



# Técnicas de inmunohistoquímica

## Estandarización y control de calidad en inmunohistoquímica (1ª parte)

### Problemas de fijación y procesamiento de los tejidos: la recuperación antigénica como solución

J.R. Riera Velasco

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Valle del Nalón, Langreo, Asturias.*

#### INTRODUCCIÓN

Si comparamos la inmunohistoquímica (IHQ) con otras técnicas que se utilizan habitualmente en los laboratorios de anatomía patológica, nos damos cuenta de que es muy técnico-dependiente y es difícil conseguir una calidad adecuada y mantenida en el tiempo. La variabilidad de sus resultados ha sido la causa de la pobre reproducibilidad tanto entre los laboratorios como en uno solo.

El efecto no predecible de la fijación en los epítomos tisulares es sin duda uno de los factores que más han contribuido al problema de la falta de reproducibilidad y difícil estandarización, pero debemos considerar otros factores, como los relacionados con la calidad de anticuerpos (30) y reactivos y también aquellos que se derivan de la interpretación subjetiva por el patólogo de los diversos patrones de tinción (49). A pesar de estos inconvenientes, la IHQ ha crecido en los últimos 20 años hasta convertirse en parte esencial de la anatomía patológica, no sólo en la rutina diagnóstica sino también en la investigación morfológica. Por todo ello, en los últimos diez años se ha incrementado la atención hacia la mejora de la calidad de la IHQ (9, 13, 22, 36, 43, 48, 58, 72, 79).

Sin duda, dos hechos han marcado el rápido desarrollo de la IHQ: en primer lugar, el descubrimiento por Shi y cols. (67), quienes demostraron que la mayoría de los antígenos afectados por la fijación con formol pueden ser recuperados para la IHQ con el simple calentamiento de los tejidos; y, en segundo lugar, el valor clínico-terapéutico que ha cobrado la determinación por IHQ de los receptores hormonales en el cáncer de mama (1, 2, 6, 17, 18-20, 21, 24-28, 37, 44, 45, 52, 61). La posibilidad de comparar los receptores estrogénicos determinados por métodos bioquímicos cuantitativos con la determinación inmunohistoquímica ha permitido establecer los principios clave de aplicación general para la estandarización de la IHQ.

La validez de la IHQ en el diagnóstico histopatológico depende de la calidad de las inmunotinciones. Además de la calidad de los anticuerpos y sistemas de detección, otros factores tienen un impacto importante en la inmunotinción: la fijación y procesamiento de los tejidos, el desenmascaramiento de los epítomos, y la sensibilidad del sistema de detección.

En esta revisión, que es la primera de otras tres, discutimos los problemas causados en IHQ por la fijación y procesamiento de los tejidos y las soluciones que nos ofrecen los métodos de recuperación antigénica.

## EFFECTOS DE LA FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS

No hay un fijador universal para la inmunohistoquímica. El formol tamponado neutro al 10% ha sido reconocido durante muchos años como el fijador universal en los laboratorios de anatomía patológica en todo el mundo. Explicado de una forma muy simple, el formol fija los tejidos produciendo enlaces intermoleculares, principalmente entre proteínas, en particular en cualquier grupo que contenga hidrógenos activos, como los grupos químicos amino, amido y guanidil. Esto trae como consecuencia la alteración de la antigenicidad de algunos epítomos de interés (34, 68, 71).

Recientemente se ha sugerido que los iones de calcio tienen un papel importante en los enlaces interproteicos inducidos por el formol (50, 51). Los grupos hidroximetileno pueden facilitar la unión entre iones de calcio y átomos de oxígeno en residuos aspartato o glutamato de diferentes cadenas polipeptídicas.

El grado de alteración de los epítomos producida por el formol es directamente proporcional a la duración de la fijación (29, 68), de manera tal que para conseguir una óptima fijación y preservación antigénica las biopsias pequeñas deberían fijarse no menos de cuatro horas ni más de ocho horas, y las piezas grandes al menos ocho horas y no más de 24 horas. Pero lo que sí está claro es que la fijación ha de ser inmediata para evitar los efectos de la proteólisis, los cuales no pueden solucionarse. Además, cuando sea posible y se tenga la sospecha de estar ante una lesión tumoral o problemática, se recomienda fijar en alcohol una pequeña porción de tejido, ya que los fijadores coagulativos permiten una excelente preservación antigénica, sobre todo para filamentos intermedios y algunas otras proteínas, como p53 (74).

Una corta fijación interrumpe el proceso que se completará con una fijación con alcohol en el proceso de deshidratación. Por ello los cortes pueden variar en intensidad de tinción desde el centro a la periferia, tiñéndose con diferentes intensidades dependiendo del tipo de antisuero utilizado. Si deshacemos el bloque de parafina e intentamos una nueva fijación en formol, en algunos casos pueden solucionarse estos problemas. Por el contrario, cuando la fijación es muy prolongada, una recuperación antigénica más intensa puede ser la solución. El empleo de otros fijadores comerciales (57) "de nueva generación" podría favorecer buenos resultados de las tinciones inmunohistoquímicas, pero todavía se tiene poca experiencia.

En hematopatología es frecuente la utilización de B5 o Bouin, que, como sabemos, proporciona un muy buen detalle morfológico celular. Este fijador muestra resultados paralelos al formol cuando se practica posteriormente recuperación antigénica, salvo en algunos nuevos marcadores linfoides, como ciclina D1, CD5 y Bcl-6, los cuales muestran menor sensibilidad en tejidos preservados en este fijador (32, 42, 56, 69, 70).

Las médulas óseas necesitan un proceso de decalcificación una vez fijadas. La fijación suele realizarse también con B5. En nuestra experiencia y en la de otros muchos, la decalcificación permite la utilización de la práctica totalidad de los antisueros de empleo diagnóstico más comunes salvo excepciones, como, por ejemplo, BerEP4 (glicoproteína epitelial) (4, 11, 23, 32).

Está claro que todos los intentos de mejorar los resultados iniciales de la IHQ se han centrado en tejidos incluidos en parafina y fijados en formol. Por ello la denominada recuperación antigénica se ha fundamentado en este fijador. Podemos diferenciar dos grandes tipos de recuperación antigénica: la enzimática y la no enzimática.

### Recuperación antigénica enzimática

La digestión enzimática como método de recuperación antigénica para la IHQ fue introducida por Huang y cols. (38). El tratamiento de las secciones con enzimas proteolíticas no sólo digiere los enlaces causados por la fijación, sino que también rompe uniones normales en proteínas nativas y puede causar la reducción de la intensidad o la pérdida de la inmunorreactividad (76).

Se han utilizado enzimas que incluyen tripsina, proteinasa K, pronasa, ficina y pepsina, entre otras. Algunas de éstas proporcionan una digestión intensa, como es el caso de la pepsina (35); otras, una digestión mucho más débil, como la ficina (3) y la proteinasa K; y, por fin, algunas, como la tripsina y la pronasa, producen una digestión intermedia. El uso de una enzima particular, su concentración y el tiempo de incubación vienen determinados por las condiciones de la fijación. En general, el tiempo de digestión es proporcional a la longitud de la fijación (54).

Cada epítipo muestra propiedades individuales que deben ser estudiadas de forma particular, lo que, añadido a las numerosas variables que intervienen en la digestión enzimática, hace muy difícil la normalización de este procedimiento. Nosotros recomendamos que ante un nuevo anticuerpo se establezca, con el empleo de los controles tisulares adecuados, un tiempo de incubación de diez minutos para tres enzimas de diferente intensidad de digestión, como pueden ser ficina (débil), tripsina (moderada) y pepsina (fuerte).

En nuestro laboratorio se emplea de manera rutinaria proteinasa K (débil) y pepsina (fuerte) (Tabla 1).

**Tabla 1. Protocolo de digestión enzimática.**

- Pepsina:
  - 0,4% de pepsina (p7012 Sigma) en solución de ácido clorhídrico 2N
  - 10 m en estufa de 60 °C
  - Inmersión en agua destilada
- Proteínasa K (S 2019 Dako):
  - Una gota en 2 ml de diluyente (S 2032 Dako)
  - 15 m a temperatura ambiente

### Recuperación antigénica no enzimática

La recuperación antigénica no enzimática está basada en el calentamiento de los tejidos y se ha recomendado como componente integral de la IHQ de rutina. La recuperación antigénica con calor fue originalmente descrita por Shi y cols. (67), quienes se basaron en los trabajos de Fraenkel-Conrat y Olcott (31) en 1948. Ellos formularon la hipótesis según la cual los enlaces proteicos en formol pueden ser revertidos por alta temperatura o por fuerte hidrólisis con álcali. Esta hipótesis fue confirmada por los trabajos de Masson y O'Leary (47), quienes compararon la albúmina sérica, la ribonucleasa A y la hemoglobina con y sin fijación formólica, y mostraron que la desnaturalización ocurría entre 70 °C y 90 °C en las proteínas no fijadas, mientras las proteínas fijadas resistían a la desnaturalización en el mismo rango de temperatura. La recuperación antigénica puede tener la ventaja de esta protección de las estructuras primaria y secundaria de las proteínas que ofrece la fijación en formol, aunque es poco probable que éste sea el único mecanismo que esté implicado (77, 78).

De los 52 anticuerpos monoclonales y policlonales probados por Shi y cols. (67) en su trabajo original empleando un microondas y una solución *buffer* de tiocianato de plomo, en 39 los autores demostraron un incremento significativo de la inmunotinción, nueve no mostraron cambios y cuatro manifestaron reducción de la tinción.

El trabajo de Shi y cols. fue la base para acercar la IHQ a todos los laboratorios e introducirla de manera definitiva en la rutina diagnóstica. Por ello todos aquellos resultados de IHQ publicados anteriormente deben ser reevaluados. Muchos otros autores (14, 33, 76, 77) han estudiado el efecto de la recuperación antigénica con calor en diferentes condiciones, con resultados bastante similares (Tabla 2).

Las cuestiones referentes a la recuperación antigénica no enzimática que se pueden plantear son las siguientes: ¿qué importancia tienen las diferentes fuentes de calor?, ¿qué solución *buffer* es la más apropiada?

**Tabla 2. Anticuerpos que mejoran con recuperación antigénica con calor y anticuerpos que no se benefician del calentamiento, que aparecen en al menos dos trabajos publicados.**

Anticuerpos que mejoran con recuperación antigénica con calor	Anticuerpos que no mejoran
AFP	Bcl-2
CEA	c-erb-B2
CD3	CD30 (BerH2)
CD31	CD34
CD43	CD57
CAM 5.2	Receptores estrogénicos
Insulina	Ki-67
Queratina 18	Queratina 19
Queratina 7	Queratina 35BE12
p53	PCNA
PLAP (P)	Tdt
Vimentina	VIP (P)

da?, ¿cuáles son los efectos adversos?, ¿qué ocurre si combinamos digestión enzimática y recuperación no enzimática? Si queremos estandarizar la recuperación antigénica no enzimática debemos resolver los problemas relacionados con: la solución *buffer* óptima y el pH; las condiciones de calentamiento para cada antisuero y el tiempo necesario; la selección del método de calentamiento; la interpretación de los resultados obtenidos basados en la variación de la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos.

Partiendo de la premisa de que no existen métodos universales que puedan ser aplicados a todos los antisueros, podemos apuntar, no obstante, algunas recomendaciones de orden práctico basadas en nuestra experiencia y en los resultados que se observan en la literatura. La fuente de calor (7, 8, 10, 12, 39, 53, 55) no tiene mayor importancia ni incide en la recuperación antigénica (76) (Tabla 3). Si tenemos en cuenta la sencillez, el bajo coste, el tiempo empleado, la cantidad de muestras y la reproducibilidad de los resultados, nosotros recomendamos el empleo de la olla a presión.

Cattoretti y cols. (16) utilizaron por primera vez el *buffer* citrato a pH 6 en la recuperación antigénica no enzimática. Lo emplearon para el Ki-67, obteniendo excelentes resultados. A partir de este trabajo han sido numerosos los estudios que demuestran que el *buffer* citrato a pH 6 es una solución útil para la gran mayoría de los antisueros empleados en la rutina diagnóstica (Tablas 4 y 5). Además, con el empleo de esta solución se obvian los problemas derivados de la presencia de metales pesados en las soluciones utilizadas inicialmente (5, 35). Algunos autores demuestran que otras soluciones a diferentes pH (29, 62, 64, 66) pueden mejorar los resultados en algunos anticuerpos. Así se han utilizado soluciones de tris-HCL con urea y glicina (50, 65, 70) (sustancias caotrópas) y EDTA (40, 56) (ácido dietilendiamino tetracético), básicamente. En nuestra experiencia muy pocos antisueros se benefician de manera significativa del empleo de soluciones *buffer* distintas al *buffer* citrato.

**Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de diferentes fuentes de calor para recuperación antigénica.**

Fuente de calor	Ventajas	Desventajas	Tiempo
Microondas	Simple y barato	Control del nivel de <i>buffer</i> , pocos cristales	25 min
Microondas + olla a presión	Simple, barato, muchos cristales	Necesita precalentamiento	35 min
Olla a presión	Simple, barato, muchos cristales	Necesita precalentamiento	30 min
Vaporizador de verduras	Compatible con sistemas automáticos, poca solución <i>buffer</i>	Necesita precalentamiento	35 min
Autoclave	Muchos cristales, control de tiempo y temperatura	Costoso, requiere un cuidadoso manejo	45 min

Tabla 4. Comparación entre diferentes métodos de desmascaramiento antigénico (Hospital Valle del Nalón).

Anticuerpo	Origen	Clon	Dilución	Tratamiento			
				PC/BC	PC/TRIS	ED	N
Actina	Dako	HHF35	1:50	++	+	+++	+++
BCL-2	Dako	124	1:10	+++	++	-	-
BerH2	Dako	BERH2	1:15	+++	++	+	+
BerEP4	Dako	BerEP4	1:100	++	-	+++	+
C. Kappa	Dako	Policlonal	1:12.000	++	-	-	+
C. Lambda	Dako	Policlonal	1:12.000	++	-	-	-
CD3	Dako	Policlonal	1:100	+++	++	++	-
CD5	Novocastr	4C7	1:5	+++	++	-	-
CD15	BD	MMA	1:50	+++	++	++	++
CD20	Dako	L26	1:50	+++	+++	++	++
CD23	Novocastr	1B12	1:10	+++	++	-	-
CD31	Dako	JC/70A	1:20	+++	++	-	-
CD34	Biogenex	QBEND/10	1:20	+++	+++	++	++
CD43	Dako	DF-T1	1:50	+++	++	++	++
CD45RO	Dako	UCHL1	1:100	+++	+++	++	++
CD45RB	Dako	PD7/26+2B11	1:250	+++	++	++	++
CD56	Zymed	123C3	1:20	+++	+++		
CD68	Dako	KP1	1:100	++	+++	++	++
CD79a	Dako	HM57	1:10	+++	+	-	-
CEA	Dako	11-7	1:200	+++	++	-	-
Colágeno IV	Dako	CLV22	1:50	+++	++	-	-
Cromogranina	BD	LK2H10	1:200	++	+	-	+
CKP	Biotek	MEZCLA	Prediluido	++	++	+++	+
CK 7	Dako	OV-TL12/30	1:50	++	++	+++	++
CK 8	Dako	35BH11	1:25	++	+	+++	+
CK 20	Biogenex	ITKS20.8	1:40	++	++	+++	+++
CK AE1-AE3	Dako	AE1-AE3	1:50	+++	++	+	+
CK (CAM 5.2)	Becton Dic	CAM 5.2	Prediluido	++	+	+++	++
Queratina MA-903	Enzo	34BE12	Prediluido	++	+++	-	-
Desmina	Dako	D33	1:25	+++	++	-	+
EMA	Dako	E29	1:200	+++	+++	++	++
ENS	BD	5E2	1:2	+++	+	-	+++
Factor VIII	Dako	F8/86	1:100	+++	-	++	++
<i>Helicobacter pylori</i>	Dako	Policlonal	1:100	++	+++	-	-
HMB45	Dako	HMB45	1:200	+++	+++	+++	++
KI-67	Biogenex	MIB1	1:10	+++	-	-	-
Mieloperoxidasa	Dako	Policlonal	1:1000	+++	+	+	++
p53	Novocastr	DO7	1:10	++	++	-	-
PCNA	Dako	PC10	1:10	-	++	-	+
PSA	Biogenex	ERPR8	1:200	+++	+++		++
Receptores de estrógenos	Novocastr	1*6	1:10	+++	+	-	+
Receptores de progesterona	Novocastr	6F11	1:50	+++	-	-	-
S-100	Dako	Policlonal	1:200	+++	++	+++	+++
Trombomodulina	Dako	1009	1:10	++	-	++	+++
TDT	Dako	Policlonal	1:10	+++	++	+	+
Vimentina	Dako	V9	1:50	+++	+++	-	++

PC/BC: olla, *buffer* citrato; PC/TRIS: olla, *buffer* Tris; ED: proteinasa K; N: ningún tipo de desmascaramiento; +++: muy bien; ++: bien; +: regular; -: mal.

**Tabla 5. Anticuerpos que no mejoran con PC/BC (olla, buffer citrato).**

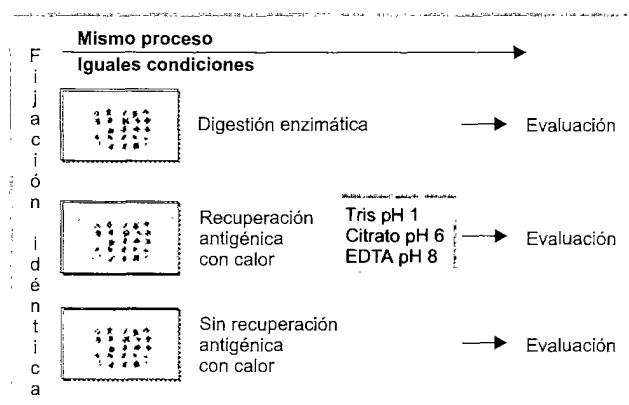
Anticuerpo	Origen	Clon	Dilución	Tratamiento			
				PC/BC	PC/TRIS	ED	N
Actina	Dako	HHF35	1:50	++	+	+++	+++
BerEP4	Dako	BerEP4	1:100	++	-	+++	-
CD68	Dako	KP1	1:100	++	+++	++	++
CKP	Biotek	Mezcla	Prediluido	++	++	+++	+
CK 7	Dako	OV-TL12/30	1:50	++	++	+++	++
CK 8	Dako	35BH11	1:25	++	+	+++	+
CK 20	Biogenex	ITKS20.8	1:40	++	++	+++	+++
CK (CAM 5.2)	Becton Dic	CAM 5.2	Prediluido	++	+	+++	++
Queratina MA-903	Enzo	34BE12	Prediluido	++	+++	-	-
<i>Helicobacter pylori</i>	Dako	Policlonal	1:100	++	+++	-	-
PCNA	Dako	PC10	1:10	-	++	-	+
Trombomodulina	Dako	1009	1:10	++	-	++	+++

<PC/BC: olla, buffer citrato; PC/TRIS: olla, buffer Tris; ED: proteinasa K; N: ningún tipo de desmascaramiento; +++: muy bien; ++: bien; +: regular; -: mal.

Se ha publicado, y nosotros lo hemos comprobado, que el empleo de recuperación antigénica no enzimática con calor disminuye la tinción de fondo (46, 59, 75) e incluso, por ejemplo en el caso de algunos anticuerpos, desaparece la tinción espúrea que se observa de algunos elementos celulares, como las células plasmáticas con el anticuerpo anti-CD30. Pero, como ya mencionamos, algunos antígenos empeoran y otros no mejoran con la recuperación antigénica. Uno de los efectos adversos más importantes es la presencia de artefacto en los tejidos en forma de roturas y dehiscencias, e incluso de despegamiento total por efecto de la elevada temperatura. En nuestra experiencia no ha significado en ningún caso un grave problema, pero hemos de tener en cuenta siempre el tamaño de la muestra (a menor tamaño mayor artefacto) y el tipo de tejido (si contiene gran cantidad de tejido adiposo –como es el caso de muchas muestras de mama–, mayor artefacto). Otro problema a tener en cuenta es la recuperación de la biotina endógena cuando se empleen sistemas de detección del tipo complejo avidina-biotina y estreptavidina-peroxidasa (15). La recuperación antigénica restaura la actividad de la biotina endógena, y esto es particularmente problemático en tejidos como el hígado, el riñón y el córtex adrenal, así como en los tumores que tienen células oxifílicas, especialmente carcinomas del riñón. En los tumores de tiroides (41) este problema de reactividad citoplásmica de biotina es marcado incluso con recuperación de tipo enzimático.

La combinación de digestión enzimática y recuperación antigénica con calor es posible y recomendable solamente en inusuales ocasiones. Se han obtenido buenos resultados con la combinación de ambos métodos y el empleo, además, de sonicación para la ciclina D1, que nosotros también hemos reproducido.

El aumento de sensibilidad que se obtiene con la recuperación antigénica no enzimática es sin duda una gran ventaja, pero supone algunos inconvenientes. El número de células y la intensidad se incrementan, de manera que esto puede ser un problema, sobre todo en la evaluación de marcadores pronóstico, como *p53* (73), y en algunas situaciones espe-



**Figura 1.** Test para estandarizar la recuperación antigénica.

ciales, como puede ser el diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma metastásico, pleural y mesotelioma maligno epiteliode, en el cual la expresión de vimentina en adenocarcinomas aumenta de forma espectacular hasta perder su significación diagnóstica (60).

En conclusión, la optimización de la recuperación antigénica debe incluir un test (63, 64) para cada anticuerpo del tipo que se propone en la Fig. 1.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts SR, Ingle JN, Roche PR y cols. *Comparison of estrogen receptor determinations by a biochemical ligand-binding assay and immunohistochemical staining with monoclonal antibody ER1D5 in females with lymph node positive breast carcinoma entered on two prospective clinical trials.* Cancer 1996; 78: 764-772.
2. Alsabeh R, Wilson CS, Ahn CW y cols. *Expression of bcl-2 by breast cancer: A possible diagnostic application.* Mod Pathol 1996; 9: 439-444.
3. Andrade RE, Hagen KA, Swanson PE y cols. *The use of proteolysis with ficin, for immunostaining of paraffin sections. A study of lymphoid, mesenchymal, and epithelial determinants in human tissues.* Am J Clin Pathol 1988; 90: 33-39.
4. Arber JM, Arber DA, Jenkins KA y cols. *Effect of decalcification and fixation in paraffin-section immunohistochemistry.* Appl Immunohistochem 1996; 4: 241-248.
5. Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ y cols. *An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms.* J Pathol 1994; 172: 5-12.
6. Baddoura FY, Cohen C, Unger ER y cols. *Image analysis for quantitation of estrogen receptor in formalin-fixed paraffin-embedded sections of breast carcinoma.* Mod Pathol 1991; 4: 91-95.
7. Baker Cairns B, Meyers K, Hamilton R y cols. *Immunohistochemical staining of fixed tissue using antigen retrieval and a thermal cycler.* Biotechniques 1996; 20: 641-650.
8. Balaton AJ, Berthelot N, Cuadrado C y cols. *Antigenic retrieval using a pressure cooker.* Ann Pathol 1996; 16: 307-309.
9. Balaton AL, Coindre JM, Collin F y cols. *Recommendations for the immunohistochemical evaluation of hormone receptors on paraffin sections of breast cancer. Study Group on Hormone Receptors using Immunohistochemistry FNCLCC/AFAQAP. National Federation of Centres to Combat Cancer/French Association for Quality Assurance in Pathology.* Ann Pathol 1996; 16: 144-148.
10. Bankfalvi A, Navabi H, Bier B y cols. *Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry.* J Pathol 1994; 174: 223-228.
11. Blythe D, Hand NM, Jackson P y cols. *Use of methyl methacrylate resin for embedding bone marrow trephine biopsy specimens.* J Clin Pathol 1997; 50: 45-49.
12. Boon ME, Kok LP. *Microwaves for immunohistochemistry.* Micron 1994; 25: 151-170.
13. Bosman FT, de Goeij AF, Rousch M. *Quality control in immunocytochemistry: Experiences with the oestrogen receptor assay.* J Clin Pathol 1992; 45: 120-124.
14. Brown RW, Chirala R. *Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry.* Mod Pathol 1995; 8: 515-520.
15. Bussolati G, Gugliotta P, Volante M y cols. *Retrieved endogenous biotin: A novel marker and a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry.* Histopathology 1997; 31: 400-407.
16. Cattoretti G, Becker MH, Key G y cols. *Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB2) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.* J Pathol 1992; 168: 357-363.
17. Cavaliere A, Bucciarelli E, Sidoni A y cols. *Estrogen and progesterone receptors in breast cancer: Comparison between enzyme immunoassay and computer-assisted image analysis of immunocytochemical assay.* Cytometry 1996; 26: 204-208.
18. Chapman JA, Mobbs BG, Hanna WM y cols. *The standardization of estrogen receptors.* J Steroid Biochem Mol Biol 1993; 4-5: 367-373.
19. Charpin C, Martin PM, De Victor B y cols. *Multiparametric study (SAMBAs 200) of estrogen receptor immunocytochemical assay in 400 human breast carcinomas: Analysis of estrogen receptor distribution heterogeneity in tissues and correlations with dextran coated charcoal assays and morphological data.* Cancer Res 1988; 48: 1578-1586.
20. Cohen C, Unger ER, Sgoutas D y cols. *Automated immunohistochemical estrogen receptor in fixed embedded breast carcinomas.* Am J Clin Pathol 1991; 95: 335-339.
21. Colley M, Kommos F, Bibbo M y cols. *Assessment of hormone receptors in breast carcinoma by immunocytochemistry and image analysis. II. Estrogen receptors.* Anal Quant Cytol Histol 1989; 11: 307-314.
22. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM y cols. *Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission.* Am J Clin Pathol 1989; 92: 836-843.
23. Erber WN, Gibbs TA, Ivvey JG. *Antigen retrieval by microwave oven heating for immunohistochemical analysis of bone marrow trephine biopsies.* Pathology 1996; 28: 45-50.
24. Esteban JM, Ahn C, Battifora H y cols. *Predictive value of estrogen receptors evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in breast cancer.* Am J Clin Pathol 1994; 102: S9-12.
25. Esteban JM, Ahn C, Mehta P y cols. *Biologic significance of quantitative estrogen receptor immunohistochemical assay by image analysis in breast cancer.* Am J Clin Pathol 1994; 102: 158-162.

26. Esteban JM, Battifora H, Warsi Z y cols. *Quantification of estrogen receptors on paraffin-embedded tumors by image analysis*. *Mod Pathol* 1991; 4: 53-57.
27. Esteban JM, Felder B, Ahn C y cols. *Prognostic relevance of carcinoembryonic antigen and estrogen receptor status in breast cancer patients*. *Cancer* 1994; 74: 1575-1583.
28. Esteban JM, Kandalaf PL, Mehta P y cols. *Improvement of the quantification of estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded tumors by image analysis*. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 32-38.
29. Evers P, Uylings HB. *An optimal antigen retrieval method suitable for different antibodies on human brain tissue stored for several years in formaldehyde fixative*. *J Neurosci Methods* 1997; 72: 197-207.
30. Finstad CL, Yin BW, Gordon CM y cols. *Some monoclonal antibody reagents (C219 and JSB-1) to P-glycoprotein contain antibodies to blood group A carbohydrate determinants: A problem of quality control for immunohistochemical analysis [published erratum appears in J Histochem Cytochem 1992; 40(2): 318]*. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 1603-1610.
31. Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. *Reaction of formaldehyde with proteins. VI Cross-linking of amino groups with fenol, imidazol or indole groups*. *J Biol Chem* 1948; 174: 827-843.
32. Gala JL, Chenut F, Hong KB y cols. *A panel of antibodies for the immunostaining of Bouin's fixed bone marrow trephine biopsies*. *J Clin Pathol* 1997; 50: 521-524.
33. Gown AM, Weber N, Battifora H. *Microwave-based antigenic unmasking*. *Appl Immunohistochem* 1993; 1: 256-266.
34. Haines DM, Chelack BJ. *Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology*. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3: 101-112.
35. Hazelbag HM, van den Broek LJ, van Dorst EB y cols. *Immunostaining of chain-specific keratins on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: A comparison of various antigen retrieval systems using microwave heating and proteolytic pre-treatments*. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 429-437.
36. Herman GE, Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: The new era of quality control*. *Biotech Histochem* 1991; 66: 194-199.
37. Horsfall DJ, Jarvis LR, Grimbaldeston MA y cols. *Immunocytochemical assay for oestrogen receptor in fine needle aspirates of breast cancer by video image analysis*. *Br J Cancer* 1989; 59: 129-134.
38. Huang SN, Minassian H, More JD. *Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion*. *Lab Invest* 1976; 35: 383-390.
39. Hunt NC, Attanoos R, Jasani B. *High temperature antigen retrieval and loss of nuclear morphology: A comparison of microwave and autoclave techniques*. *J Clin Pathol* 1996; 49: 767-770.
40. Imam SA, Young L, Chaiwun B y cols. *Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining*. *Anticancer Res* 1995; 15: 1153-1158.
41. Kashima K, Yokoyama S, Daa T y cols. *Cytoplasmic biotin-like activity interferes with immunohistochemical analysis of thyroid lesions: A comparison of antigen retrieval methods*. *Mod Pathol* 1997; 10: 515-519.
42. Kaufmann O, Flath B, Späth Schwalbe E y cols. *Immunohistochemical detection of CD5 with monoclonal antibody 4C7 on paraffin sections*. *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 669-673.
43. Kuenen Boumeester V, van Loenen P, De Bruijn EM y cols. *Quality control of immunocytochemical staining of effusions using a standardized method of cell processing*. *Acta Cytol* 1996; 40: 475-479.
44. Layfield LJ, Saria EA, Conlon DH y cols. *Estrogen and progesterone receptor status determined by the Ventana ES 320 automated immunohistochemical stainer and the CAS 200 image analyzer in 236 early-stage breast carcinomas: Prognostic significance*. *J Surg Oncol* 1996; 61: 177-184.
45. Looi LM, Yap SF, Cheah PL. *Correlation between oestrogen receptor protein expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast by immunohistochemistry and cytosol measurements*. *Ann Acad Med Singapore* 1997; 26: 750-753.
46. Loyson SA, Rademakers LH, Joling P y cols. *Immunohistochemical analysis of decalcified paraffin-embedded human bone marrow biopsies with emphasis on MHC class I and CD34 expression*. *Histopathology* 1997; 31: 412-419.
47. Masson JT, O'Leary TJ. *Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: A colorimetric and infrared spectroscopic investigation*. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 225-229.
48. McNicol AM, Richmond JM. *Optimizing immunohistochemistry: Antigen retrieval and signal amplification*. *Histopathology* 1998; 32: 97-103.
49. Mighell AJ, Robinson PA, Hume WJ. *Patterns of immunoreactivity to an anti-fibronectin polyclonal antibody in formalin-fixed, paraffin-embedded oral tissues are dependent on methods of antigen retrieval*. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 1107-1114.
50. Morgan JM, Navabi H, Jasani B. *Role of calcium chelation in high-temperature antigen retrieval at different pH values*. *J Pathol* 1997; 182: 233-237.
51. Morgan JM, Navabi H, Schmid KW y cols. *Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval*. *J Pathol* 1994; 174: 301-307.
52. Nichols GE, Frierson HF, Jr, Boyd JC y cols. *Automated immunohistochemical assay for estrogen receptor status in breast cancer using monoclonal antibody CC4-5 on the Ventana ES*. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 332-338.
53. 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.
54. Ordóñez N, Manning JT, Brooks TE. *Effect of trypsinisation on the immunostaining of formalin-fixed paraffin-embedded tissues*. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 121-129.
55. Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D y cols. *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.
56. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C y cols. *Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: Comparison of different methods*. *J Pathol* 1997; 183: 116-123.



57. Prenti P, Lyon H. *Commercial formalin substitutes for histopathology*. Biotech Histochem 1997; 72: 273-282.
58. Reynolds GJ. *External quality assurance and assessment in immunocytochemistry*. Histopathology 1989; 15: 627-633.
59. Reynolds GM, Young FI, Young JA y cols. *Microwave oven antigen retrieval applied to the immunostaining of cytopathology specimens*. Cytopathology 1994; 5: 345-358.
60. Riera JR, Astengo Osuna C, Longmate JA y cols. *The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma: A reevaluation after heat-induced epitope retrieval*. Am J Surg Pathol 1997; 21: 1409-1419.
61. Saccani Jotti G, Johnston SR, Salter J y cols. *Comparison of new immunohistochemical assay for oestrogen receptor in paraffin wax embedded breast carcinoma tissue with quantitative enzyme immunoassay*. J Clin Pathol 1994; 47: 900-905.
62. Shi SR, Chaiwun B, Young L y cols. *Antigen retrieval using pH 3.5 glycine-HCl buffer or urea solution for immunohistochemical localization of Ki-67*. Biotech Histochem 1994; 69: 213-215.
63. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. *Antigen retrieval immunohistochemistry: Past, present, and future*. J Histochem Cytochem 1997; 45: 327-343.
64. Shi SR, Cote RJ, Yang C y cols. *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.
65. Shi SR, Cote RJ, Young L y cols. *Use of pH 9.5 Tris-HCl buffer containing 5% urea for antigen retrieval immunohistochemistry*. Biotech Histochem 1996; 71: 190-196.
66. Shi SR, Imam SA, Young L y cols. *Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies*. J Histochem Cytochem 1995; 43: 193-201.
67. 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.
68. Shiurba RA, Spooner ET, Ishiguro K y cols. *Immunocytochemistry of formalin-fixed human brain tissues: Microwave irradiation of free-floating sections*. Brain Res Brain Res Protoc 1998; 2: 109-119.
69. Sierralta WD, Thole HH. *Retrieval of estradiol receptor in paraffin sections of resting porcine uteri by microwave treatment*. Immunostaining patterns obtained with different primary antibodies. Histochem Cell Biol 1996; 105: 357-363.
70. Sillevius Smitt PA, van der Loos C, Vianney de Jong JM y cols. *Tissue fixation methods alter the immunohistochemical demonstrability of neurofilament proteins, synaptophysin, and glial fibrillary acidic protein in human cerebellum*. Acta Histochem 1993; 95: 13-21.
71. Suthipintawong C, Leong AS, Chan KW y cols. *Immunostaining of estrogen receptor, progesterone receptor, MIB1 antigen, and c-erbB-2 oncoprotein in cytologic specimens: A simplified method with formalin fixation*. Diagn Cytopathol 1997; 17: 127-133.
72. Suurmeijer AJ. *Optimizing immunohistochemistry in diagnostic tumor pathology with antigen retrieval*. Eur J Morphol 1994; 32: 325-330.
73. Tan LK, Dowell SP, Ogden GR. *Antigen retrieval: p53 staining in benign, pre-malignant and malignant tissues of the larynx*. Clin Otolaryngol 1996; 21: 147-150.
74. Tan LK, Ogden GR. *p53 over-expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy*. Oral Oncol 1997; 33: 177-181.
75. Taylor CR, Shi SR, Chaiwun B y cols. *Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: 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.
76. Taylor CR, Shi SR, Cote RJ. *Antigen retrieval for immunohistochemistry: Status and need for greater standardization*. Appl Immunohistochem 1996; 4: 144-167.
77. Von Wasielewski R, Werner M, Nolte M y cols. *Effects of antigen retrieval by microwave heating in formalin-fixed tissue sections on a broad panel of antibodies*. Histochemistry 1994; 102: 165-172.
78. Wemer M, Von Wasielewski R, Komminoth P. *Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry*. Histochem Cell Biol 1996; 105: 253-260.
79. Wick MR. *Quality assurance in diagnostic immunohistochemistry. A discipline coming of age*. Am J Clin Pathol 1989; 92: 844.

