas para la identificación de agentes virales como el virus de Epstein Barr, que por integrarse al genoma frecuentemente no puede detectarse con la inmunohistoquímica para LMP1, mientras la hibridación *in situ* para EBER es muy sensible (110); es una herramienta muy útil en la identificación de rearrreglos en linfomas no Hodgkin para definir diagnósticos diferenciales y factores de pronóstico (111-114). Su aplicación ha contribuido al desarrollo de la medicina personalizada en el estudio de tumores sólidos para la identificación de blancos terapéuticos: entre las primeras aplicaciones del FISH y el CISH, se encuentran la amplificación de Her2-neu en casos de cáncer de mama con resultados ambiguos o equívocos en la evaluación de la expresión del marcador por inmunohistoquímica (87) de translocaciones de EML4-ALK en adenocarcinoma de pulmón (115, 116), detección de virus de papiloma humano y virus de Epstein Barr en carcinomas de cabeza y cuello y rearrreglos en neoplasias de glándulas salivares (117), rearrreglos para el diagnóstico diferencial de melanomas (118) y sarcomas (119) etc.

Para facilitar el proceso se han diseñado equipos, plataformas para su automatización y analizadores de imagen para su interpretación, mejorándose con ello la reproducibilidad y otros estándares de calidad (120).

Microdissección

En 1975 Frederik Sanger (1918- 2013) desarrolló en la Universidad de Cambridge la metodología de secuenciación de ácidos nucleicos (121), que le hiciera merecedor en 1980 a un segundo premio Nobel de Química, la cual pese a haberse descrito variantes y automatizado dando lugar a plataformas muy robustas, continuando siendo el estándar de oro de estas técnicas, gracias a las cuales ha mejorado enormemente el conocimiento del genoma, contribuyendo en forma decisiva la investigación biomédica y más recientemente al diagnóstico de un sinnúmero de enfermedades (122).

En 1988 Kari Mullis (1944- 2019) describió la reacción en cadena de la polimerasa utilizando la DNA polimerasa aislada de *Thermus aquaticus*, la cual mantiene su actividad a temperaturas superiores a 75°C (123-125), que también le hiciera merecedor del premio nobel de química en 1993, su posterior automatización y la descripción de variantes (anidada, reversa, en tiempo real, multiplex, digital) permitiría contar con una herramienta muy eficiente y actualmente indispensable para el estudio del genoma en investigación biomédica.

Inicialmente estas metodologías demostraron su utilidad en patología tumoral para el estudio en muestras de tejido fresco congelado y posteriormente empezaron a aplicarse a muestras de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, con resultados progresivamente mejores en estudios genómicos y de expresión génica de tumores sólidos. En la actualidad, la principal fuente para estos estudios de diagnóstico y terapéutico son los tejidos incluidos en parafina disponibles en los archivos de los laboratorios de patología y los estudios histopatológicos continúan siendo la base para la se-

lección de material histológico para la adecuada aplicación de pruebas moleculares (126). Inicialmente se presentaron algunas dificultades para su análisis en los resultados, relacionadas con la variable representación de los tumores en las muestras por su agotamiento en los bloques de parafina, por la presencia de necrosis extensa o de áreas con preservación deficiente, que se obviaron con el desarrollo de la microdissección de tejidos (127-130), técnica que se basa en la selección de los bloques con mejor representación de los tumores con base en la observación de las preparaciones histológicas correspondientes, de los cuales se obtienen nuevos cortes más gruesos que se colorean con eosina y de los cuales se extrae manualmente el tejido con adecuada representación de los tumores, para colocarlos en tubos eppendorf y cuando las muestras son muy limitadas se extrae el tejido disponible del bloque. A partir de este material, luego de la desparafinización, se realiza la extracción de los ácidos nucleicos y posteriormente su amplificación mediante PCR y su secuenciación (131, 132). Para algunos estudios de investigación, sin embargo, las técnicas manuales no garantizan la obtención de muestras sin elementos tisulares contaminantes, por lo cual posteriormente se desarrolló la técnica de microdissección láser (133, 134), que se basa en la observación en un microscopio provisto de una cámara de video de la lámina histológica para luego delimitar el área de tejido seleccionado para estudio, el cual se corta mediante láser y luego se transfiere a un tubo eppendorf. La precisión de esta metodología incluso permite obtener células aisladas (135) para su estudio molecular, con las cuales ha sido posible develar la patogenia de neoplasias como el linfoma de Hodgkin caracterizado por la presencia de células de Reed Sterneberg o sus variantes dispersas en una población predominante de células reactivas (136, 137).

Las técnicas de microdissección, han sido incorporadas para la evaluación sistemática de factores predictivos en un número creciente de tumores sólidos avanzados, para terapia personalizada dirigida a blancos específicos con anticuerpos monoclonales y moléculas peque-

ñas, con una significativa mejoría de los resultados en sobrevida global y libre de recaída en tumores en los que antes del advenimiento de estos tratamientos, los resultados eran muy limitados.

Biopsia Líquida

La identificación de células tumorales circulantes se convirtió en un objetivo importante del estudio de la biología de las metástasis, luego ocurriría lo mismo con fragmentos circulantes de las células neoplásicas denominados exosomas, resultantes de procesos de apoptosis, para los cuales se postuló un papel importante en el precondicionamiento de los nichos metastásicos. Luego hubo un enfoque específico sobre fracciones de ácidos nucleicos libres como DNA y diferentes tipos de RNAs de células tumorales en la circulación (Figura 5);

en su sentido más amplio, el concepto de biopsia líquida, término acuñado en 2010 (138), aunque, el concepto empezara a usarse algunos años antes (139), abarca el estudio además de la sangre de otros líquidos corporales como pleural, peritoneal, cefalorraquídeo, orina etc. El estudio de estos elementos aporta información adicional sobre la heterogeneidad tumoral, por presentar frecuentemente características moleculares diferentes de los tumores primarios e incluso de las metástasis (138-140). El limitado número de estos elementos circulantes planteó un importante reto para su estudio, que llevó inicialmente al desarrollo de metodologías para su aislamiento diferencial de elementos circulantes similares provenientes de elementos celulares no neoplásicos, que se basa en el uso de métodos inmunocitoquímicos para aislar los mediante anticuerpos dirigidos contra antígenos de células epiteliales (141, 142).

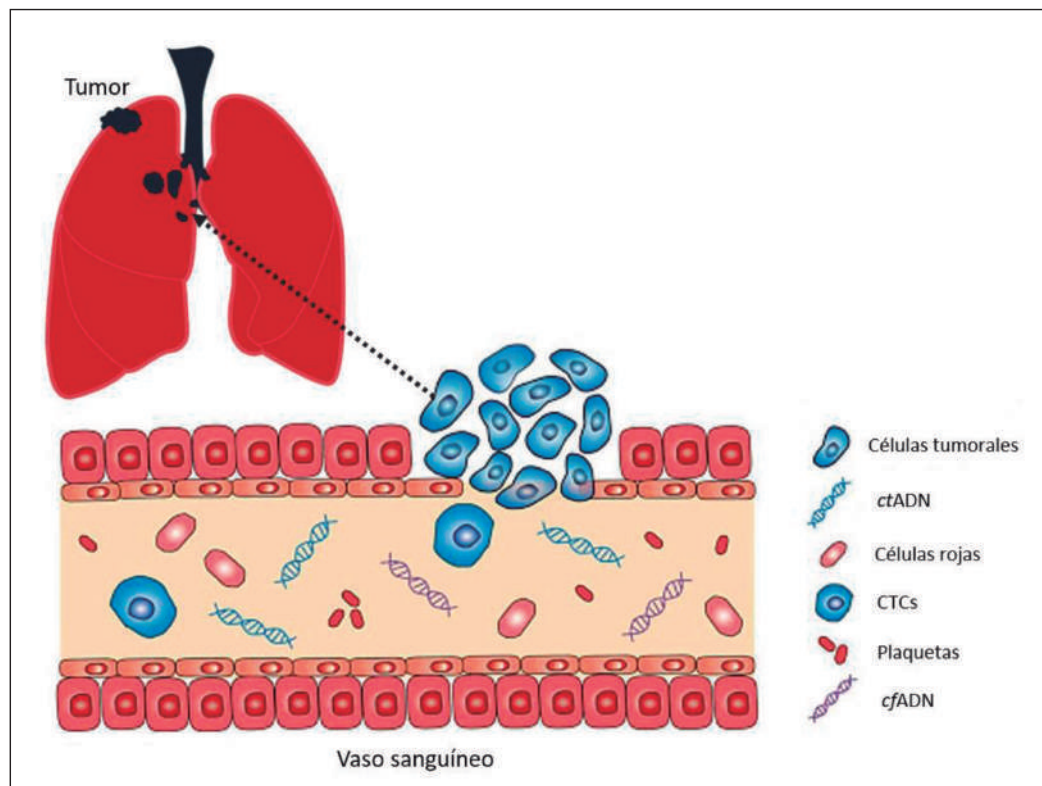


Figura 5. Representación esquemática de los elementos que se analizan en una biopsia líquida provenientes de una neoplasia pulmonar.

La evaluación de pacientes con recidivas recurrentes de neoplasias que habitualmente requieren de la obtención de varias biopsias para su demostración y la necesidad de estudiar factores asociados a resistencia al tratamiento, encontraría en el estudio de estos elementos circulantes una alternativa, que dio lugar al desarrollo de la biopsia líquida, técnica que se basa en su evaluación mediante pruebas de PCR y secuenciación profunda (143-147). Esta metodología además de sus ventajas por no ser invasiva, permite efectuar seguimiento a largo plazo de los pacientes, evaluando información genómica, transcriptómica y epigenética relacionada con la heterogeneidad tumoral, para brindar a las pacientes alternativas terapéuticas cuando se detecten nuevas alteraciones moleculares que provean a los tumores de ventajas proliferativas, de escape de la respuesta inmune o asociadas a resistencia los tratamientos (141, 142, 148).

En la actualidad la biopsia líquida ya se utiliza rutinariamente en el estudio de pacientes con tumores metastásicos de seno (149, 150), pulmón (151, 152), colon (153, 154), páncreas (155), melanomas (156) entre otros y sus indicaciones ya han empezado a ser reguladas (157).

En el futuro, incluso se plantea la posibilidad de que la biopsia líquida haga parte del abordaje diagnóstico inicial de pacientes con cáncer junto con las biopsias de tejidos, e inclusive reemplazándolas en algunas situaciones como tumores de difícil acceso (142, 158, 159).

Referencias

1. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Exper Biol Med*. 1941;47(2):200-2.
2. Taylor CR. Immunoenzyme techniques and their application to diagnostic studies. *Ann N Y Acad Sci*. 1983;420:115-26.
3. Huang SN, Minassian H, More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest*. 1976;35(4):383-90.
4. Nakane PK, Pierce GB, Jr. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol*. 1967;33(2):307-18.
5. Mason TE, Phifer RF, Spicer SS, Swallow RA, Dreskin RB. An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J Histochem Cytochem*. 1969;17(9):563-9.
6. Avrameas S. Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immuno-histochemistry. *Histochem J*. 1972;4(4):321-30.
7. Taylor CR, Burns J. The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labeled antibody. *J Clin Pathol*. 1974;27(1):14-20.
8. Pinkus GS. Diagnostic immunocytochemistry of paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol*. 1982;13(5):411-5.
9. Burns J. Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. *Histochemistry*. 1975;43(3):291-4.
10. Taylor CR. An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 1994;25(1):2-11.
11. Burry RW. Specificity controls for immunocytochemical methods. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(2):163-6.
12. Torlakovic EE, Nielsen S, Francis G, Garratt J, Gilks B, Goldsmith JD et al. Standardization of positive controls in diagnostic immunohistochemistry: recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(1):1-18.
13. Torlakovic EE, Francis G, Garratt J, Gilks B, Hyjek E, Ibrahim M et al. Standardization of negative controls in diagnostic immunohistochemistry: recommendations from the international ad hoc expert panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22(4):241-52.
14. Mason JT, O'Leary TJ. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem*. 1991;39(2):225-9.
15. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1016-9.
16. Leong AS, Gilham PN. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology*. 1989;21(4):266-8.
17. Vincek V, Nassiri M, Nadji M, Morales AR. A Tissue Fixative that Protects Macromolecules (DNA, RNA, and Protein) and Histomorphology in Clinical Samples. *Lab Invest*. 2003;83(10):1427-35.
18. Wester K, Asplund A, Bäckvall H, Micke P, Derveniece A, Hartmane I et al. Zinc-based fixative improves preservation of genomic DNA and proteins in histoprocessing of human tissues. *Lab Invest*. 2003;83(6):889-99.
19. Shitubani M, Uneyama C, Miyazaki K, Toyoda K, Hirose M. Methacarn Fixation: A Novel Tool for Analysis of Gene

- Expressions in Paraffin-Embedded Tissue Specimens. *Lab Invest.* 2000;80(2):199-208.
20. Prentø P, Lyon H. Commercial formalin substitutes for histopathology. *Biotech Histochem.* 1997;72(5):273-82.
 21. Sternberger LA, Hardy PH, Jr., Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970;18(5):315-33.
 22. DeLellis RA, Sternberger LA, Mann RB, Banks PM, Nakane PK. Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Report of a workshop sponsored by the National Cancer Institute. *Am J Clin Pathol.* 1979;71(5):483-8.
 23. Hsu SM, 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.* 1981;29(4):577-80.
 24. Levsky JM, Singer RH. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 14):2833-8.
 25. Streefkerk JG. Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J Histochem Cytochem.* 1972;20(10):829-31.
 26. Weir E, Pretlow T, Pitts A, Williams EE. Destruction of endogenous peroxidase activity in order to locate cellular antigens by peroxidase-labeled antibodies. *J Histochem Cytochem.* 1974;22:51 - 4.
 27. Andrew SM, Jasani B. An improved method for the inhibition of endogenous peroxidase non-deleterious to lymphocyte surface markers. Application to immunoperoxidase studies on eosinophil-rich tissue preparations. *Histochem J.* 1987;19(8):426-30.
 28. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.* 1984;32(2):219-29.
 29. Wagner L, Worman CP. Color-contrast staining of two different lymphocyte subpopulations: a two-color modification of alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase complex technique. *Stain Technol.* 1988;63(3):129-36.
 30. Kuhlmann WD, Peschke P. Glucose oxidase as label in histological immunoassays with enzyme-amplification in a two-step technique: coimmobilized horseradish peroxidase as secondary system enzyme for chromogen oxidation. *Histochemistry.* 1986;85(1):13-7.
 31. Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol.* 1978;31(5):454-60.
 32. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry.* 1971;8(11):1081-3.
 33. Krenács T, Lászik Z, Dobó E. Application of immunogold-silver staining and immunoenzymatic methods in multiple labelling of human pancreatic Langerhans islet cells. *Acta Histochem.* 1989;85(1):79-85.
 34. ADL. DP, Mukdsi J, JP. P, Gutiérrez S, AA. Q, CA M et al. Immunoelectron Microscopy: A Reliable Tool for the Analysis of Cellular Processes. En: IntechOpen, editor. *Applications of Immunohistochemistry*; 2011.
 35. Park C-H, Kim H, Chang B-J, Lee S, Chang B, Bae C-S et al. Overview of Immunoelectron Microscopy. *Appl Microsc.* 2018;48:87-95.
 36. Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. The reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J Am Chem Soc.* 1948;70(8):2673-84.
 37. Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. Reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups. *J Biol Chem.* 1948;174(3):827-43.
 38. Huang SN. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab Invest.* 1975;33(1):88-95.
 39. Battifora H, Kopinski M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J Histochem Cytochem.* 1986;34(8):1095-100.
 40. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-7.
 41. Taylor CR. The total test approach to standardization of immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):945-51.
 42. Swaab DF, Pool CW, Van Leeuwen FW. Can specificity ever be proved in immunocytochemical staining. *J Histochem Cytochem.* 1977;25(5):388-91.
 43. Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, Alsabeh R, Fulton RS, Goldsmith JD et al. Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays: Guideline From the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(11):1432-43.
 44. Fetsch PA, Abati A. Overview of the Clinical Immunohistochemistry Laboratory: Regulations and Troubleshooting Guidelines. En: Javois LC, editor. *Immunocytochemical Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 1999.
 45. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE

- specimen? Arch Pathol Lab Med. 2014;138(11):1520-30.
46. Wester K, Wahlund E, Sundström C, Ranefall P, Bengtsson E, Russell PJ et al. Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2000;8(1):61-70.
 47. Xie R, Chung JY, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. J Histochem Cytochem. 2011;59(4):356-65.
 48. Leong A, Millos J. An Assessment of the Efficacy of the Microwave Antigen-Retrieval Procedure on a Range of Tissue Antigens. Appl Immunohistochem. 1993;1(4):267-74.
 49. Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. J Histochem Cytochem. 1995;43(2):193-201.
 50. Shi S, Cote R, Taylor C. Standardization and further development of antigen retrieval immunohistochemistry: Strategies and future goals. J Histotechnol. 1999;22:177-92.
 51. Grabau D, Nielsen O, Hansen SR, Nielsen MM, nkholm A-VL, Knoop A et al., editores. Influence of Storage Temperature and High-Temperature Antigen Retrieval Buffers on Results of Immunohistochemical Staining in Sections Stored for Long Periods; 1998.
 52. Taylor CR, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C, Cote RJ. Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer. Biotech Histochem. 1996;71(5):263-70.
 53. Heras A, Roach CM, Key ME. Enhanced Polymer Detection System for Immunohistochemistry. Lab Invest. 1995;72(1):A165-A.
 54. Vyberg M, Nielsen SR, editores. Dextran Polymer Conjugate Two-Step Visualization System for Immunohistochemistry: A Comparison of EnVision+ With Two Three-Step Avidin-Biotin Techniques; 1998.
 55. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C et al. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, Chem-Mate, CSA, LABC, and SABC techniques. J Clin Pathol. 1998;51(7):506-11.
 56. Yaziji H, Taylor CR, Goldstein NS, Dabbs DJ, Hammond EH, Hewlett B et al. Consensus recommendations on estrogen receptor testing in breast cancer by immunohistochemistry. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2008;16(6):513-20.
 57. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. J Clin Oncol. 1999;17(5):1474-81.
 58. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. J Clin Pathol. 2000;53(9):688-96.
 59. Yaziji H, Taylor CR. Begin at the beginning, with the tissue! The key message underlying the ASCO/CAP Task-force Guideline Recommendations for HER2 testing. Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM. 2007;15(3):239-41.
 60. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007;25(1):118-45.
 61. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. Histopathology. 2006;49(4):411-24.
 62. Taylor CR. Quantifiable internal reference standards for immunohistochemistry: the measurement of quantity by weight. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2006;14(3):253-9.
 63. Herman GE, Elfont EA, Floyd AD. Overview of automated immunostainers. Methods Mol Biol. 1994;34:383-403.
 64. Le Neel T, Moreau A, Laboisie C, Truchaud A. Comparative evaluation of automated systems in immunohistochemistry. Clin Chim Acta. 1998;278(2):185-92.
 65. Moreau A, Néel TL, Joubert M, Truchaud A, Laboisie C. Approach to automation in immunohistochemistry. Clin Chim Acta. 1998;278 2:177-84.
 66. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. Adv Anat Pathol. 2017;24(6):311-35.
 67. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part

- 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(5):235-51.
68. Gorris MAJ, Halilovic A, Rabold K, van Duffelen A, Wickramasinghe IN, Verweij D et al. Eight-Color Multiplex Immunohistochemistry for Simultaneous Detection of Multiple Immune Checkpoint Molecules within the Tumor Microenvironment. *J Immunol*. 2018;200(1):347-54.
69. Klauschen F, Müller KR, Binder A, Bockmayr M, Hägele M, Seegerer P, et al. Scoring of tumor-infiltrating lymphocytes: From visual estimation to machine learning. *Semin Cancer Biol*. 2018;52(Pt 2):151-7.
70. H. R. Tumors of the hematopoietic system. In: *Atlas of Tumor Pathology*. Washington D.C: Armed Institute of Pathology 1966.
71. Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*. 1974;34(4 Suppl):suppl:1488-503.
72. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*. 1982;49(10):2112-35.
73. Bernard A, Boumsell L. The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Hum Immunol*. 1984;11(1):1-10.
74. Subcommittee I-WN. Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens defined on human leukocyte populations. IUIS-WHO Nomenclature Subcommittee. *Bull World Health Organ*. 1984;62(5):809-15.
75. C.R. T, R.J. C. Tumors of unknown origin. En: C.R T, editor. *Immunomicroscopy A diagnostic tool for the Surgical Pathologist Major Problems in Pathology*. 3 ed: Saunders; 2006.
76. D.J. D. Immunohistology of metastatic carcinoma of unknown primary site. En: R. B, D.J. D, editores. *Diagnostic immunohistochemistry. Theranostic and Genomic Applications*. 5 ed: Elsevier; 2019.
77. Hofman V, Lassalle S, Bence C, Long-Mira E, Nahon-Estève S, Heeke S et al. Any Place for Immunohistochemistry within the Predictive Biomarkers of Treatment in Lung Cancer Patients? *Cancers (Basel)*. 2018;10(3):70.
78. Gu J, Taylor CR. Practicing pathology in the era of big data and personalized medicine. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM*. 2014;22(1):1-9.
79. Taylor CR. Predictive biomarkers and companion diagnostics. The future of immunohistochemistry: "in situ proteomics," or just a "stain"? *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2014;22(8):555-61.
80. Yuan J, Hegde PS, Clynes R, Foukas PG, Harari A, Kleen TO et al. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2016;4(1):3.
81. Fisher B, Redmond C, Brown A, Wickerham DL, Wolmark N, Allegra J et al. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1983;1(4):227-41.
82. Lerner LJ, Jordan VC. Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture. *Cancer Res*. 1990;50(14):4177-89.
83. Jordan VC. Tamoxifen: a personal retrospective. *Lancet Oncol*. 2000;1(1):43-9.
84. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2(5):561-6.
85. Goldman JM, Druker BJ. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood*. 2001;98(7):2039-42.
86. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
87. Hanna WM, Hammond E, Taylor CR, Dabbs DJ, Penault-Llorca F, Bloom KJ et al. Re: High concordance between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization testing for HER2 status in breast cancer requires a normalized IHC scoring system. *Mod Pathol*. 2008;21(10):1278-80; author reply 80-1.
88. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-92.
89. Foran JM, Cunningham D, Coiffier B, Solal-Celigny P, Reyes F, Ghielmini M et al. Treatment of mantle-cell lymphoma with Rituximab (chimeric monoclonal anti-CD20 antibody): analysis of factors associated with response. *Ann Oncol*. 2000;11 Suppl 1:117-21.
90. *In Vitro Diagnostics [Internet]*. U.S. Food and Drug Administration. 2016 [consultado 09 noviembre 2020]. Disponible en: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm301431.htm>.
91. Matos LLd, Trufelli DC, de Matos MGL, da Silva Pinalhal MA. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights*. 2010;5:9-20.
92. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. 1962;8:65-6.
93. J. R. Chromosomes in leukemia and lymphoma. *Seminars in Hematology*. 1978;15(3):301-19.

94. Watson JD, Crick FHC. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature*. 1953;171(4361):964-7.
95. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-8.
96. van der Ploeg M. Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. *Eur J Histochem*. 2000;44(1):7-42.
97. Smeets DF. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem*. 2004;37(6):439-46.
98. Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*. 2005;6(10):782-92.
99. Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Osamura RY, Rüschoff J, et al. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(4):539-48.
100. Gall JG. The origin of in situ hybridization - A personal history. *Methods*. 2016;98:4-9.
101. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969;63(2):378-83.
102. John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*. 1969;223(5206):582-7.
103. Buongiorno-Nardelli M, Amaldi F. Autoradiographic detection of molecular hybrids between RNA and DNA in tissue sections. *Nature*. 1970;225(5236):946-8.
104. Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res*. 1980;128(2):485-90.
105. Wilcox JN. Fundamental principles of in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*. 1993;41(12):1725-33.
106. Jensen E. Technical review: In situ hybridization. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014;297(8):1349-53.
107. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1467-72.
108. Park K, Han S, Kim J-Y, Kim H-J, Kwon JE, Gwak G. Silver-Enhanced In Situ Hybridization as an Alternative to Fluorescence In Situ Hybridization for Assaying HER2 Amplification in Clinical Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2011;14(4):276-82.
109. Pedersen M, Rasmussen BB. The correlation between dual-color chromogenic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization in assessing HER2 gene amplification in breast cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2009;18(2):96-102.
110. Gulley ML, Glaser SL, Craig FE, Borowitz M, Mann RB, Shema SJ et al. Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(2):259-67.
111. Cook JR. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol*. 2004;13(4):197-206.
112. Liu Y, Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2019;94(5):604-16.
113. Ting C-Y, Chang K-M, Kuan J-W, Sathar J, Chew L-P, Wong O-LJ et al. Clinical Significance of BCL2, C-MYC, and BCL6 Genetic Abnormalities, Epstein-Barr Virus Infection, CD5 Protein Expression, Germinal Center B Cell/Non-Germinal Center B-Cell Subtypes, Co-expression of MYC/BCL2 Proteins and Co-expression of MYC/BCL2/BCL6 Proteins in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Clinical and Pathological Correlation Study of 120 Patients. *Int J Med Sci*. 2019;16(4):556-66.
114. Ma Z, Niu J, Cao Y, Pang X, Cui W, Zhang W et al. Clinical significance of 'double-hit' and 'double-expression' lymphomas. *J Clin Pathol*. 2020;73(3):126-38.
115. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, Lopez-Rios F, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch*. 2012;461(3):245-57.
116. Schildhaus HU, Deml KF, Schmitz K, Meiboom M, Binot E, Hauke S, et al. Chromogenic in situ hybridization is a reliable assay for detection of ALK rearrangements in adenocarcinomas of the lung. *Mod Pathol*. 2013;26(11):1468-77.
117. Luk PP, Selinger CI, Cooper WA, Mahar A, Palme CE, O'Toole SA, et al. Clinical Utility of In Situ Hybridization Assays in Head and Neck Neoplasms. *Head Neck Pathol*. 2019;13(3):397-414.
118. Ferrara G, De Vanna AC. Fluorescence In Situ Hybridization for Melanoma Diagnosis: A Review and a Reappraisal. *Am J Dermatopathol*. 2016;38(4):253-69.
119. Tanas MR, Goldblum JR. Fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of soft tissue neoplasms: a review. *Adv Anat Pathol*. 2009;16(6):383-91.
120. Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo AE, Gaire F, Farrell M et al. Development of automated bright-field double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diagn Pathol*. 2008;3:41121.

121. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.
122. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1-8.
123. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51(Pt 1):263-73.
124. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
125. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990;262(4):56-61, 4-5.
126. Nathwani BN, Sasu SJ, Ahsanuddin AN, Hernandez AM, Drachenberg MR. The critical role of histology in an era of genomics and proteomics: a commentary and reflection. *Adv Anat Pathol.* 2007;14(6):375-400.
127. Eltoun IA, Siegal GP, Frost AR. Microdissection of histologic sections: past, present, and future. *Adv Anat Pathol.* 2002;9(5):316-22.
128. Hunt JL, Finkelstein SD. Microdissection techniques for molecular testing in surgical pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2004;128(12):1372-8.
129. Espina V, Heiby M, Pierobon M, Liotta LA. Laser capture microdissection technology. *Expert Rev Mol Diagn.* 2007;7(5):647-57.
130. Going J. Histological microdissection in diagnostic and investigative pathology. *Diagnostic Histopathology.* 2010;16:43-8.
131. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;130(1):118-26.
132. Bianchi AB, Navone NM, Conti CJ. Detection of loss of heterozygosity in formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 1991;138(2):279-84.
133. Going JJ, Lamb RF. Practical histological microdissection for PCR analysis. *J Pathol.* 1996;179(1):121-4.
134. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR et al. Laser capture microdissection. *Science.* 1996;274(5289):998-1001.
135. Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, Steeb M, Zengerle R, Koltay P. Technologies for Single-Cell Isolation. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):16897-919.
136. d'Amore F, Stribley JA, Ohno T, Wu G, Wickert RS, Delabie J et al. Molecular studies on single cells harvested by micromanipulation from archival tissue sections previously stained by immunohistochemistry or nonisotopic in situ hybridization. *Lab Invest.* 1997;76(2):219-24.
137. Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol.* 2000;53(9):666-72.
138. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med.* 2010;16(9):398-406.
139. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(8):781-91.
140. Francis G, Stein S. Circulating Cell-Free Tumour DNA in the Management of Cancer. *Int J Mol Sci.* 2015;16(6):14122-42.
141. Finotti A, Allegretti M, Gasparello J, Giacomini P, Spanidos DA, Spoto G et al. Liquid biopsy and PCR-free ultrasensitive detection systems in oncology (Review). *Int J Oncol.* 2018;53(4):1395-434.
142. Fernández-Lázaro D, Hernández JLG, García AC, Castillo ACD, Hueso MV, Cruz-Hernández JJ. Clinical Perspective and Translational Oncology of Liquid Biopsy. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(7):443.
143. Cappelletti V, Appierto V, Tiberio P, Fina E, Callari M, Daidone MG. Circulating Biomarkers for Prediction of Treatment Response. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2015;2015(51):60-3.
144. von Bubnoff N. Liquid Biopsy: Approaches to Dynamic Genotyping in Cancer. *Oncol Res Treat.* 2017;40(7-8):409-16.
145. Arneith B. Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *BMC Cancer.* 2018;18(1):527.
146. Bennett CW, Berchem G, Kim YJ, El-Khoury V. Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer. *Oncotarget.* 2016;7(43):71013-35.
147. Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* 2019;570(7761):385-9.
148. Wang J, Chang S, Li G, Sun Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Front Med.* 2017;11(4):522-7.
149. Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet.* 2019;95(6):643-60.
150. Koch C, Kuske A, Joosse SA, Yigit G, Sflomos G, Thaler S et al. Characterization of circulating breast cancer cells with tumorigenic and metastatic capacity. *EMBO Mol Med.* 2020;12(9):e11908.
151. Johann DJ, Jr., Steliga M, Shin IJ, Yoon D, Arnaoutakis K, Hutchins L et al. Liquid biopsy and its role in an advanced clinical trial for lung cancer. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018;243(3):262-71.
152. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanché H et al. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept

- study from BioCAST/IFCT-1002. Clin Cancer Res. 2014;20(17):4613-24.
153. Wills B, Gorse E, Lee V. Role of liquid biopsies in colorectal cancer. Curr Probl Cancer. 2018;42(6):593-600.
154. Marcuello M, Vymetalkova V, Neves RPL, Duran-Sanchon S, Vedeld HM, Tham E et al. Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer. Mol Aspects Med. 2019;69:107-22.
155. Gao Y, Zhu Y, Yuan Z. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA Provide New Insights into Pancreatic Cancer. Int J Med Sci. 2016;13(12):902-13.
156. Gray ES, Reid AL, Bowyer S, Calapre L, Siew K, Pearce R, et al. Circulating Melanoma Cell Subpopulations: Their Heterogeneity and Differential Responses to Treatment. J Invest Dermatol. 2015;135(8):2040-8.
157. Strotman LN, Millner LM, Valdes R, Jr., Linder MW. Liquid Biopsies in Oncology and the Current Regulatory Landscape. Mol Diagn Ther. 2016;20(5):429-36.
158. Siravegna G, Mussolin B, Venesio T, Marsoni S, Seoane J, Dive C et al. How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. Ann Oncol. 2019;30(10):1580-90.
159. Rossi G, Ignatiadis M. Promises and Pitfalls of Using Liquid Biopsy for Precision Medicine. Cancer Res. 2019;79(11):2798-804.

Recibido: Noviembre 13, 2020

Aceptado: Diciembre 15, 2020

Correspondencia:

María del Pilar Archila-Gomez
archilapilar@yahoo.com