

# Desenmascaramiento antigénico no enzimático. Estudio comparativo entre horno microondas y olla a presión en secciones de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina.

T. ALVARO-NARANJO, M. T. SALVADÓ-USACH, S. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, R. BOSCH-PRÍNCIP, R. RISA-ROYO Y M. M. BARBERÁ-MARRO.

Servicio de Patología. Hospital Verge de la Cinta. Tortosa. Tarragona.

## SUMMARY

*Non enzymatic antigen retrieval. A comparative study of microwave oven and pressure cooking methods on formalin-fixed, paraffin embedded tissue sections.*

*Immunohistochemical techniques are utilized in a majority of the anatomical pathology laboratories. We studied 35 of the antibodies (Abs) most frequently used by general pathologists on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with the objective of evaluating the immunoreaction quality obtained by microwave oven (MO) and pressure cooking (PC) methods. The most commonly used intermediate filaments, differentiation markers, proliferation antigens, oncogenes, hormone receptors, immunoglobulins, and leukocyte markers were analyzed. Upon evaluation of the results, four groups of Abs that shared similar patterns of reactivity were identified. Both MO and PC methods constituted effective systems of no enzymatic antigen retrieval (NEAR) that allow Ab investigation on routinely-processed specimens. PC is an alternative procedure to MO, but it has the advantages of being faster and more effective, therefore, possibly making it the method of choice for NEAR for many Abs.*

*Key words:* Immunohistochemistry. Antigen retrieval. Microwave oven. Pressure cooking.

## INTRODUCCION

Las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) se utilizan actualmente en la mayoría de laboratorios de Anatomía Patológica y han supuesto una auténtica revolución en el quehacer diario del patólogo, tanto desde el punto de vista diagnóstico, de clasificación en el caso de la patología tumoral, etiológico para algunos virus, funcional en el caso de las hormonas y pronóstico para marcadores de diferenciación y proteínas oncogénicas.

Las técnicas IHQ pueden aplicarse sobre tejido congelado (1,2) y también sobre material procedente de extensiones citológicas (3) y PAAF (4), pero es el tejido procesado de forma rutinaria por el patólogo (fijado en

formol e incluido en parafina), procedente de biopsias y piezas quirúrgicas, el que constituye el volumen más importante susceptible de ser sometido a este tipo de estudios.

En los últimos años el arsenal diagnóstico del patólogo se ha visto incrementado de forma vertiginosa por gran número de anticuerpos policlonales (AcPo) y monoclonales (AcMo), así como sistemas de detección inmunológica. Con frecuencia, los antígenos que se pretende demostrar son inactivados durante el proceso de fijación tisular (5), y ello condujo al diseño de tratamientos enzimáticos de digestión, capaces de contribuir a incrementar la reactividad del tejido fijado así como a disminuir la tinción de fondo (6).

En el año 1991, Shi et al (7) comunicaron un nuevo método capaz de intensificar la inmunotinción en tejido procesado de forma rutinaria, consistente en calentar las secciones tisulares en horno microondas (HM) en soluciones metálicas salinas. Mediante este procedimiento era posible superar los resultados obtenidos

Correspondencia: Dr. Tomás Alvaro-Naranjo. Servicio de Patología. c/ Esplanetes 44-58. Hospital Verge de la Cinta. 43500 Tortosa. Tarragona.

mediante la digestión enzimática para algunos anticuerpos y, además, se consiguió poner de manifiesto antígenos que hasta ese momento sólo habían podido ser detectados en material congelado.

El mecanismo de desenmascaramiento antigénico

utilizado por las microondas es actualmente desconocido. Dicho modo de actuación ha sido explicado por el efecto del calor (8), a través de desnaturalización proteica. Antes del uso del microondas con estos fines, ya eran conocidos otros sistemas capaces de ofrecer mejoras en

**Tabla I.** Anticuerpos primarios, procedencia, clona, dilución y tejido sobre el que se han analizado.

Grupo	Anticuerpo	Procedencia*	Clona	Dilución	Tejido
I. Filamentos intermedios	Desmina	1	D33	1:100	Tubo digestivo, miometrio.
	Queratina alto peso molec.	2	AE3	1:1	Carcinoma epidermoide
	Queratina amplio espectro	2	AE1-AE3	1:40	Carcinoma de mama
	Queratina bajo peso molec.	3	CAM 5.2	1:40	Carcinoma de mama
	Vimentina	1	V9	1:25	Fibroblastos, cél. endotelial.
II. Varios	Actina esp.	1	1A4	1:50	Intestino
	CEA	1	policlonal	1:300	Intestino
	Cromagranina	1	LK2H10	1:50	T. carcinoide, ca. neuroendocr.
	EMA	1	E29	1:100	Carcinoma de mama
	Factor VIII	1	F8/86	1:50	Células endoteliales
	HLA-DR	1	CR3/43	1:100	Amígdala
	Melanoma	1	HMB45	1:50	Melanoma
	NSE	1	BBS/NC/VIH14	1:100	T. carcinoide, ca. neuroendocr.
	PSA	1	Policlonal	1:200	Próstata
	S-100	1	Policlonal	1:300	Amígdala, nervio
III. Receptores oncogenes, proliferación	bcl-2	1	124	1:60	Amígdala
	c-erbB-2	3	NCL-CB11	1:40	Carcinoma de mama
	Ki-67	1	Policlonal	1:50	Amígdala
	p53	1	DO-7	1:25	Carcinoma de mama, linfoma.
	R. Estrógenos	4	CC4-5	1:20	Carcinoma de mama
	R. Progesterona	4	PGR-1A6	1:20	Carcinoma de mama
	IV. Linfoide	CD3	1	Policlonal	1:50
CD15		1	C3D-1	1:25	Enf. Hodgkin
CD20		1	L26	1:100	Amígdala
CD21		1	1F8	1:20	Amígdala
CD30		1	BER-H2	1:25	Enf. Hodgkin
CD45		1	PD7/26 y 2B11	1:50	Amígdala
CD45RO		1	UCHL1	1:100	Amígdala
CD68		1	KP1	1:100	Bazo
IgA		1	Policlonal	1:250	Amígdala
IgD		1	Policlonal	1:100	Amígdala
IgG		1	Policlonal	1:2500	Amígdala
IgM		1	Policlonal	1:500	Amígdala
Lambda		1	Policlonal	1:20000	Amígdala
Kappa		1	Policlonal	1:20000	Amígdala

\*1: Dako; 2: Biogenex; 3: Novocastra; 4: Medac

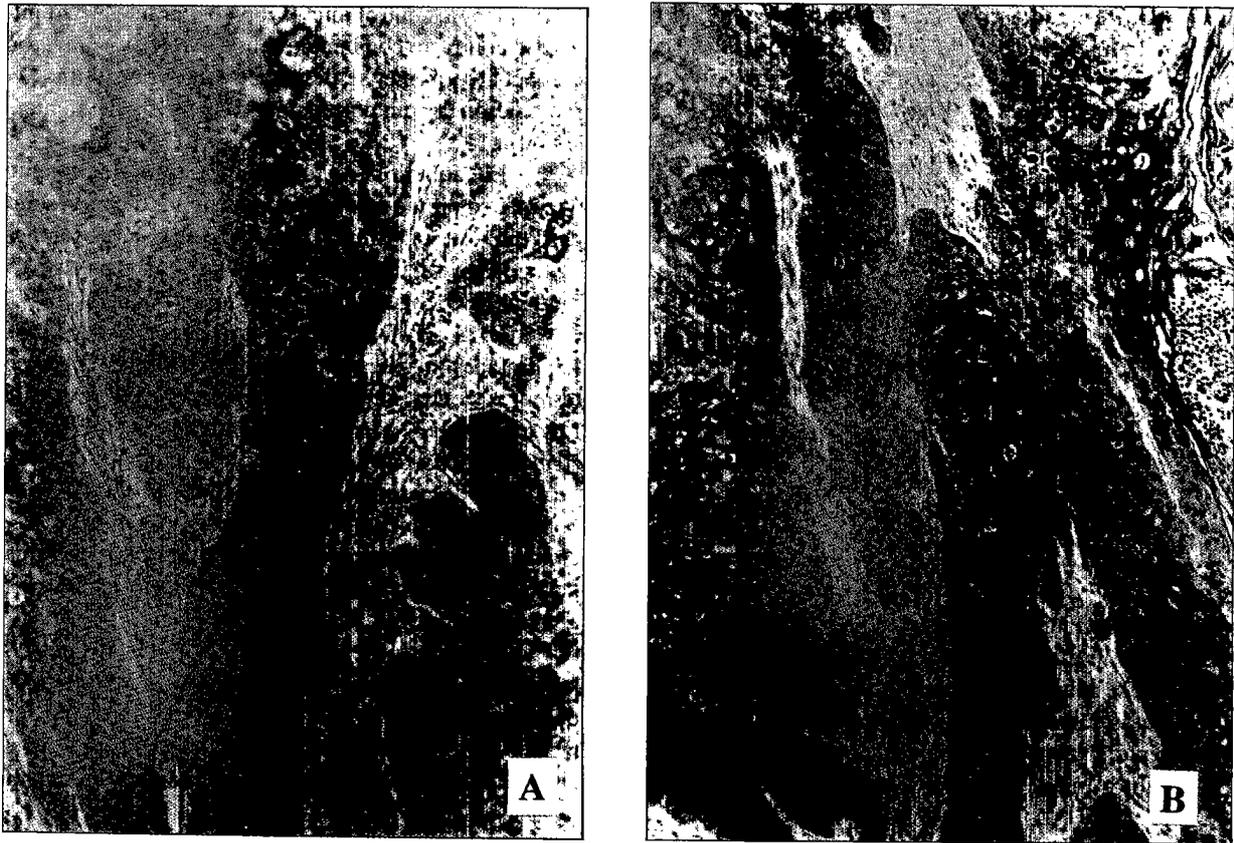


Figura 1.- Carcinoma epidermoide cutáneo, CK AE1-AE3. a) Con el método standard se tiñen con cierta intensidad las células tumorales más queratinizadas. b) Tras DANE con HM la intensidad se ve notablemente incrementada, el número de células teñido es mayor y existe tinción sobre células con escasa queratinización e invasión estromal individual.

los resultados de la inmunotinción, como podía ser el hervido en autoclave húmedo (9).

La reciente incorporación del uso de la olla a presión (OP) como fuente de calor (10), así como el autoclave (11) orientados al desenmascaramiento antigénico no enzimático (DANE), supone una alternativa al uso del HM. Las ventajas que la olla ofrece radican en una mayor rapidez, capacidad y reproducibilidad, aparte de ser económica, aunque hasta la fecha son escasos los estudios comparativos que avalen su utilidad frente al HM (10).

Hemos realizado la selección y estudio de los Ac más frecuentemente utilizados en un laboratorio de Anatomía Patológica, sobre material fijado en formol e incluido en parafina, con el objeto de evaluar la intensidad de inmunotinción conseguida mediante procedimiento standard, con horno microondas y con olla a presión.

## MATERIAL Y METODOS

Los Ac seleccionados objeto de estudio comparativo en diferentes situaciones de inmunodetección quedan reflejados en Tabla I. Todos ellos fueron diluidos en PBS a un pH de 7.2 - 7.4.

Se seleccionaron tejidos normales (amígdala, bazo, piel, útero, intestino delgado y grueso, próstata, nervio) y tumorales (cancer de mama, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma anaplásico, tumor carcinoide, melanoma, carcinoma prostático, carcinoma epidermoide). que se utilizaron tanto como controles negativos como positivos. Todos los tejidos seleccionados habían sido fijados en formalina 10% tamponada a temperatura ambiente en periodos oscilantes entre 24 y 72 horas. Los tejidos fueron incluidos en parafina en un procesador automático, alcanzando una temperatura máxima de 57° C. Posteriormente se procedió a la elaboración de los bloques de parafina.

Se obtuvieron secciones de tejido de 3 micras de espesor y se dispusieron sobre portaobjetos tratados con adhesivo tisular (Poly-L-Lysine, Sigma). Se utilizaron métodos de detección inmunohistoquímica indirecta, avidina-biotina, tanto para los AcPo (Vectastain Elite PK-6101, Vector) como para los AcMo (Vectastain Elite PK-6102, Vector). Tras desparafinización e hidratación hasta agua destilada de los cortes, se incubaron en cámara húmeda durante 10 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para inhibición de la peroxidasa endógena. Tras un lavado con agua destilada y otro con solución tampón fosfato (PBS), se incubó con suero normal durante 20

**Tabla II.** Resultados comparativos tras procedimiento con horno microondas (HM) y olla a presión (OP).

STANDAR	HM=OP	HM<OP	OP>HM
CD21	CD15	Actina	CD45RO
	CD20	bcl-2	CD68
	CD45	CD3	C-erb-B2
	CEA	CD30	HLA-DR
	Cromogran	EMA	Melanoma
	Desmina	Factor VIII	NSE
	Kappa	Inmunoglobul.	CK bajo p.m.
	Lambda	Ki-67	S-100
	PSA	P53	
		CK alto p. m.	
		CK amplio esp.	
		Recep. de estróg.	
		Recep. progest.	
		Vimentina	

minutos. Se añadió directamente el Ac primario correspondiente 30 minutos. Tras dos lavados de 5 minutos con PBS, se añadió el anticuerpo secundario biotinilado 30 minutos, lavándolo dos veces 5 minutos con PBS y, finalmente, el complejo avidina-biotina-peroxidasa otros 30 minutos más. Se reveló con diaminobenzidina

(Merck), bajo control microscópico, durante 5-6 minutos. Se contrastó con hematoxilina (Merck), se lavaron con agua corriente, se deshidrataron y, por último, se protegieron con un portaobjetos con medio de montaje (BDH).

En aquellos Ac que requirieron tratamiento enzimático previo en el método de inmunotinción standard (CD-21, CD-3, IgG, IgA, IgD, IgM), las secciones de tejido fueron tratadas previamente con pronasa (0,5 mg/ml ml PBS, Sigma-P6911) durante 5 minutos a 37°C.

Para el DANE, se utilizaron secciones rehidratadas dispuestas en contenedores de plástico termoresistentes con tampón citrato sódico 10 mM pH6. Los tejidos fueron irradiados en un horno microondas (Panasonic NN-6207), dos pulsos de 5 minutos, con un período de descanso de 3 minutos entre ellos, al 100% de potencia (equivalente a 700W). Posteriormente las secciones se dejaron atemperar durante un tiempo mínimo de 20 minutos, en la misma solución, antes de proceder a la técnica IHQ.

En el caso del DANE con olla a presión, las secciones rehidratadas se sumergieron en una solución de citrato sódico 10 mM pH6 en una olla a presión (Fagor 4 L). Cuando por la válvula de seguridad empezaron a salir las primeras gotas, se mantuvo la misma



Figura 2.- Amígdala, Ki67. a) DANE con OP. El número de células teñidas en el centro germinal es el esperado. b) DANE con HM. El número de células marcadas es similar a OP, pero la tinción es más intensa.



Figura 3.- Linfoma no Hodgkin teñido con p53 en material fijado en formol e incluido en parafina tras DANE con HM.

intensidad de calor durante 1'30". Rápidamente se paró la ebullición con agua fría, y cuando la olla permitió su apertura se introdujeron las preparaciones en PBS y se procedió a la técnica IHQ.

Todos los Ac fueron evaluados de forma separada por cuatro investigadores, procediendo posteriormente a la comparación de resultados y resolviendo las diferencias por consenso. El método de valoración fue semicuantitativo, considerando cuatro grados de intensidad de tinción (-: negativo; +: débil; ++: evidente; +++: fuerte) y 5 grados de porcentajes de celularidad teñida esperada (-: 0%; +: <25%; ++: 26-50%; +++: 51-75%; ++++: >76%). Asimismo se evaluaron la presencia y localización de tinción de fondo, la inmunotinción de estructuras diferentes según el método de desenmascaramiento antigénico empleado (por ejemplo, tinción de los centros germinales para las Ig) y observaciones específicas para cada Ac.

## RESULTADOS

Las secciones tisulares apenas sufrieron cambios en el modo de tinción standard, siendo más frecuentes los artefactos de desintegración tisular tras tratamiento con OP y sobre todo con HM. El 94% de AcPo y AcMo

seleccionados, utilizados sobre material fijado en formol e incluido en parafina, se beneficiaron del uso de algún tipo de desenmascaramiento antigénico. Todos, a excepción del CD21, ofrecieron mejores resultados con el uso de procedimientos DANE, ya fuera tras irradiación con HM o con ebullición en OP.

El AcMo CD21 resultó completamente negativo en las secciones tratadas tanto con HM como con OP. La digestión enzimática, utilizando pronasa, permitió la inmunotinción de células dendríticas foliculares de los centros germinales, no consiguiendo teñir los linfocitos B del manto folicular, normalmente positivos en material congelado (datos no mostrados).

La Tabla II muestra aquellos Ac que fueron eficaces por igual tras tratamiento de las secciones con HM y OP. La desmina puso de manifiesto las células mioepiteliales periglandulares en el intestino grueso, las cuales no fueron demostradas sin DANE. Tanto el tratamiento previo con HM como con OP ofreció resultados positivos para desmina sobre el mesotelio reactivo, lo cual no ocurrió en la forma standard. El CEA resultó positivo en el suero acumulado en las luces vasculares exclusivamente tras tratamiento con HM y los PNN se tiñeron en la OP, lo cual también ocurrió con la tinción standard. La cromogranina sobre secciones tratadas ya sea con HM o con OP tiñó de forma difusa los espacios intercelulares en las zonas más positivas, en ausencia de tinción de fondo, lo que fue interpretado como difusión del Ag en un carcinoma neuroendocrino, y en ambos casos se tiñeron con carácter focal los núcleos de algunos linfocitos. Sólo tras el tratamiento con HM fueron positivas algunas células sobre el mesotelio. El PSA ofreció buenos resultados en las tres modalidades de tinción utilizadas, consiguiendo los métodos de DANE anular la tinción de fondo presente en el modo standard. El CD20 ofreció tinción nucleolar tras DANE.

La Tabla II recoge aquellos Ac que ofrecieron mejores resultados tras tratamiento con HM. CK AE3 y CK AE3-AE1 (fig. 1) únicamente tiñeron el epitelio de glándulas sebáceas tras tratamiento con HM. Con el método de tinción standard la vimentina no fue demostrada en linfocitos, mesotelio y sólo de forma parcheada y con intensidad desigual en fibroblastos y endotelios. Tras DANE, tanto HM como OP pusieron de relieve filamentos intermedios de vimentina en linfocitos, mesotelio, fibroblastos y endotelios de manera uniforme. Las diferencias entre HM y OP radicarón en que la tinción de los linfocitos con la segunda fue focal y la intensidad general de la inmunotinción fue ligeramente más débil. La actina específica muscular fue positiva, con carácter focal, sobre mesotelio reactivo tras tratamiento con OP y sobre todo con HM. Las células plasmáticas se tiñeron con EMA con OP y con HM. El AcPo Ki67 no se pudo demostrar en amígdala en ausencia de tratamiento previo, pero sí con OP y, fundamentalmente, con HM (fig. 2). p53 (fig. 3) y bcl-2 ofrecieron los mejores resultados tras tratamiento con HM. Lo

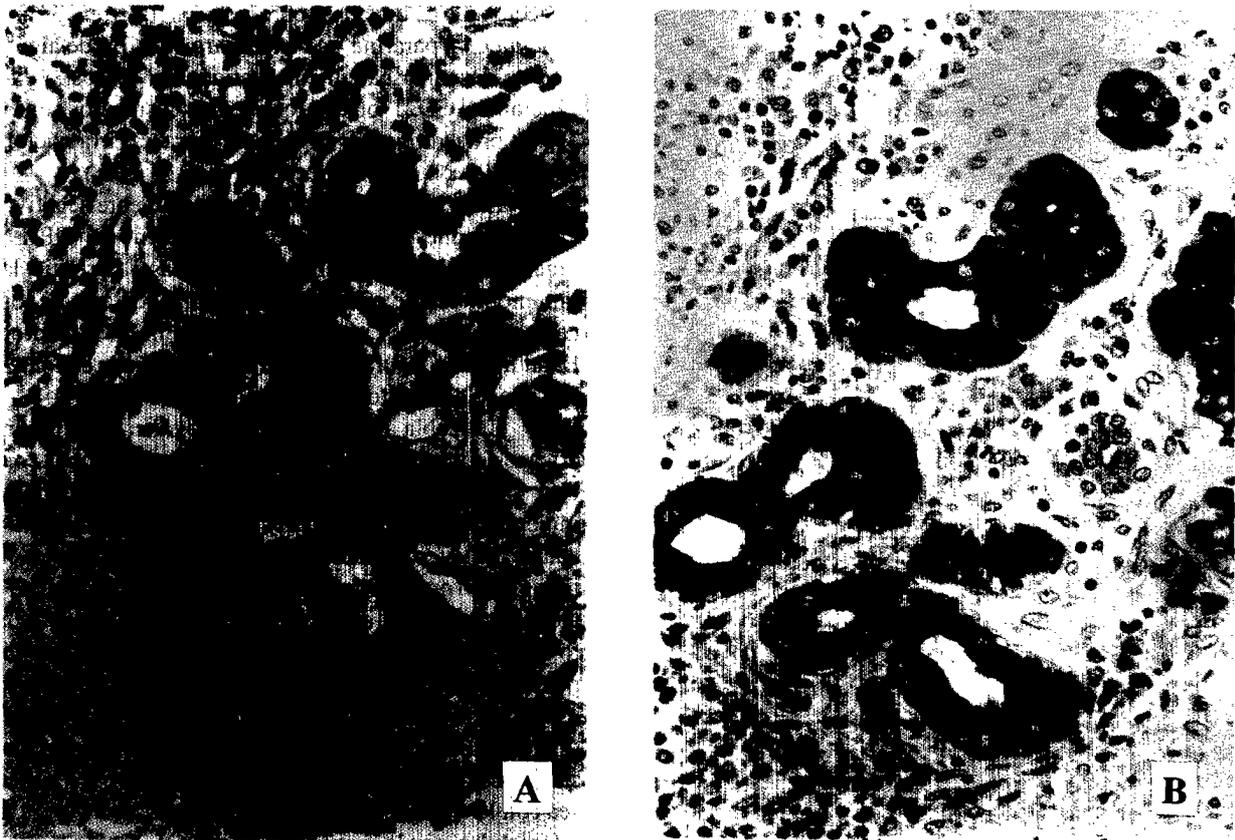


Figura 4.- Dermis, glándula sudorípara ecrina teñida con CK CAM 5.2. a) DANE con HM. b) DANE con OP. Aquí el número de células teñidas es equivalente, pero la intensidad es mayor y el fondo más limpio.

mismo sucedió, aunque con escasa diferencia entre HM y OP para cadenas pesadas y ligeras de las Ig, CD3 policlonal y CD30. Los receptores de estrógenos y progesterona mostraron los mejores resultados tras tratamiento con HM.

La Tabla II incluye los ocho Ac incluidos en el estudio cuya tinción óptima fue obtenida tras DANE con OP. La CK CAM 5.2 ofreció una inmunotinción más intensa sobre los conductos de los anejos glandulares cutáneos tras tratamiento con OP (fig. 4), siendo éstos completamente negativos en la forma standard y teñidos con menor intensidad con HM. El HLA DR puso de manifiesto de una manera exquisita los linfocitos intraepiteliales con OP y menos con HM. La proteína S-100 en secciones tratadas con OP ofreció menor intensidad que en el caso de HM, pero a la vez descendió en gran medida la tinción de fondo sobre músculo liso, presente en la sección correspondiente al modo standard y tratamiento con HM. Tanto HM como OP consiguieron desenmascarar el Ag a nivel de las células reticulares dendríticas de los centros germinales en la amígdala (negativos en el modo standard), algunos linfocitos pequeños y células mioepiteliales periglandulares, negativas y con tinción muy débil en el modo standard. Con la NSE y tras tratamiento con HM y OP aparece

inmunotinción sobre linfocitos, y en el caso de HM también se tiñe músculo liso. HMB 45 (fig. 5) y c-erb-B2 mostraron el mayor grado de tinción con OP (aunque con el primero y en ausencia de desenmascaramiento, los resultados fueron aceptablemente buenos) como también lo hicieron CD45-RO y CD68. Con HM, CD45 RO mostró tinción de fondo sobre el epitelio de revestimiento amigdalario y CD68 sobre la pulpa blanca esplénica.

## DISCUSION

Durante un largo período de tiempo se ha considerado que el sobrecalentamiento del tejido en su procesamiento, por encima de determinados niveles, produciría desnaturalización proteica e impediría el reconocimiento de determinantes antigénicos. Actualmente, muchos laboratorios de Patología someten a ebullición sus tejidos, con el fin de conseguir DANE que permita el reconocimiento de gran número de epítomos en material fijado en formol e incluido en parafina (7,12).

El presente trabajo se ha realizado sobre una selección de 35 AcPo y Mo, elegidos entre los de uso más común por el patólogo general. Se han incluido filamentos intermedios, marcadores de diferenciación tumoral, antígeno de proliferación, oncoproteínas, re-

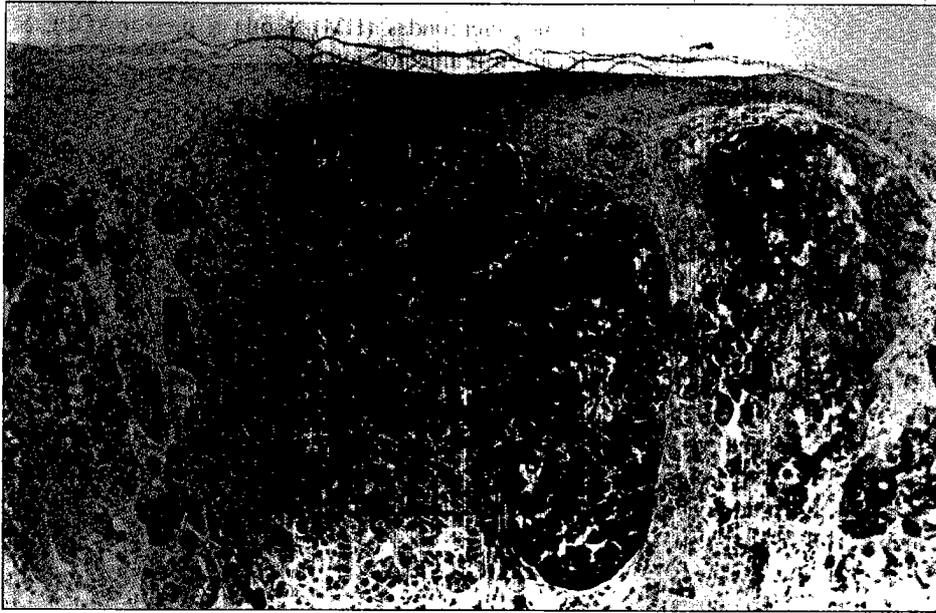


Figura 5.- Melanoma, HMB-45. DANE con OP.

ceptores hormonales, cadenas pesadas y ligeras de Ig y los marcadores linfoides de uso más general. Todos ellos se han estudiado sobre material procesado de forma habitual, fijado en formol e incluido en parafina, introduciendo como variable el sistema de calentamiento empleado como método DANE, ya fuera éste HM u OP.

De la valoración de resultados es posible extraer cuatro grupos de Ac que comparten modos de reacción similares. El primer grupo está compuesto por un solo Ac, CD21, cuya expresión fue anulada por el tratamiento con calor, ofreciendo resultados positivos tras digestión enzimática con pronasa. Idénticos resultados han sido comunicados por Cattoretti et al (8) y Norton et al (10).

Los otros 34 Ac estudiados se han beneficiado de forma variable de alguna forma de tratamiento por calor. Un grupo de 9 Ac (desmina, CEA, cromogranina, PSA, cadenas ligera kappa y lambda, CD15, CD20 y CD45) han mostrado resultados similares tras tratamiento con HM u OP. De especial interés resulta la positividad de la desmina sobre mesotelio reactivo tras DANE. Dicho efecto, la positividad sobre mesoteliomas y el uso de este dato en el diagnóstico diferencial con carcinomas, así como el dramático efecto del microondas sobre la desmina, han sido puestos de manifiesto recientemente por Hurlimann (13). El CEA fue positivo en suero y PNN tras DANE, tinción esperada pero con demostración focal, tenue o bien negativa en el caso de tinción standard (14). La cromogranina, tras tratamiento con HM, fue positiva en algunos linfocitos y también en células mesoteliales, dato éste último recogido por Hurlimann (13) en mesoteliomas, pero no en células mesoteliales no tumorales. La tinción para cadenas ligeras de forma standard consigue una reacción aceptable en células plasmáticas, pero no demuestra el Ag sobre las células de los centros germinales en la amígdala. Dicha tinción

aparece con DANE, con el beneficio adicional en las secciones tratadas con OP de la disminución de la tinción de fondo. Este incremento en la sensibilidad de la técnica es decisivo a la hora de valorar proliferaciones linfoides monoclonales, en las que generalmente la cantidad de cadenas ligeras es escasa, y permite realizar dicha valoración aún no disponiendo de tejido congelado (15). La curiosa tinción nucleolar ofrecida por CD 20 tras DANE ha sido mencionada recientemente por Norton et al (10).

Un numeroso tercer grupo (ver Tabla II) ha mostrado resultados óptimos tras tratamiento con HM en buffer citrato. El filamento intermedio vimentina posee especial interés, al constituir un indicador de calidad y preservación antigénica en tejido fijado en formol e incluido en parafina (16). La vimentina mostró un notable incremento en la intensidad y distribución de la inmunotinción tras DANE y especialmente con HM. La CK de amplio espectro ofreció magníficos resultados tras DANE y especialmente con HM, haciendo innecesaria la recomendación de Cooper et al (17) de realizar estos estudios sobre material congelado o fijado en alcohol. La CK CAM 5.2 ofreció los mejores resultados tras tratamiento de las secciones con OP. Conviene tener presente que la aplicación de técnicas de DANE pondrá progresivamente de relieve filamentos de CK en cada vez mayor número de tumores, aún no epiteliales (18), lo que puede provocar interpretaciones erróneas por el patólogo. El EMA no tiñe en el modo standard las células plasmáticas, pero sí tras DANE. Este hecho, reconocido desde hace tiempo (19) así como la positividad para CK en la célula plasmática tumoral (20) y gran número de Ag hematopoyéticos y no hematopoyéticos, incluyendo CEA y HMB-45 (21), deben ser tenidos en cuenta en el diagnóstico diferencial

de este grupo de tumores. En contraste con los resultados de Norton et al (10), el AcPo Ki67 resultó positivo tras tratamiento con OP, pero ofreció unos resultados muy brillantes tras tratamiento con HM, al igual que han comunicado otros autores (8, 22). La importancia de la concentración del Ac en la cuantificación de Ag de proliferación celular ha sido puesta de manifiesto por McCormick et al (23). En nuestra experiencia, el tratamiento con HM consiguió unos resultados ligeramente superiores a la OP para p53, obteniendo Piffko et al (24) resultados opuestos con autoclave húmedo. Buenos resultados tras tratamiento con HM en tejido procesado de forma rutinaria para bcl-2 han sido comunicados por Lauwers et al (25).

Finalmente, un cuarto grupo, compuesto por 8 Ac, ofreció los mejores resultados tras tratamiento con OP en buffer citrato. La proteína S-100 produjo una apreciable menor tinción de fondo con OP. La existencia de linfocitos S-100 positivos es bien conocida (26), habiendo sido recientemente comunicada la existencia de una enfermedad linfoproliferativa T S-100 positiva (27). Asimismo la existencia de linfocitos NSE positivos ha sido previamente comunicada (28), apareciendo en nuestro material linfocitos NSE positivos únicamente tras DANE. La sobreexpresión de c-erbB-2 juega un papel crucial en la motilidad e invasión celular del cáncer de mama (29); su detección inmunohistoquímica exige DANE y en nuestra experiencia la OP consigue apreciables mejores resultados. CD68 ofreció buenos resultados tras DANE y especialmente con OP. Conviene recordar la existencia de CD68 en melanomas (30), linfomas (31), sarcomas y carcinomas (32).

En resumen, tanto HM como OP constituyen eficaces sistemas de desenmascaramiento antigénico no enzimático, aplicables a la mayoría de AcPo y Mo de uso común por el patólogo general. Su uso permite la investigación de dichos Ac en material procesado de forma rutinaria, fijado en formol e incluido en parafina, no siendo imprescindible disponer de material en fresco o tejido congelado para la realización de dichos estudios. La OP aventaja al HM en rapidez y capacidad, y puede ser el sistema de elección de DANE para laboratorios que realicen un elevado número de estudios o valoración de grandes series de casos, manteniendo idénticas condiciones en la realización de técnicas IHQ. El HM permanece como idóneo para buen número de Ac, y su accesibilidad y fácil manejo le hacen apropiado para laboratorios con un número moderado de estudios IHQ.

## RESUMEN

Las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) son utilizadas en la mayoría de laboratorios de Anatomía Patológica. Estudiamos 35 Ac seleccionados entre los de uso más frecuente por el patólogo general, sobre material fijado en formol e incluido en parafina, con el

objetivo de evaluar la calidad de inmunotinción con horno microondas (HM) y olla a presión (OP). Se incluyen filamentos intermedios, marcadores de diferenciación tumoral, antígeno de proliferación, oncoproteínas, receptores hormonales, Ig y marcadores linfoides de uso habitual. De la valoración de resultados se extraen cuatro grupos de Ac que comparten modos de reacción similares. Tanto HM como OP constituyen eficaces sistemas de desenmascaramiento antigénico no enzimático (DANE), que permiten la investigación de Ac en material procesado de forma rutinaria. La OP supone una alternativa al uso del HM, al que aventaja en rapidez y capacidad, y puede ser el sistema de elección de DANE para buen número de Ac.

*Palabras clave:* Inmunohistoquímica. Desenmascaramiento antigénico. Horno microondas. Olla a presión.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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: 483-488.
2. Erlandson RA. Diagnostic immunohistochemistry of human tumors. An interim evaluation. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 615-624.
3. Nance KV, Silverman JF. Immunocytochemical panel for the identification of malignant cells in serous effusions. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 867-874.
4. Domagala W, Markiewski M, Tuziak T, Kram A, Weber K, Osborn M. Immunocytochemistry on fine needle aspirates in paraffin mini-blocks. *Acta Cytol* 1990; 34: 291-296.
5. Mason JT, O'Leary TJ. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure. A calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 225-229.
6. Finley JCW, Petrusz P. The use of proteolytic enzymes for improved localization of tissue antigens with immunohistochemistry. In: Bullock GR, Perusz P, eds. *Techniques in immunocytochemistry*. Vol I. London: Academic Press 1982; 239-249.
7. Shi S-R, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin embedded tissues. An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748.
8. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker Mhg, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'amato L, Sabattini E. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 1993; 171: 83-98.
9. Swerdlow PS, Finley D, Varshavsky A. Enhancement of immunoblot sensitivity by heating of hydrated filters. *Anal Biochem* 1986; 156: 147-153.
10. Norton AJ, Jordan S, Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): A simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol* 1994; 173: 371-379.

11. Bankfalvi A, Navabi H, Bier B, Böcker W, Jasani B, Schmid W. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic Immunohistochemistry. *J Pathol* 1994; 174: 223-228.
12. McKee PH, Hobbs C, Hall PA. Antigen retrieval by microwave irradiation lowers immunohistological detection threshold. *Histopathology* 1993; 23: 377-379.
13. Hurlimann J. Desmin and neural marker expression in mesothelial cells and mesotheliomas. *Hum Pathol* 1994; 25: 753-757.
14. Ruibal Morell A. El antígeno carcinoembrionario. Consideraciones actuales. *Med Clin (Barc)* 1987; 88: 541-545.
15. Merz H, Rickers O, Schrimel S, Orscheschek K, Feller AC. Constant detection of surface and cytoplasmic immunoglobulin heavy and light chain expression in formalin-fixed and paraffin-embedded material. *J Pathol* 1993; 170: 257-264.
16. Battifora H. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 669-671.
17. Cooper D, Schermer A, Sun TT. Biology of disease. Classification of human epitelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: Strategies, applications and limitations. *Lab Inves* 1985; 52: 243-256.
18. Miettinen M, Kovatich A. Keratins in soft-tissue sarcomas - Common phenomenon or technical artifact?. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 673-675.
19. Delsol G, Gatter KC, Stein H, Erber WN, Pulford ZAF, Zinne K, Mason DY. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. *Lancet* 1984; ii: 1124-1129.
20. Wotherspoon AC, Norton AJ, Isaacson PG. Immunoreactive cytokeratins in plasmacytomas. *Histopathology* 1989; 14: 141-150.
21. Petruich UR, Horny HP, Kaiserling E. Frequent expression of haemopoietic and non-haemopoietic antigens by neoplastic plasma cells: an immunohistochemical study using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Histopathology* 1992; 20: 35-40.
22. Taylor CR, Shi SR, Chaiwun B, Young L, Imam SA, Cote RJ. Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin section: Androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, P53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Hum Pathol* 1994; 25: 263-270.
23. McCormick D, YUC, Hobbs C, Hall PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology* 1993; 22: 543-547.
24. Piffko J, Bankfalvi A, Öfner D, Joos U, Böcker W, Schmid KW. Immunohistochemical detection of P53 protein in archival tissues from squamous cell carcinomas of the oral cavity using wet autoclave antigen retrieval. *J Pathol* 1995; 176: 69-75.
25. Lauwers GY, Scott GV, Hendricks J. Immunohistochemical evidence of aberrant bcl-2 protein expression in gastric epithelial dysplasia. *Cancer* 1994; 73: 2900-2904.
26. Takahashi K, Isobe T, Ohtsuki Y, Sonobe H, Yamaguchi H, Akagi T. S-100 protein positive human T-lymphocyte. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 69-72.
27. Zarate-Osorno A, Raffeld M, Berman EL, Ferguson MM, Andrade R, Jaffe ES. S-100 positive T-cell lymphoproliferative disorder. A case report and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 478-482.
28. Haimoto H, Takahashi Y, Toshikawa T, Nagura H, Kato K. Immunohistochemical localization of gamma-enolasa in normal human tissues other than nervous and neuroendocrine tissues. *Lab Invest* 1985; 52: 257-263.
29. De Potter CR. The neu-oncogene: more than a prognostic indicator?. *Hum Pathol* 1994; 25: 1264-1268.
30. Facchetti F, Bertalot G, Grigolato PG. Kp1 (CD 68) staining of malignant melanomas. *Histopathology* 1991; 19: 141-145.
31. Carbone A, Gloghini A, Volpe R, Boiocchi M, Tirelli U, and the Italian Cooperative Group on aids and tumors. High frequency of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 expression in acquired immunodeficiency syndrome-related Ki-1 (CD30) - positive anaplastic large-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 768-772.
32. Gloghini A, Rizzo A, Zanette I, Canal B, Rupolo G, Bassi P, Carbone A. KP1/CD68 expression in malignant neoplasms including lymphomas and carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 425-431.

