



# Técnicas de inmunohistoquímica

## Técnicas de desenmascaramiento antigénico en inmunohistoquímica. Estudio dirigido a anticuerpos con especiales dificultades de inmunodetección

M.T. Salvadó-Usach, S. Martínez-González, T. Álvaro-Naranjo, M.M. Barberá-Marro, R.M. Risa-Royo,  
A. Suñé-Martín, B. Tomás-Arasa y R. Bosch-Príncipep

*Hospital Verge de la Cinta de Tortosa (Tarragona).*

### INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) es bien conocido el efecto negativo que tiene en el ámbito molecular la fijación en formol y la inclusión del tejido en parafina. Concretamente, el formol, el fijador más universal, parece ser el principal causante de la pérdida de inmunorreactividad del tejido por el entrecruzamiento proteico que se produce; por ello, en un principio, las técnicas IHQ se realizaban en secciones de tejido congelado. Con el tiempo se han desarrollado diferentes técnicas encaminadas a romper las uniones químicas (intraproteicas e interproteicas) inducidas por el formol y así desbloquear el acceso de los anticuerpos a los epítomos de los antígenos. Una de las primeras fue el tratamiento con diferentes enzimas proteolíticas (tripsina, pronasa, pepsina, etc.) (1), que es útil en muchos tejidos, pero la estandarización del método es difícil, debido a que el tiempo de incubación y concentración de la enzima depende del proceso de fijación del tejido, así como del antígeno estudiado, lo que tiene como consecuencia una gran variabilidad y una escasa reproducibilidad en los resultados.

El gran avance en el desenmascaramiento antigénico fue la introducción del calor. Shi y cols. (2) fueron los primeros en utilizar el horno microondas como fuente de calor. A partir de aquí, fueron surgiendo métodos alternativos, tanto por lo que respecta a las fuentes de calor como en lo que se refiere a las soluciones en las que se sumergen los tejidos (3-7), con resultados espectaculares, que permitieron observar mejor la inmunotinción, reducir el fondo y utilizar diluciones más altas de anticuerpo (Ac).

Sin embargo, sigue habiendo antígenos difíciles de detectar, a pesar de que existen buenos Ac que funcionan en formol-parafina.

En este trabajo hemos seleccionado un grupo de Ac en los que la inmunotinción en nuestro laboratorio es nula o débil en diferentes tipos de tejido. Para su estudio hemos combinado distintas fuentes de desenmascaramiento antigénico por calor, varios tipos de tampón y variaciones del pH de éste.

Nuestros resultados muestran que no hay unas condiciones ideales de trabajo aplicables a todos los Ac y que es preciso individualizarlas para cada uno de ellos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se elaboraron tres bloques multitejido, todos ellos fijados en formol entre 12 y 24 horas e incluidos en parafina, que fueron utilizados para todos los Ac a analizar (8). La elección de los tejidos se hizo siguiendo las recomendaciones del fabricante del Ac en cuanto al tejido positivo y negativo al control de cada uno de ellos. Los bloques multitejido fueron:

- Bloque I, formado por fragmentos de amígdala, cerebro, ganglio con linfoma de Hodgkin y timo.
- Bloque II, formado por fragmentos de adenocarcinoma de próstata, carcinoma ductal infiltrante de mama, piel normal, adenocarcinoma de colon, riñón normal, colon normal, parénquima mamario normal y melanoma maligno.
- Bloque III, formado por fragmentos de placenta, próstata normal, hígado fetal, páncreas normal, tiroides normal y epitelio exocervical con infección por HPV.

En cuanto a los diferentes métodos de desenmascaramiento, se seleccionaron las siguientes opciones:

- Fuente de calor: horno microondas (MO) (Moulinex Optimo, 900 W, con plato giratorio) y olla a presión (Fagor).
- Tiempo:
  - Tres tandas de cinco minutos en MO a la máxima potencia.
  - Diez minutos. En el MO a la máxima potencia hasta que empieza a hervir y bajándola después, sin que se interrumpa el hervor, durante diez minutos.
  - Tres minutos. En la olla se pone la solución de desenmascaramiento a calentar y cuando empieza a hervir se introducen los portaobjetos sobre una gradilla adecuada (de plástico, resistente a temperaturas altas), de manera que queden bien sumergidos. Se tapa la olla y cuando se alcanza la presión máxima se cierra el fuego, se deja sobre la placa caliente durante tres minutos y se pone bajo el grifo del agua corriente, para que baje la presión y se pueda abrir la tapa.
  - Nueve minutos. Se vierte agua en la olla hasta el nivel del accesorio encima del cual se ponen los contenedores termorresistentes con la solución de desenmascaramiento y los portaobjetos. Se tapa y cuando llega a la presión máxima se baja la intensidad de la placa caliente y se deja hervir durante nueve minutos. Se enfría bajo el grifo del agua corriente para poder abrir la tapa.

En todos los casos se dejan atemperar 20 minutos, tras los cuales se introducen en PBS.

- Solución de desenmascaramiento: tampón de citrato (0,01 M, pH 6,0) y EDTA (0,001 M, pH 8).

Con la combinación de estas tres variables se obtuvieron los diferentes métodos a seguir, que quedan reflejados en la Tabla 1. Además, para todos los Ac y en todos los bloques multitejido, se realizó el método estándar que se utiliza normalmente en nuestro laboratorio y que se indica en la Tabla 2.

Las características de los Ac primarios analizados (casas comerciales, clon, diluciones, tipo de tinción y tipo de control positivo aconsejado por la casa comercial) quedan asimismo reflejadas en la Tabla 2. Todos fueron seleccionados entre aquéllos que ofrecen mayores dificultades de detección, excepto la vimentina (citoplasmático), el CD45 (membrana) y los receptores de progesterona (nucleares) que, no ofreciendo dificultades, se han utilizado como control adicional.

**Tabla 1. Métodos de desenmascaramiento utilizados.**

	Método A	Método B	Método C	Método D	Método E	Método F	Método G	Método H
Fuente de calor	MO	MO	MO	MO	Olla	Olla	Olla	Olla
Tiempo	3 x 5'	10'	3 x 5'	10'	3'	9'	3'	9'
Solución	Citrato	Citrato	EDTA	EDTA	Citrato	Citrato	EDTA	EDTA

(MO = horno microondas)

De los bloques multitejido se obtuvieron secciones de entre 2 y 3 micras que se montaron en portaobjetos tratados con adhesivo tisular, para evitar la pérdida de tejido con los diferentes métodos de desenmascaramiento antigénico. Tras incubar los cortes a 60 °C durante toda la noche, se desparafinaron en xilol, se hidrataron en alcoholes decrecientes, se introdujeron en agua destilada y por último en PBS, tras lo cual se distribuyeron según los diferentes métodos de desenmascaramiento antigénico descritos anteriormente. Se procedió a su realización junto con el método estándar para cada Ac. Después del desenmascaramiento antigénico particular se procedió a la inmunotinción automática con Horizon TechMate, en el cual se incubaba el tejido durante 30 minutos con anticuerpo primario, y el resto del proceso se realizó con Envision (Dako) y el revelado con DAB plus (Dako). Se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron en un medio permanente.

## RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 378 secciones teñidas inmunohistoquímicamente (14 anticuerpos x 9 métodos x 3 bloques multitejidos).

Las laminillas inmunoteñidas fueron evaluadas independientemente por dos de nosotros considerando tres variables: la cantidad de células teñidas, la intensidad de la tinción específica y la tinción de fondo. Se contrastaron los

**Tabla 2. Anticuerpos, casa comercial, clon, dilución, tipo de tinción, tejido control y método estándar en nuestro laboratorio.**

Anticuerpos	Casa comercial	Clon	Dilución	Tipo tinción	Control	Estándar
bcl-6	DAKÓ	PG-B6p	1:10	Nuclear	Amígdala	Olla, EDTA
Ciclina D1	NOVOCASTRA	P2D11F11	1:10	Nuclear	Cáncer mama	MO, 2 x 7'
Ki 67	DAKO	Policlonal	1:40	Nuclear	Amígdala	MO, 4 x 15'
p53	DAKO	DO7	1:25	Nuclear	Cáncer mama	MO, 2 x 15'
R. progesterona	NOVOCASTRA	1A6	1:50	Nuclear	Cáncer mama	MO, 2 x 5'
CD1a	IMMUNOTECK	JPM30	Prediluido	Membrana	Piel	MO, 2 x 5'
CD4	NOVOCASTRA	1F6	1:5	Membrana	Amígdala	MO, 4 x 5'
CD7	NOVOCASTRA	CD7-272	1:50	Membrana	Amígdala	MO, 2 x 5'
CD8	NOVOCASTRA	1A5	1:20	Membrana	Amígdala	MO, 3 x 5'
CD10	NOVOCASTRA	56C6	1:50	Membrana	Riñón	MO, 2 x 5'
CD45	DAKO	1.22/4.14	1:200	Membrana	Amígdala	MO, 2 x 5'
LMP1	DAKO	CS11, CS2, CS3, CS4	1:100	Membrana	Linf. Hodgkin	MO, 2 x 5'
Colágeno IV	DAKO	CIV 22	1:25	Citoplasma	Riñón	MO, 2 x 5'
Vimentina	DAKO	V9	1:25	Citoplasma	Amígdala	MO, 2 x 5'

(MO = horno microondas; tampón citrato pH=7,3).

**Tabla 3. Resultados.**

	Método A MO citrato	Método B MO citrato	Método C MO EDTA	Método D MO EDTA	Método E Olla citrato	Método G Olla EDTA	Estándar (Tabla 2)
Anticuerpos	3 x 5'	10'	3 x 5'	10'	3'	3'	
bcl-6			++	+++			
Ciclina D1			++	++			+++
Ki 67			++	++			+++
p53	+++						
R. Progesterona			+++				
CD1a			++				+++
CD4	+++		++				
CD7	++	++	+++	++			
CD8			+++	++			
CD10			+++	++		++	
CD45	+++				++	++	
LMP1					+++	++	
Colágeno IV	++	+++					
Vimentina	++	++			+++		

[+++ = inmunotinción excelente; ++ = inmunotinción aceptable; MO = microondas]

resultados y las divergencias se solucionaron por consenso tras revisar los casos. No se observó inmunotinción o ésta fue escasa tanto con el método F como con el H, ambos en la olla durante nueve minutos. La Tabla 3 muestra los mejores resultados obtenidos para cada uno de los métodos. En la valoración se ha seleccionado el mejor resultado obtenido sobre el control específico de cada Ac.

En cuanto a la fuente de calor, doce Ac funcionaron mejor en el horno microondas y dos con la olla a presión. En cuanto a la solución tampón, seis funcionaron bien con tampón de citrato pH 6.0, tres con tampón de citrato pH 7.3 y cinco con EDTA. Con este último se observó una mejora de la inmunotinción, pero con un incremento de la tinción de fondo que no llegaba a alterar o dificultar la interpretación del resultado. En concreto, es espectacular el resultado obtenido con el EDTA en el caso de los receptores de progesterona, que se incluyeron en el estudio como control, en los que tanto la intensidad como el número de células positivas aumentaron considerablemente en comparación con el método estándar.

## DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos demuestran que cada Ac o grupo de Ac se beneficia de un método de desenmascaramiento antigénico idóneo y que no disponemos en la actualidad de un único método aplicable sistemáticamente y capaz de obtener resultados óptimos de forma generalizada. Esto mismo se desprende de multitud de estudios con enfoques diversos, variando la fuente de calor, el tiempo, el tipo de solución desenmascaradora, el pH de la misma o la temperatura de fijación de los tejidos (4, 6, 7, 9, 10, 15, 16, 18, 19).

Ya en 1996 (9) observamos que en algunos antígenos era mejor el desenmascaramiento con horno microondas, en otros era mejor con olla a presión y en otros, por último, los dos métodos eran igual de efectivos. En general, cada laboratorio utiliza uno u otro tipo de fuente de calor con resultados óptimos y, de hecho, los diferentes métodos para el desenmascaramiento antigénico pueden dar intensidades de inmunotinción similares si los tiempos de calor se ajustan apropiadamente (10-12). En este estudio, los mejores resultados se han obtenido con microondas (excepto para el LMP1 y la vimentina), pero quizás se podrían conseguir los mismos resultados con la olla variando el tiempo de cocción. En cambio, los métodos F y H han sido los peores. Tal vez, debido a que no existe en ellos un contacto direc-

to con la fuente de calor; el contenido del recipiente eleva su temperatura a expensas de la atmósfera de vapor que se crea en el interior de la olla a presión.

Con la aproximación experimental de nuestra investigación, podemos observar que, de los once Ac con dificultades, ocho mejoraron satisfactoriamente la inmunotinción, mientras que los tres restantes no se vieron beneficiados en relación con la técnica que ya se estaba utilizando (estándar). Cabe destacar que en nuestro laboratorio la introducción de cada nuevo Ac va acompañada de una investigación somera de las condiciones ideales de inmunotinción, incluyendo el método de desenmascaramiento antigénico. Ello explica que Ac que pueden ofrecer dificultades de inmunodetección como la ciclina D1, Ki-67 y CD1a, ofrezcan resultados óptimos con el método estándar (ver Tabla 2), el cual ha sido sometido a un extenso estudio previo, que incluye variables específicas como las condiciones de incubación, la concentración de Ac primario, los cortes histológicos recientes, etc., que no han sido objeto de consideración en este trabajo.

Nos ha sorprendido observar que en los tres anticuerpos que incluimos como controles y cuya tinción considerábamos correcta, ésta ha mejorado con otros métodos diferentes al estándar. Ya hemos comentado más arriba los receptores de progesterona. Si observamos la vimentina, vemos que tanto con el método E como con el A y el B la inmunotinción es mejor que con el método estándar. La diferencia entre el método E y el estándar radica en la fuente de calor y entre los métodos A y B y el estándar, en el tiempo de incubación. Además, en ambos casos el pH del citrato (6.0) es diferente al del estándar (7.3). Algo similar ocurre con el CD45, cuya inmunotinción mejora tanto con el método A como con los métodos E y G. Las únicas diferencias entre el método óptimo, que es el A, y el estándar son una tanda más de MO y el pH del tampón.

De todo ello puede concluirse que los tiempos de calor son muy importantes y, de hecho, se observa que al aumentar los tiempos aumenta la intensidad de la tinción y el número de células teñidas, aunque este dato debe tomarse con cautela debido al riesgo de falsos positivos (13).

La solución desenmascaradora más utilizada por todos los laboratorios es el citrato sódico con pH ácido o básico, según el anticuerpo (14), que en general es muy efectivo. Hay diversos estudios que lo comparan con otras soluciones como el EDTA con pH 8 (15, 16) que hemos utilizado también en este trabajo y que, en nuestro caso, ha sido muy efectivo en la mayoría de los Ac (Tabla 3), ya que en nueve de ellos la inmunotinción ha sido excelente o aceptable, con tinción de fondo en algún caso pero sin que llegara a afectar su evaluación. Esto supone una mejora notable de los resultados en comparación con el método estándar en seis Ac, entre ellos bcl-6, CD4, CD7, CD8 y CD10, todos de utilidad creciente en el diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos. Pensamos que el efecto beneficioso no está sólo en la solución desenmascaradora sino también en el pH, ya que algunos autores han obtenido resultados similares sobre los mismos Ac con citrato sódico a pH básico (17). En nuestro estudio cabe destacar el alto rendimiento del método A (MO, citrato,  $3 \times 5'$ ), que ha conseguido el mejor resultado de todo el estudio para p53 y resultados óptimos para CD4 y CD45.

En conclusión, nuestros hallazgos resaltan la necesidad, tal y como otros autores han sugerido (18) de someter cada nuevo Ac que se incorpora a un laboratorio a una batería de diferentes tampones o soluciones desenmascaradoras a diferentes pH, fuentes y tiempos de calor para obtener el máximo rendimiento.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el excelente trabajo técnico de Dña. Anna Carot Bladé, Dña. Rosa Cabrera Pino y D. Marc Iniesta Valdepérez.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Huang SN, Minassian H, More JD. *Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion*. Lab Invest 1976; 35: 383-390.
2. Shi SR, 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.
3. 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.

4. Miller K, Auld J, Jessup E, Rhodes A, Ashton-Key M. *Antigen unmasking in formalin-fixed routinely processed paraffin wax-embedded sections by pressure cooking: A comparison with microwave oven heating and traditional methods.* Adv Anat Pathol 1995; 2: 60-64.
5. Bankfalvi A, Navabi H, Bier B, Böcker W, Jasani B, Schmid KW. *Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry.* J Pathol 1994; 174: 223-228.
6. Leong ASY, Milios J, Joel Leong F. *Epitope retrieval with microwaves. A comparison of citrate buffer and EDTA with three commercial retrieval solutions.* Appl Immunohistochem 1996; 4: 201-207.
7. Taylor CR, Shi SR, Cote RJ. *Antigen retrieval for immunohistochemistry. Status and need for greater standardization.* Appl Immunohistochem 1996; 4(3): 144-166.
8. Bosch Príncipe R, Álvaro Naranjo T, Martínez González S, Tomás Arasa B, Barberá Marro MM, Risa Royo R, Suñé Martín A, Salvadó Usach MT. *Bloques multimuestra. Preparación y uso en un laboratorio de Patología.* III Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Febrero-Abril 2000.
9. Álvaro Naranjo T, Salvadó Usach MT, Martínez González S, Bosch Príncipe R, Risa Royo R, Barberá Marro MM. *Desenmascaramiento antigénico no enzimático. Estudio comparativo entre horno microondas y olla a presión en secciones de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina.* Patología 1996; 29: 217-225.
10. Taylor CR, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C, Cote RJ. *Comparative study of antigen retrieval heating methods: Microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer.* Biotech Histochem 1996; 71: 263-270.
11. Evers P, Uylings HB, Suurmeijer AJ. *Antigen retrieval in formaldehyde-fixed human brain tissue.* Methods 1998; 15: 133-140.
12. Shiurnba RA, Spooner ET, Ishiguro K, Takahashi M, Yoshida R, Wheelock TR, Imahori K, Cataldo AM, Nixon RA. *Immunocytochemistry of formalin-fixed human brain tissues: Microwave irradiation of free-floating sections.* Brain Res Protoc 1998; 2: 109-119.
13. Allison RT, Best T. *p53, PCNA and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinomas: The vagaries of fixation and microwave enhancement of immunocytochemistry.* J Oral Pathol Med 1998; 27: 434-440.
14. Shi SR, Cote RJ, Yang C, Chen C, Xu HJ, Benedict WF, Taylor CR. *Development of an optimal protocol for antigen retrieval: A "test battery" approach exemplified with reference to the staining of retinoblastoma protein (pRB) in formalin-fixed paraffin sections.* J Pathol 1996; 179: 347-352.
15. Imam SA, Young L, Chaiwun B, Taylor CR. *Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining.* Anticancer Res 1995; 15: 1153-1158.
16. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabbatini E, Ascani S, Sanitini D, Piccaluga PP, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L, Falini B. *Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: Comparison of different methods.* J Pathol 1997; 183: 116-123.
17. Masera A, Stanisa O, Ovcak Z, Cor A. *Effect of pH on Ki-67 antigen retrieval in renal cell carcinoma.* Acta Med Croatica 1999; 53: 15-17.
18. Shi SR, Cote RJ, Chaiwun B, Young LL, Shi Y, Hawes D, Chen T, Taylor CR. *Standardization of immunohistochemistry based on antigen retrieval technique for routine formalin-fixed tissue sections.* Appl Immunohistochem 1998; 6(2): 89-96.
19. Van der Broek LJC.M. Van de Vijver MJ. *Assessment of problems in diagnostic and research immunohistochemistry associated with epitope instability in stored paraffin sections.* Appl Immunohistochem & Mol Morph 2000; 8: 316-321.