

INMUNOCITOQUIMICA MARCADORES EPITELIALES

Dra. Rafaela Josefina Sierra A.*

INMUNOCITOQUIMICA

Método que permite la identificación de un antígeno específico en un determinado tejido normal o patológico, para lo cual se aplica un anticuerpo el cual ha sido generado en reacción a ese antígeno y luego es marcado con fluorescentes químicos o enzimas (inmunoperoxidasas) y usado como tinción tisular en presencia de un cromógeno (diaminobencidina o ethil carbazol), el cual precipitará dando color a la reacción en caso de que el anticuerpo identifique el antígeno buscado. Son mucho más específicos y más sensibles que los métodos histoquímicos convencionales.

La técnica de inmunoperoxidasa usa como marcador la peroxidasa de rábano y comprende varios métodos.^{20,21}

1.- **Directo:** cuando el anticuerpo primario (A-P) se marca con peroxidasa. (A-P: se refiere al anti-

cuerpo que rastrea el antígeno estudiado).

2.- **Indirecto:** no se marca el A-P sino un segundo anticuerpo (A-S), lo cual aumenta la sensibilidad de la reacción.

3.- **Peroxidasa Antiperoxidasa:** el A-P y A-S no son marcados y el tercer reagente es un complejo peroxidasa-antiperoxidasa (C.P.A.P.); el A-S actúa como un puente entre A-P y el C.P.A.P. Este último método ha tenido gran aceptación y uso.

4.- **Método del Complejo Auidina Biotina (A.B.C.).**

5.- **Método de la Fosfatasa Alcalina-Antifosfatasa Alcalina (A-P - A.A.P.)-**

Las técnicas de inmunoperoxidasa ofrecen las siguientes ventajas:

a) Se usan en tejidos previamente fijados en formol e incluidos en parafina, por lo tanto, permiten hacer estudios retrospectivos.

b) No requieren equipos técnicos sofisticados para su realización; una vez obtenida la tinción, la

lámina puede ser visualizada con microscopio convencional de luz.

c) Permite conocer la histogénesis de una determinada lesión tumoral indiferenciada; si se reconoce la sustancia elaborada por una célula (antígeno) se puede deducir qué tipo de célula es, aún cuando esté desdiferenciada.

d) Debido a que permite en la gran mayoría de los casos usar tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, los detalles celulares se conservan, de manera que combina morfología con histogénesis.

e) La lámina obtenida puede archivar-se como la procesada por la rutina H x E y/o histoquímica.

f) Existen ya en el mercado numerosos anticuerpos policlonales o monoclonales usados en esta técnica.

Los anticuerpos monoclonales son obtenidos mediante hibridomas y los policlonales inmunizando un animal (usualmente un conejo) con un antígeno; el sue-

* Profesor Asociado, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

ro del animal es recolectado y purificado mediante procesos previamente establecidos.⁸

El uso de estos anticuerpos mediante esta técnica ha permitido la identificación de antígenos marcadores para las diferentes estructuras de la piel y sus neoplasias derivadas, benignas y malignas.

PROTEINA S-100

Es una proteína ácida unida al calcio. Fue detectada por primera vez en el cerebro de mamíferos; su nombre refleja la solubilidad en 100% de sulfato de amonio.

Está compuesta por dos subunidades: S-100a y S-100b, las cuales tienen un peso molecular de 20,907 y 21,014 Daltons respectivamente. Hoy se conoce bien su estructura, pero poco se sabe de su función.

Localización: melanocitos, células de Langerhans, células de Schwann y glándulas sudoríparas (porción de acinos - ecrinos) y las neoplasias benignas de estas células. 1,12,20

Ha sido expresada por varias neoplasias melanocíticas. Con excepción del nevus azul todos los nevus melanocíticos y melanomas se tiñen positivamente. En melanomas es positiva, tanto para los de células poligonales como fusiformes y en melanomas amelanóticos; de particular importancia ha sido su demostración en melanomas desmoplásticos, donde no sólo ha permitido identificar los melanocitos atípicos dentro de un estroma fibroso, sino también observar la profundidad de la invasión del tumor a la dermis y tejido celular subcutáneo." En histiocitosis X (Enfermedad de Letterer, Siwe y Granuloma Multifocal Eosinofílico), tanto las células mononucleares como multinucleadas se tiñen positivamente, por lo que ha permitido saber que la célula componente de esta neoplasia es la célula de Langerhans; posteriormente, esto ha sido confirmado con la aplicación OKT6 más específico para estas células. 1,20

ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNARIO

Es un antígeno oncofetal y un complejo polisacárido proteico; normalmente no es expresado por células maduras, pero en ciertas circunstancias los genes que controlan su síntesis sufren una desrepresión, siendo el antígeno entonces, producido nuevamente. Ha sido encontrado en el plasma de pacientes con: neoplasias derivadas del endodermo, con diversas hepatopatías y cáncer hepático, en fumadores y en tejidos fetales. En piel se ha identificado en glándulas ecrinas y apocrinas, y sus neoplasias; en estas estructuras se dispone, en especial, hacia las células que rodean el lumen y en los ductos la cutícula o glicocálix lo expresan intensamente.¹⁹

Pennys y co1.¹⁵ pudieron mostrar lo anterior en un survey de neoplasias benignas de origen glandular sudoríparo; estos autores reportan que dichas neoplasias mostraron CEA en las células adyacentes al lumen y en el propio lumen. La tinción fue más intensa hacia la cutícula o glicocálix, por lo tanto, siringoma neoplasia originada de ductos fue particularmente teñida de manera prominente; las neoplasias relativamente celulares, como espiadenoma, cilindroma y poroma ecrino mostraron un patrón de tinción disperso. Los ductos que pasan a través de estos tumores, frecuentemente, tienen la morfología de ductos ecrinos y muestran un patrón de tinción parecida a la de ductos normales, por lo que hipotetizan que estos podrían pasar por el tumor, pero sin que, necesariamente, formaran parte de él.

Hidrocistoma, siringocistoadenoma papilífero, siringoma condroide e hidradenoma de células claras mostraron tinción prominente.^{15,19}

Otro estudio interesante usando CEA y realizado también por Pennys Col.^{11,12,15} ha sido su aplicación en a enfermedad de Paget, extramamario y mamario. La hipótesis inicial que estos investigadores se

plantearon es que esta enfermedad representaba un adenocarcinoma y podría, en consecuencia, contener CEA en las células claras ubicadas en la epidermis, tanto en la variedad mamaria como extramamaria; no así en el resto de los queratinocitos. Esto fue confirmado en el estudio.

La función de CEA en glándulas sudoríparas es desconocida. Ya que CEA es una glicoproteína, debería ser Pas-Schiff positiva, como lo es también la cutícula de los ductos que, a su vez, expresa intensamente CEA; por lo que cabe suponer que debería formar parte del glicocálix. En consecuencia los mencionados autores concluyen que CEA, probablemente, no sea un verdadero antígeno oncofetal, sino un componente normal de glándulas sudoríparas y que la sobreproducción de CEA por una neoplasia puede representar la elaboración de un constituyente celular normal por las células neoplásicas glandulares de forma aumentada y no necesariamente la desrepresión de un gen fetal.

En carcinomas sudoríparos el estudio realizado por E. Riveiro Da Gloriat⁹ mostró que había una positividad polar o difusa de una manera inconstante. Otros anticuerpos monoclonales diferentes a los que reconocen CEA en glándulas sudoríparas pueden mostrar parte excretora de glándulas ecrinas (ASH-8) y apocrinas (GCDFP-15-lisozima) y una porción de glándulas ecrinas (D-47; EKH-5); pero se requieren otros estudios futuros para confirmar su validez o no en el diagnóstico diferencial entre carcinomas sudoríparos y adenocarcinomas metastásicos a piel.

QUERATINA/CITOQUERATINAS

Originalmente se pensó que eran limitadas a epitelios queratinizados, pero estudios inmunohistoquímicos han demostrado su presencia en células epiteliales no queratinizadas como las células epiteliales de órganos internos. Queratinas y citoqueratinas se conocen como una gran familia de relacionados polipéptidos,

codificados por múltiples genes; han sido identificadas citoqueratinas en todas las células epiteliales. La queratina epidérmica forma un grupo distinto, bioquímica e histológicamente, y las citoqueratinas de epitelio no estratificado forman otro grupo pero comparten determinantes antigénicos con la epidermis. Diecinueve (19) tipos de queratinas han sido identificadas, cuyos pesos moleculares varían entre 40.000 y 68.000 daltons, y su distribución varía en diferentes epitelios.

La queratina aislada de epitelios queratinizados, tales como callos plantares y casco de ganado ha sido utilizada para elaborar anticuerpos antiqueratina; el resultante es un anticuerpo policlonal que ha demostrado una amplia reactividad en inmunohistología y reconoce epitelios escamosos, mioepitelio y algunos epitelios glandulares, por ejemplo del tracto gastrointestinal. Anticuerpos elaborados contra queratina epidérmica tienen una reactividad limitada; ellos reconocen solamente células basales y suprabasales, pero no detectan hepatocitos, células tubulares renales, células acinares de glándulas salivales y páncreas. La tinción negativa de estas células, consideradas como epiteliales, ha inducido a que se aislen polipéptidos queratoides de los residuos del citoesqueleto de estas células y elaborar anticuerpos contra ellos, lo cual ha revelado que hepatocitos, células tubulares renales, acinos salivares y páncreas tengan un patrón distinto de citoqueratina.

Anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades han sido ampliamente usados en inmunohistoquímica. Estos anticuerpos pueden tener una amplia reactividad con muchos polipéptidos de queratina o pueden reconocer una sola clase de polipéptidos. La diversidad de polipéptidos de queratina expresados en diferentes epitelios hace necesario que anticuerpos antiqueratinas, con un amplio espectro de reactividad, o un set de diferentes tipos de anticuerpos, deban ser usados para la evaluación de la naturaleza epitelial

en neoplasias. Por otra parte, deberían lograrse anticuerpos con una especificidad más estricta para la subtipificación de carcinomas.

Hasta ahora el carcinoma espinocelular demuestra una constante positividad cuando se usa antiqueratina epidérmica en inmunohistoquímica, pero otros anticuerpos como los anticitoqueratinas no reaccionan con células epidérmicas, por lo tanto, no marcan carcinomas escamosos; estos anticuerpos anticitoqueratinas reaccionan con epitelios simples. En conclusión, existen varios tipos de anticuerpos antiqueratina: los que marcan epitelio escamoso (anticuerpos antiqueratina epidérmica) y los que marcan epitelios simples (anticuerpos anticitoqueratinas). La queratina epidérmica (sus polipéptidos) ha sido evaluada en cáncer escamoso de la piel (invasivos y no invasivos), encontrándose diferencias en cuanto al peso molecular; sería de sumo interés la evaluación inmunohistoquímica de los polipéptidos de queratina para conocer el grado de invasión.⁹ Los carcinomas escamosos de piel algunas veces, exhiben un aspecto fusiforme haciendo difícil evaluar su naturaleza epitelial; la demostración de queratina mediante inmunohistoquímica ha sido de gran valor para diferenciarlos de melanoma de células fusiformes y sarcomas, los cuales se marcan con S100 y vimentina, respectivamente.⁹ En cuanto se refiere a epitelios glandulares, estudios realizados en glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas, la tinción fue difusa en las células ductales, incrementándose hacia la zona del lumen pero expresándose poca tinción en cutícula o glicocálix. En neoplasias de las glándulas sudoríparas se observó una tinción difusa en espiroadenoma, poroma ecrino, hidroadenoma y adenoma pleomórfico. En siringoma y cilindroma la tinción fue intensa pero parcial; los depósitos hialinos de cilindroma no contienen queratina. Cuando la neoplasia mostraba muchos espacios quísticos ductales la tinción se mostró más intensa hacia el espacio ductal, tal como se obser-

vó en hidrocistoma y siringocistoadenoma papilífero.^{10,19,20}

Las queratinas / citoqueratinas forman parte de los filamentos intracitoplasmáticos los cuales mantienen la forma del citoesqueleto celular; son clasificados de acuerdo a su tamaño en cortos, largos e intermedios. Los filamentos intermedios son los más prevalentes en dermatopatología y comprenden además de queratina: vimentina, desmina, neurofilamentos y proteína ácida fibrilar glial.

- 1.- **Vimentina:** se encuentra en células mesenquimales y sus neoplasias. También se expresa en melanocitos y células de Langerhans; conjuntamente con queratina ha permitido diferenciar, en algunos casos, sarcoma epiteloide de granuloma anular.
- 2.- **Desmina:** se expresa en músculo esquelético, cardíaco y musculatura lisa.^{8,20}
- 3.- **Neurofilamentos:** son expresados por células y neoplasias con diferenciación neuroectodérmica y neuroendocrina. Se encuentran en tumor de Merkel.
- 4.- **Proteína ácida fibrilar glial (G.F.A.P.):** en astrocitos y células ependimarias.

ANTÍGENOS DE MEMBRANA

Ciertos antígenos son expresados en la superficie de células normales y neoplásicas; ellos son, además del ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA) ya comentado, el ANTIGENO DE MEMBRANA EPITELIAL (EMA), el MARCADOR LEUCOCITARIO (LEU7 y LEU-M1) y el ANTIGENO LEUCOCITARIO COMUN (LCA).

- 1.- **Antígeno de Membrana Epitelial (EMA):** Se encuentra en la superficie epitelial de varios epitelios glandulares y sus neoplasias. El carcinoma escamoso expresa EMA, pero no así el epitelio escamoso normal.⁸ Marca glándulas sudoríparas y sebáceas en el polo apical¹⁹ y células de enfermedad de Paget extramamaria.¹⁸

2.- **Antígeno Leucocitario Común (LCA):** es un marcador para células hematopoyéticas. Existe un anticuerpo monoclonal comercialmente disponible que permite diferenciar infiltrados linfoides que expresan LCA de infiltrados epiteliales que no se marcan.⁸

MARCADORES LEUCOCITARIOS (LEU7 - LEU M1)

- 1.- **LEU-7:** Se encuentran en leucocitos. Antígeno de superficie en células "asesinas naturales" (HNK-1). Reaccionan también con células de Schawann, con glándulas sudoríparas ecrinas, apocrinas y sus neoplasias derivadas como hidradenoma papilífero, siringocistoadenoma papilífero y siringoma condroide. Se tiñen de manera difusa, tanto en la parte ductal como acinar.^{8,19}
- 2.- **LEU M-1:** Glicoproteína encontrada en granulocitos, monocitos, células de Red-Stemberg, algunas células epiteliales, glándulas sudoríparas y sus neoplasias.⁸

LECTINAS

Son glicoproteínas animales y vegetales que se unen a carbohidratos específicos en las membranas plasmáticas de células endoteliales y epiteliales. Comprenden:

- 1.- **ULEX EUROPEUS AGGLUTININ -1 (UEA-1):** Reacciona con -L fucosa que se encuentra en la membrana plasmática de células endoteliales y queratinocitos, por lo tanto, es un marcador para células endoteliales y sus neoplasias benignas, pero no para las malignas. Se une también a los antígenos de grupo sanguíneo A-B y H expresados en varias células epiteliales.^{8,20}
- 2.- **PEANUT AGGLUTININ (PNA):** Reacciona con galactosa B(1-3)N acetil galactosamina presente en la membrana plasmática de queratinocitos normales y componentes de neoplasias escamo-

sas benignas, como queratocantoma. No se expresa en Bowens ni en carcinoma escamoso.^{8,20}

LISOZIMAS

Es un elemento bacteriolítico con una estructura estable. Se encuentra en células monohistiocíticas, neutrófilos y algunas células epiteliales, y en los infiltrados histiocíticos cuando tienen una función fundamentalmente macrofágica. Otros marcadores monohistiocíticos incluyen el alfa-antitripsina, alfa-antiquimiotripsina y lectinas. Recientemente alfa-antiquimiotripsina y lectinas se han estudiado como marcadores confiables para histiocitos neoplásicos malignos.⁸

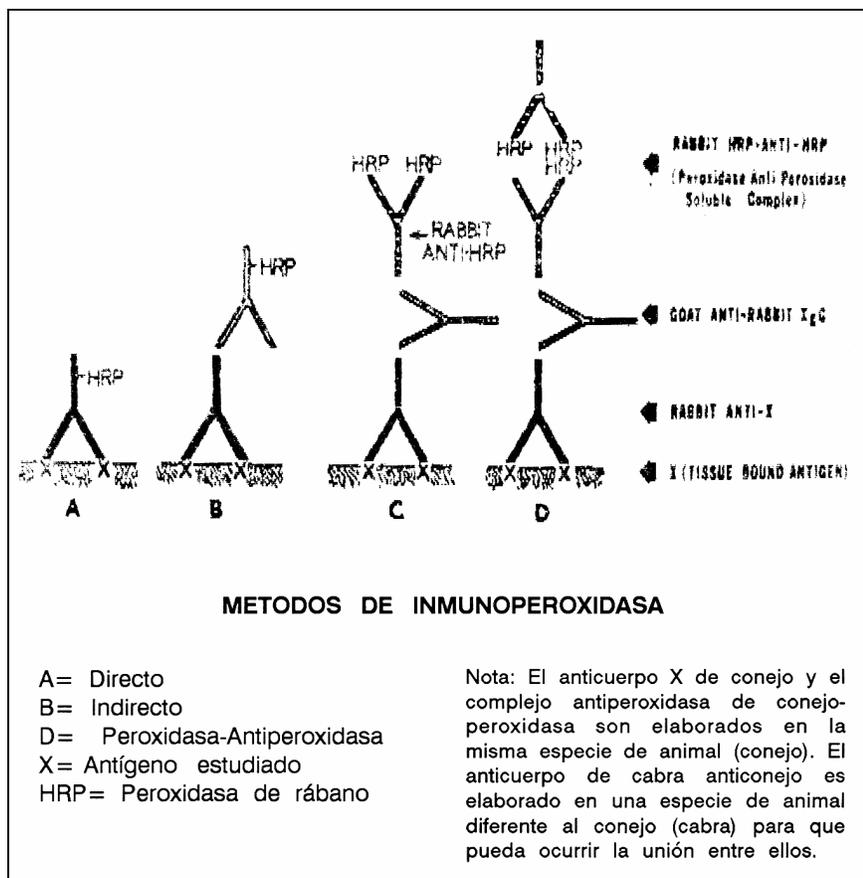
BACTERIAS, VIRUS Y PARÁSITOS

Antígenos contra papiloma virus, herpes virus citomegalovirus y hepatitis (superficie y core) han sido usados en la Universidad de Minnesota, U.S.A., Polin y col.¹⁸ reportan una lista de anticuerpos disponibles contra microorganismos.

PROCEDIMIENTO PARA LA TÉCNICA PEROXIDASA ANTIPEROXIDASA

- 1.- Secciones de parafina a 3 mieras del tejido a estudiar.
- 2.- Circule el tejido en la lámina con lápiz de diamante.
- 3.- Se colocan las láminas en un horno a 58°C por 30 minutos o a 37°C por 18 horas.
- 4.- Se desparafina en xilol-alcohol 2 veces por 2 minutos cada vez.
- 5.- Hidratar en alcohol en grados decrecientes: absoluto; 95%, 90% y 85%, 2 minutos por cada vez.
- 6.- Bloquear la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno en metanol (200 cc metanol) +50 cc de peróxido de hidrógeno al 3%) durante 30 minutos. Esta solución debe ser fresca.
- 7.- Enjuagar en agua de "chorro" durante 5 minutos.

- 8.- Lavar con PBS (solución de buffer fosfato) durante 5 minutos
- 9.- Secar exceso de PBS; evitar secar el círculo.
- 10.- Colocar las láminas en una cámara de humedad.
- 11.- Cubrir los círculos con suero normal de cerdo (diluido 1:20 en PBS) durante 30 minutos para reducir la tinción del "background" no específico.
- 12.- Decantar el exceso de suero normal y secar las láminas (excepto el círculo).
- 13.- Agregar gotas de anticuerpo X de conejo (X= es el antígeno buscado) durante 30 minutos. La dilución apropiada debe ser calculada según un tablero de damas (ver figura anexa).
- 14.- Lavar las láminas con PBS.
- 15.- Colocar las láminas en tres cambios de PBS, 10 minutos cada vez.
- 16.- Secar las láminas y colocar en cámara de humedad.
- 17.- Agregar gotas de anticuerpo porcino anticonejo; dilución 1:20 por 30 minutos.
- 18.- Lavar las láminas con PBS y colocar en tres cambios de PBS, por 10 minutos cada vez.
- 19.- Secar las láminas y colocar en cámara de humedad.
- 20.- Agregar gotas de complejo peroxidasa-antiperoxidasa de conejo. La dilución será calculada según tablero (anexo).
- 21.- Colocar las láminas en tres cambios de PBS, por 10 minutos cada vez.
- 22.- Secar las láminas y colocarlas en bandeja.
- 23.- Agregar gotas de diaminobencidina (DAB), solución que contiene peróxido de hidrógeno (6 mg DAB + 10 ml PBS + 4 gotas de HO al 3%) durante 3-8 minutos. La solución debe ser preparada fresca. (Debe usarse tapaboca y guantes ya que emite vapores carcinógenos).



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Betloch Mas I, Castells Rodellas A: Estudio inmunohistoquímico de distribución de antígeno carcinoembrionario y queratina en dos casos de enfermedad de Paget extramamario. *Med Cut ILA* 17: 67-89, 1989.
- 2.- Campbell GA, Bugdorf, WHC, Everett MA: The immunohistochemical localization of lysozyme in human axillary apocrine glands. *J Invest Dermatol* 79(6) : 351-353, 1982.
- 3.- Eto H, Matsumoto M, Kobayashi H, et al: Eccrine gland associated antigens. A demonstration by monoclonal antibodies. *J Invest Dermatol* 80: 339, 1983
- 4.- Hashimoto T, Inamoto N, Nakamura K, Haranda R: Involucrin expression in skin appendage tumours. *Brit J Dermatol* 117: 325-332, 1987
- 5.- Kahn H, Braumal R, From L: Role of immunohistochemistry in the diagnosis of undifferentiated tumors involving the skin. *J Am Acad Dermatol* 14: 1063-1072, 1986.
- 6.- Kahn HJ, Braumal R, Marks A: The value of immunohistochemical studies using antibody to S-100 protein in dermatopathology. *Int J Dermatol* 23: 38-43, 1984.
- 7.- Kaniakis J, Zambruno G, Viac J, et al: Expression of neural-tissue markers (S-100 protein and LEU-7 antigen) by sweat gland tumors of the skin: and immunohistochemical study. *J Am Acad Dermatol* 17: 187-191, 1987.

- 24.-Lavar las láminas con agua corriente.
- 25.-Lavar con agua de "chorro" por 5 minutos.
- 26.-Contrateñir con hematoxilina de Meyer por 10-15 minutos.
- 27.-Lavar con agua de "chorro" por 5 minutos.
- 28.-Deshidratar con etanol en solución creciente: 85%; 90%; 95% y absoluto, durante 2 minutos por vez.
- 29.-Aclarar con xilol 2 veces, durante 2 minutos por vez.
- 30.-Montar con DPX (medio de montaje).

Todos los lavados y diluciones son hechos con buffer fosfato salino (PBS) a un pH de 7,4 a 7,6. La técnica debe ser realizada a temperatura ambiente (22°C) y usar cámara de humedad para evitar la evaporación de los reagentes. Deberá llevar un

testigo negativo y/o positivo; el negativo puede obtenerse sustituyendo el anticuerpo anti-X de conejo por suero normal del mismo animal²¹

TABLERO PARA DILUCIONES ANTI-X*

		1:10	1:50	1:200	1:800
	1:50	1	1	3	4
PAP	1:200	5	6	7	8
	1:800	9	10	11	12

Se observará cuál lámina logra la mejor tinción. Si por ejemplo es la lámina N° 8, en posteriores estudios deberá ser usada una dilución de 1:800 de anti-X con una dilución 1:200 de PAP.

* Tomado de: Short Course in Immunoperoxidase Techniques.²¹
 Department of Pathology
 University of Miami
 Jackson Memorial Medical Center
 U.S.A

- 8.- Kaye VN: Antigen-specific stains in dermatopathology. Current concepts in skin disorders (summer): 5-9, 1987.
- 9.- Miettinen M, Lehto VP, Virtanen I: Antibodies to intermediate filament proteins: Differential diagnosis of cutaneous tumors. Arch Dermatol 121: 736-741, 1985.
- 10.- Nadji M, Morales AR, Girtanner R, et al: Carcinoembryonic antigen in normal and neoplastic skin. Arch Dermatol 116: 1391, 1980.
- 11.- Paget's disease of the skin: A unifying concept of histogenesis. Cancer 50: 2203-2206, 1982
- 12.- Penneys NS: Immunoperoxidase methods and advances in skin biology. J Am Dermatol 11: 284-290, 1984.
- 13.- Penneys NS, Mogollon R, Kowalczyk A, et al: A survey of cutaneous neural lesions for the presence of myelin basic protein: an immunohistochemical study. Arch Dermatol 120: 210-213, 1984.
- 14.- Penneys NS, Mogollon RJ, Nadji M, et al: Papillomavirus common antigen. Papillomavirus antigen in verruca, benign papillomatous lesions, trichilemmoma and bowenoid papulosis: an immunoperoxidase study. Arch Dermatol 20: 859-861, 1984.
- 15.- Penneys NS, Nadji M, Churchill McKinney E: Carcinoembryonic antigen present in human eccrine sweat. J Am Acad Dermatol 4: 401-403, 1981.
- 16.- Penneys NS, Nadji M, Morales A: Carcinoembryonic antigen in benign sweat gland tumors. Arch Dermatol 118: 225-227, 1982.
- 17.- Penneys NS, Nadji M, Ziegels-Weissman J, et al: Carcinoembryonic antigen in sweat gland carcinoma. Cancer 50: 1608-1611, 1982.
- 18.- Polin RA: Monoclonal antibodies against microorganisms. Eur J Clin Microbiol, 3: 387-398, 1984.
- 19.- Ribeiro Da Gloria Antunes E y col: Os imunomarcadores no estudo dos tumores sudorais. Med Cut ILA 18: 238-244, 1990.
- 20.- Schaumburg-Lever G: Immunoenzyme techniques in dermatopathology. Int J Dermatol 25: 217-225, 1986.
- 21.- Swanson PE, Cherwitz DL, Newmann MP, Wick MR: Eccrine sweat gland carcinoma: an histologic and immunohistochemical study of 32 cases. J Cutan Pathol 14: 65-86, 1987.
- 22.- Ziegels-Weismann J, Planas L: Short course in immunoperoxidase techniques. University of Miami. Jackson Memorial Medical Center U.S.A. Mimeografiado. 25 pp.

CURSOS AUSPICIADOS POR LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE DERMATOLOGIA 1992

JUNIO

12-18 **18 Congreso Mundial de Dermatólogos**
New York - U.S.A.

SEPTIEMBRE

12 **Curso Educación Dermatológica para médicos generales** Coro, Estado Falcón
Dra. Maigualida Pérez Blanco

JULIO

25 **Curso de Educación Dermatológica para médicos generales**
Clarines, Edo. Anzoátegui
Dr. Antonio José Rondón
Dra. Luz Salazar
Dr. Alfredo Lander Marcano

OCTUBRE

24 **Curso de Educación Dermatológica**
Maturín, Estado Monagas
Dr. Carlos Riobueno Zurita