

Inmuno- histoquímica

José M. Mas Degano (*)
Miguel Llompart Ferrer (*)

Introducción

La Anatomía Patológica tiene como método de trabajo la observación macro y microscópica de los órganos enfermos. El patólogo realiza una valoración de la distribución, forma, y cantidad de los constituyentes, siempre en el contexto de la información clínica oportuna. Es probable que en un próximo futuro esta metodología pueda ampliarse con el análisis matemático de la imagen.

Puesto que los tejidos en estado natural son transparentes, deben ser coloreados para su observación microscópica. Las tinciones consideradas como clásicas, utilizan sustancias que actúan estableciendo enlaces físicos y químicos hacia componentes tisulares afines. En general, son poco específicas y, salvo algunas excepciones como las histoquímicas, son de poca ayuda en el amplio campo de los integrantes proteicos.

La Inmunohistoquímica es precisamente la técnica que permite la identificación selectiva de sustancias en los tejidos, localización y cuantía. Ha abierto para la Anatomía Patológica unas posibilidades equivalentes a las que en su día se abrieron con el uso de la microscopía electrónica dando lugar a la mayor revolución de la especialidad en los últimos 50 años¹. En el presente trabajo trataremos de exponer las posibilidades que la Inmunohistoquímica ofrece en la actualidad cara al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad. Los fundamentos teóricos

deben ser comprendidos y algunos condicionantes mayores conocidos por el clínico, dado que exigen su colaboración. Pasaremos por alto los aspectos puramente técnicos y aquellos experimentales que consideramos fuera del entorno socioeconómico en que nos movemos.

Historia

En 1942 Coons y colaboradores consiguen demostrar un antígeno tisular, el neumococo, con anticuerpos específicos marcados con una sustancia fluorescente². Las limitaciones técnicas impiden durante muchos años la divulgación del sistema en Anatomía Patológica, quedando en la práctica restringido al campo de la patología renal.

En 1966 Nakane y Pierce utilizan con éxito la peroxidasa de rábano como marcador enzimático³.

En 1970 Sternberger describe la técnica de PAP y se inicia una rápida progresión⁴. En 1972 Milstein y Kohler producen los primeros anticuerpos monoclonales y en 1977 Heggerens y Ash la técnica de avidina-biotina. Desde entonces el avance ha sido continuo en la mejora y estandarización de cada uno de los pasos metodológicos.

En la actualidad contamos con una población de anticuerpos en constante desarrollo, estable y de alta especificidad. La técnica, de gran potencia de demostración, está suficientemente estandarizada, con progresivos niveles de reproductibilidad y limitaciones cada día menores. Incluso se inician sistemas de cuantificación objetiva.

(*) Servicio de Anatomía Patológica. Clínica Rotger. Palma de Mallorca.

Fundamentos técnicos

La Inmunohistoquímica tiene por objeto la identificación de componentes biomoleculares presentes en los tejidos por medio de reacciones AG-Ac realizadas «in situ»⁵. Haciendo referencia exclusivamente a la Inmunohistoquímica enzimática podemos establecer tres niveles en el proceso:

A) Reacción antígeno-anticuerpo

Es la etapa crucial del sistema. En ella se establece la unión específica del antígeno, o mejor, el determinante antigénico de la molécula a identificar y el anticuerpo correspondiente.

El antígeno puede ser cualquier molécula capaz de inducir una respuesta inmunogénica, bien sola o unida a otras macromoléculas o haptenos. Dependiendo de sus características fisicoquímicas y su localización en los tejidos, los antígenos varían en solubilidad, estabilidad térmica, afinidad en reacciones, etc. Todos estos parámetros deben ser tenidos en cuenta durante los procesos de fijación y procesamiento del tejido para asegurar la integridad y accesibilidad adecuada de los determinantes antigénicos.

El otro componente de la reacción es el anticuerpo. Utilizamos los fragmentos Fab y Fab2 de las inmunoglobulinas, casi siempre IgG. Según la manera de obtenerlos distinguimos entre anticuerpos policlonales y monoclonales.

Los anticuerpos policlonales se obtienen por inmunización de un animal, casi siempre conejo, con el antígeno purificado. El resultado es una mezcla de anticuerpos específicos contra diferentes determinantes antigénicos de la molécula. La ventaja principal de su uso reside en que al ser capaces de reconocer varios epitopos distintos, es suficiente que alguno de ellos mantenga su integridad para obtener resultados favorables. Por el contrario este tipo de sueros exige complicadas técnicas de purificación para evitar la presencia de

anticuerpos naturales inespecíficos contaminantes. También pueden aparecer reacciones cruzadas frente a radicales similares presentes en el tejido.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de células de mieloma de ratón fusionadas con células B humanas o de un animal, productoras del anticuerpo deseado (hibridomas). De esta manera se consigue una población celular de crecimiento indefinido productora de un solo anticuerpo específico. Estos son de extrema pureza, afinidad y avidéz, pero su uso exige un exquisito cuidado en el tratamiento del tejido para evitar que se altere el único determinante a reconocer. De forma general son los anticuerpos más recomendables y con los que se obtienen mejores resultados.

B) Sistema de amplificación

Son sistemas de expansión de la señal obtenida, de tal forma que por cada molécula de anticuerpo fijado al antígeno tisular pueda obtenerse muchas otras de marcador, que permitan alcanzar el nivel de resolución del microscopio óptico.

Existen diferentes métodos como los de PAP, ABC, proteína A, etc., con numerosas variaciones⁶, siendo los más utilizados aquellos que emplean un anticuerpo secundario modificado de la manera adecuada. En determinadas situaciones, en las que se supone suficiente cantidad de antígeno en el tejido, puede prescindirse del sistema, como en la inmunofluorescencia directa.

Nosotros atendiendo a razones de sensibilidad, costo y estandarización utilizamos en todas nuestras técnicas el método puesto a punto por Hsu y colaboradores en 1981 basado en la Avidina-Biotina⁷. La avidina es una glicoproteína básica que tiene la característica de poseer una extraordinaria afinidad por la biotina, vitamina distribuida ampliamente en los tejidos de los mamíferos. Cada molécula de avidina puede unirse a cuatro moléculas de biotina. Además la biotina puede ser

conjugada con el fragmento Fc de las Inmunoglobulinas y la avidina con enzimas, fluorocromos, etc. Estos procesos de conjugación no afectan su afinidad mutua ni alteran significativamente la actividad de anticuerpos y enzimas.

De esta forma el sistema de expansión queda como sigue:

Sobre el anticuerpo primario unido al antígeno tisular se incuba un anticuerpo policlonal biotinizado, específico para inmunoglobulinas del animal productor del primer anticuerpo. Es de esperar que varias moléculas de este anticuerpo reconocen diferentes epitopos del primario. A continuación se incuba el sistema con complejos preformados de avidina-biotina-enzima. Estos complejos han sido preparados en exceso relativo de avidina por lo que poseen zonas libres de unión que se pueden unir a la biotina del anticuerpo secundario. El resultado es una cadena ramificada de uniones específicas en las que por cada molécula de anticuerpo primario fijado al tejido se obtienen múltiples de enzima.

C) Demostración visual. Cromógenos

En este nivel se consigue que las moléculas de enzimas ya fijadas al tejido tomen coloración y puedan ser observadas al microscopio.

La enzima más utilizada en los diferentes sistemas es la peroxidasa de rábano. También se utilizan la glucosa oxidasa y la fosfatasa alcalina, esta última cada vez con mayor asiduidad⁸. Sea cual fuere, se la hace reaccionar con un sustrato particular en presencia de cromógeno. La enzima y el sustrato forman un complejo que reacciona con el cromógeno, oxidándolo y haciéndolo insoluble, con lo que se logra su fijación estable en el tejido. De esta forma hemos conseguido cantidades suficientes de sustancia coloreada y estable en el lugar de localización del antígeno y por tanto la técnica está concluida.

Nosotros utilizamos la peroxidasa y fosfatasa alcalina y como cromógeno la diaminobencidina y el rojo rápido.

Entre las diferentes posibilidades existen razones que nos han llevado a diseñar nuestra técnica tal y como la utilizamos: Hemos escogido un sistema de reconocida sensibilidad, acoplable al esquema rutinario del laboratorio y que no requiere inversiones tecnológicas significativas para su puesta en marcha.

Se utilizan reactivos biológicos de precio elevado, con limitaciones de mantenimiento y caducidad. Consideramos por tanto imprescindible presupuestar el consumo previsto para cada uno de los anticuerpos, atendiendo al tipo de patología más frecuente en el laboratorio.

Preferimos anticuerpos monoclonales. Mantenemos algunos policlonales que nos dan mejor rendimiento sin problemas de fondo o inespecificidad.

Los de uso más frecuente los adquirimos prediluidos. Son de costo ligeramente superior pero facilitan sensiblemente el trabajo y disminuyen las posibilidades de error.

Desechamos aquellos que exigen tratamientos muy especializados fuera de la rutina del laboratorio. Tampoco utilizamos los que tienen excesivas limitaciones de caducidad o mantenimiento.

Salvo en programas concretos de estudio sólo nos proveemos de aquellos aplicables con un mínimo de frecuencia y que aporten mejoras tangibles al diagnóstico. Uno de los problemas prácticos actuales viene dado por la avalancha de anticuerpos nuevos que constantemente se comercializan. Algunos de ellos son tan selectivos que sólo se utilizan en situaciones excepcionales, mientras que otros no están suficientemente caracterizados demostrando en breve plazo una insuficiente precisión⁹. Incorporamos un sistema de amplificación universal independiente del tipo de anticuerpo primario. Simplifica el conjunto, disminuye equivocaciones y rebaja el stock de reactivos almacenados.

Estas directrices técnicas deben ir acompañadas de una indicación de uso racio-

nal. Es de responsabilidad del patólogo solicitar los anticuerpos que en el caso en cuestión tengan poder discriminante, tener en cuenta las limitaciones circunstanciales de los que desee utilizar y sobre todo saber valorar los resultados dentro del contexto en estudio. De otra forma corre el riesgo de llegar a situaciones equívocas e incluso cometer errores diagnósticos graves¹⁰. Es por esto por lo que en los servicios más cualificados del mundo se ha creado la figura de Patólogo especialista en Inmunohistoquímica, encargado de todo aquello referente a la indicación, uso e interpretación del método. En cuanto al clínico también juega un papel original. Numerosas indicaciones de la Inmunohistoquímica deben ser sugeridas por el internista ante una sospecha diagnóstica. Más aún, el clínico puede biopsiar un órgano exclusivamente para investigar la presencia de una determinada sustancia en un tejido morfológicamente no alterado. De esta forma la Inmunohistoquímica se sale del entorno exclusivo de la Anatomía Patológica, formando parte del armamentarium diagnóstico del clínico. Con todo ello la Inmunohistoquímica ha demostrado proporcionar una relación costo/rendimiento excelente.

Inmunohistoquímica en patología diagnóstica

La Inmunohistoquímica aporta a la Anatomía Patológica mayor precisión diagnóstica y añade información de interés pronóstico o terapéutico. Resulta fundamental en tres apartados:

- I. Patología tumoral.
- II. Enfermedades de patogenia inmune.
- III. Enfermedades infecciosas.

I. Patología tumoral

Es sin duda el campo de mayor desarrollo y a él nos referiremos preferentemente. Pueden valorarse diferentes aspectos:

A) Identificación celular de estirpe. Fenotipo morfofuncional.

La identificación celular precisa es básica en cualquier situación. Los diferentes tipos y subtipos celulares que constituyen el organismo vivo han sido establecidos atendiendo a las estructuras que forman y a la función que realizan, condicionadas ambas por los programas genéticos de diferenciación y especialización. Así se establecen características estructurales propias, producción de sustancias para la función o secreción, expresión de antígenos especiales, etc. Todos estos aspectos se manifiestan de forma plena en condiciones normales, estando moduladas por su estado funcional, pero pueden ser alteradas o cambiadas en estados patológicos, en particular si son neoplásicos.

El reconocimiento basado exclusivamente en estrictos criterios morfológicos puede no ser suficiente y ha quedado superado por la posibilidad de determinar componentes bioquímicos específicos según una óptica morfofuncional.

Varios grupos de anticuerpos pueden ser utilizados con este fin:

1. Péptidos estructurales:

Algunas proteínas citoplásmicas llamadas estructurales gozan de la propiedad de ser características de determinados tejidos o tipos celulares:

1a. Filamentos intermedios^{11, 12, 13, 14}:

Son proteínas del citoesqueleto con diámetros ultraestructurales entre 7 y 11 nm. Existen 5 clases.

— Citoqueratinas:

Familia de por lo menos 19 miembros diferentes. Son características de los epitelios, que las manifiestan en grupos diferentes atendiendo al tipo (simple, estratificado, complejo...), origen (piel, esófago, bronquio...) o estado actual (diferenciación, nivel hormonal o vitamínico, neoplasia...).

— Vimentina:

Presentes aunque no de manera exclusiva en células de derivación mesenquimal. Es un marcador celular primitivo de escasa diferenciación y puede ser manifestada por algunos epitelios en particular si son neoplásicos.

— Desmina:

Expresada por músculo estriado y algunas poblaciones de músculo liso.

— GFAP:

Marcador bastante específico de astrocitos oligodendroglia y ependimo. También se manifiesta en sistema nervioso periférico.

— Neurofilamentos:

Característico de neuronas o células de derivación neural. Marca los miembros del sistema neuroendocrino periférico.

1b. Otros péptidos^{15, 16}:

— EMA:

Expresada en numerosos epitelios glandulares. Marca típicamente algunos adenocarcinomas y rara vez carcinomas escamosos o sarcomas.

— TPA:

Producidos por tejidos en rápido crecimiento como placenta y neoplasias. Es positivo en los revestimientos de cavidades huecas, ductos glandulares o trofoblasto, así como numerosas neoplasias de origen epitelial.

— S-100:

Tiene un amplio espectro de distribución. Se utiliza para identificar componentes de nervio periférico, mioepitelio, anexiales, salivares y células de Langerhans.

— Actina y variantes, troponina, tubulina. Son marcadores de diferenciación muscular.

La distribución referida ha de tomarse con carácter genérico y no son raras las excepciones. La expresividad puede verse alterada por el estado funcional o las variaciones del entorno celular.

Las neoplasias pueden cambiar o combinar su expresión y en situaciones extremas presentar fenotipos ambiguos o perder por completo cualquier identificador.

No son marcadores exclusivos de neoplasia, pero utilizados en conjunto y con la estrategia adecuada se puede concluir razonablemente la estirpe de la mayor parte de las poblaciones celulares problema¹⁷.

2. Marcadores específicos tisulares¹⁸⁻²¹:
Serie de marcadores no relacionados característicos de poblaciones celulares concretas:

— Ag leucocitario común:

Manifestado por cualquier tipo de leucocito normal o activado así como por la mayor parte de sus contrapartidas neoplásicas.

— Encimas histiocitarios:

Lisozima, alfa1antitripsina, a1antiquimiotripsina CD 68.

Buenos marcadores de histiocitos reactivos o neoplasias histiocitarias bien diferenciadas. Se pierden con facilidad en procesos neoplásicos agresivos.

— Marcadores endoteliales:

Antígeno relacionado a factor VIII y UEA 1 Positivos en endotelios y sus derivados neoplásicos. El primero también se manifiesta en megacariocitos.

— Marcadores germinales y trofoblásticos: HCG, LPH, FAP, SP-1 (glicoproteína específica del embarazo).

A veces se expresan en carcinomas con o sin diferenciación morfológica a trofoblasto confirniéndoles en estos casos un peor pronóstico.

— Péptidos neuroendocrinos:

Bombesina, cromogranina, polipéptido pancreático, VIP, somatostatina, neurotesina, etc.

Se utilizan para identificar neoplasias del sistema neuroendocrino periférico o carcinomas mixtos con diferenciación parcial en esta dirección. Su presencia en estos últimos altera significativamente la respuesta al tratamiento oncológico.

— Aminas biogénicas:

Serotonina, catecolaminas.

— Antígenos neurales:

NSE, cromogranina, sinaptofisina, proteína mielínica básica.

B) Origen neoplásico primitivo. Marcadores tumorales de órgano^{22, 23, 24, 25, 26}.

En ocasiones, ante procesos neoplásicos diseminados el problema consiste en averiguar el lugar de origen de la tumoración. Junto a algunos de los AC ya reseñados pueden sernos de utilidad:

— Marcadores oncofetales:

Alfafetoproteína, CEA y ferritina.

Son antígenos tumorales ampliamente utilizados en la clínica, también adecuados para delimitar el origen histogenético de

algunas familias tumorales. La ferritina puede manifestarse en tumores de la línea hematopoyética y algunos carcinomas (hígado, páncreas, mama) aunque también en situaciones no neoplásicas (cirrosis).

— Marcadores tumorales monoclonales: Algunas neoplasias como mama, colon, ovario, páncreas o melanomas pueden expresar con mayor o menor especificidad Ag característicos. No sólo sirven para identificar su origen sino que en ocasiones se relacionan a su agresividad biológica.

— Proteínas placentarias:

Positivas en algunos tumores de línea germinal.

— PSA. Fosfatasa ácida prostática.

Se expresan en neoplasias del epitelio prostático.

C) Subclasificación tumoral funcional^{27, 28}.

La posibilidad de identificar diferentes estadios funcionales celulares ha permitido establecer subclasificaciones tumorales morfofuncionales más acordes con la biología tumoral. Dos ejemplos son las neoplasias endocrinas y los linfomas.

— Marcadores hematopoyéticos:

Marcadores de superficie celular.

Agrupados actualmente en 45 grupos CD (cluster designation) definen células linfocitarias (CD 45), linfocitos T (CD2 CD8), linfocitos B (CD19), monocitos macrófagos (CD11 CD13 CD33) o células NK (CD16), así como sus variantes y estadios funcionales.

Otros son sólo manifestados en situaciones neoplásicas (CD 10). Diferentes grupos de antígenos definen cada uno de los pasos de la diferenciación linfoide y dentro de ciertos límites sus contrapartidas neoplásicas. Estas últimas pueden manifestar característicamente fenotipos aberrantes.

— Hormonas:

Permiten catalogar y cuantificar células según el tipo de hormona que fabrican, así como su estado funcional. También nos ayudan a identificar la presencia de secreciones ectópicas en procesos neoplásicos. Hipofisarias: GH, TSH, ACTH, LH, Prolactina.

Tiroideas: Tiroglobulina, calcitonina.

Paratiroides: PTH.

Esteroides: Testosterona, estradiol, progesterona.

D) Infiltración estromal. Embolización neoplásica²⁹.

El que una neoplasia adquiera la capacidad de infiltrar el estroma o sea capaz de embolizar vasos es interpretado como una situación biológica cualitativamente distinta, por lo que es conveniente una demostración fuera de duda. La identificación exacta de la membrana basal o el límite vascular con Ac específicos resuelve las situaciones dudosas que frecuentemente se presentan con la morfología.

— Membrana basal: Colágeno IV, Lamina.

— Endotelio vascular: Ag relacionado a F-VIII.

E) Factores pronóstico. Sensibilidad al tratamiento^{30, 31, 32}.

En la actualidad numerosos esfuerzos están encaminados a identificar parámetros que nos permitan establecer con mayor certeza el comportamiento neoplásico y su respuesta al tratamiento.

Entre el amplio número existente y relacionados a aspectos muy diferentes de la biología tumoral se encuentran los siguientes:

— Receptores Hormonales: De estrógenos y progesterona.

— Factores de proliferación celular: PCNA, P-105, Ki 67.

— Proteínas oncogénicas: C-erbB-2.

— Expresividad de grupos sanguíneos: sistema ABH.

— Heat shock protein.

— Factor de crecimiento epidérmico, transformante, nervioso, etc.

— Respuesta al tratamiento. C-219.

— Oncogenes: c-myc, c-ras, p21-ras, etc. Demostrables por técnicas de hibridación «in situ».

Todos ellos son marcadores tumorales relacionados a las diferentes facetas evolutivas de la célula transformada, desde alteraciones del DNA hasta anomalías de la matriz extracelular, pasando por núcleo, citoplasma y membrana. Otros se refieren

a aspectos de replicación y metástasis. Nos informan de importantes cualidades intrínsecas de las neoplasias, que escapan al puro aspecto morfológico.

II. Enfermedades de patogenia inmune^{33, 35}

Es el campo clásico de aplicación de las técnicas de Inmunoquímica, realizadas en este caso con Ac fluorescentes, y facilitadas hoy día con el uso de enzimas.

En patología glomerular y cutánea resultan imprescindibles para el diagnóstico diferencial de numerosas entidades y en el primer caso son, junto con la morfología, la base de su clasificación.

Los Ac utilizados suelen ser aquellos que identifican las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, fibrinógeno y los factores iniciales del complemento.

El análisis de las poblaciones linfocitarias presentes son útiles en el seguimiento de trasplantes, patología pulmonar, tiroidea y patología osteoarticular.

III. Enfermedades infecciosas³⁴

La dificultad de identificar los agentes biológicos presentes en los tejidos ha sido uno de los focos de frustración de los patólogos. La escasa especificidad y resolución de nuestras técnicas impedía obtener un mínimo de rentabilidad.

La utilización de Ac específicos ha cambiado el panorama sobre todo en lo que se refiere a enfermedades virales, bien mediante la identificación de AGs de la cápsida o secuencias de DNA.

Ac de uso corriente son los dirigidos a Adenovirus, Citomegalovirus, Herpes simple (I y II), Hepatitis B (core y superficie), HPV, etc.

Otros utilizados son Toxoplasma, Pneumocistis, Chlamydia, etc.

Sólo hemos expuesto los aspectos prácticos más comunes en la actualidad.

Las esperanzas están puestas en la identificación de marcadores tumorales que nos permitan detectar las lesiones previas al desarrollo de neoplasias, así como criterios de diagnóstico, pronóstico y sensibilidad a los tratamientos. La Patología por tanto está en los albores de una nueva era en la cual mayor mejor información podrá ser obtenida de una misma biopsia. A medida que los eventos moleculares que conlleva la carcinogénesis y las características que definen lesiones de alto riesgo sean identificadas, la IHQ jugará un papel cada vez más trascendente en la decisión clínica.

Bibliografía

1. Mukay K, Rosai J. Applications of immunoperoxidase techniques in surgical pathology. In Wolff M, Fenoglio CM (eds): Progress in surgical pathology, Masson Publishing USA Inc. New York. 1980; 1: 15-99.
2. Coons AH. The beginnings of immunofluorescence. *J. Immunol.* 1961; 87: 499-503.
3. Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigen. *J. Histochem. Cytochem.* 1966; 14: 929-931.
4. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method for immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in the identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 1970; 18: 315-333.
5. Sheibani K, Tubbs RR. Enzyme immunohistochemistry. Technical aspects. *Semin. Diagn. Pathol.* 1984; 1: 235-250.
6. Notani GW, Parsons JA, Erlandsen SL. Versatility of staphylococcus aureus protein A in immunocytochemistry. Use in unlabeled antibody enzyme system and fluorescent methods. *J. Histochem. Cytochem.* 1979; 27: 1438-1444.
7. Hsu SM, Ree HJ. Self sandwich method. An improved immunoperoxidase technique for the detection of small amount of antigen. *Am. J. Clin. Pathol.* 1980; 74: 32-40.
8. Cardell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, McDonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) complexes. *J. Histochem. Cytochem.* 1984; 32: 219-229.
9. Gatlif KC, Mason DY. The use of monoclonal antibodies for histopathological diagnosis of human malignancy. *Semin. Oncol.* 1982; 9: 517-525.

10. Lewis RE, Johnson WW, Cruse JM. Pitfalls and caveats in the methodology for immunoperoxidase staining in surgical pathologic diagnosis. *Surv. Synth. Pathol. Res.* 1983; 1: 134-152.
11. Osborn M, Weber K. Tumor diagnosis by intermediate filament typing. A novel tool for surgical pathology. *Lab. Invest.* 1983; 48: 372-394.
12. Cooper D, Schermer A, Sun T-T. Classification of human epithelia and their neoplasm using monoclonal antibodies to keratin: Strategies, applications, and limitations. *Lab. Invest.* 1985; 52: 243-256.
13. Gould VE. The coexpression of distinct classes of intermediate filaments in human neoplasms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1985; 109: 984-985.
14. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filaments proteins. III. Analysis of tumor. *Am. J. Clin. Pathol.* 1985; 84: 413-424.
15. Thomas P, Battifora H. Keratins versus epithelial membrane antigen in tumor diagnosis. An immunohistochemical comparison of five monoclonal antibodies. *Hum. Pathol.* 1987; 18: 728-734.
16. Drier JK, Swanson PE, Chervitz DL, Wick MR. S 100 protein immunoreactivity in poorly differentiated carcinomas. Immunohistochemical comparison with malignant melanoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1987; 111: 447-452.
17. DeLellis RA, Dayal Y. The role of immunocytochemistry in the diagnosis of poorly differentiated malignant neoplasms. *Semin. Oncol.* 1987; 14: 173-192.
18. Miettinen M. Synaptophysin and neurofilaments proteins as markers for neuroendocrine tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1987; 111: 813-818.
19. Kurtin PJ, Pinkus GS. Leukocyte common antigen. A diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies. Correlation with immunologic studies and ultrastructural localizations. *Hum. Pathol.* 1985; 16: 353-365.
20. Ordóñez NG, Batsakis JG. Comparison of Ulex Europaeus I lectina and factor VIII related antigen in vascular lesions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1984; 108: 129-132.
21. Heitz PU, von Herbay G, Koppel G, Komminoth P, Kasper M, Hofler H, Muller KM, Oberholzer M. The expression of subunits of human chorionic gonadotropin (hCG) by nontrophoblastic, nonendocrine, and endocrine tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 1987; 88: 467-472.
22. Kurman RJ, Ganjei P, Nadji M. Contributions of immunocytochemistry to the diagnosis and study of ovarian neoplasms. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1984; 3: 3-26.
23. Ballesta AM. Marcadores tumorales: Definición, clasificación y utilidad clínica. *Rev. Reial. Acad. Barcelona* 1986; 1: 3-10.
24. Nadji M, Tabei SZ, Castro A, Chu TM, Murphy GP, Wang MC, Morales AR. Prostatic-specific antigen. An immunohistologic marker for prostatic neoplasms. *Cancer* 1984; 48: 1229-1232.
25. Mazoujian G, Pinkus GS, Davis S, Haagensen DE Jr. Immunohistochemistry of a gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) of the breast. A marker of apocrine epithelium and breast carcinomas. *Am. J. Pathol.* 1983; 110: 105-112.
26. Wick MR, Swanson PE, Rocamora. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumor. *J. Cutan. Pathol.* 1988; 15: 201-207.
27. Deegan MJ. Membrane antigen analysis in the diagnosis of lymphoid leukemias and lymphomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1989; 113: 606-618.
28. Solcia E, Capella C, Buffa R, Usellini L, Fiocca R, Sessa F, Tortora O. The contribution of immunocytochemistry to the diagnosis of neuroendocrine tumors. *Semin. Diagn. Pathol.* 1984; 1: 285-296.
29. Foellmer HG, Madri JA, Furthmayr H. Monoclonal antibodies to type IV collagen. Probes for the study of structure and function of basement membranes. *Lab. Invest.* 1983; 48: 639-649.
30. Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1987; 111: 841-845.
31. Tsuda H. Correlation between Histologic Grade of Malignancy and Copy Number of C-erbB-2 Gene in Breast Carcinoma. A Retrospective Analysis of 176 cases. *Cancer* 1990; 65: 1794-1800.
32. Sirvent JJ, Calvadó MT. Receptores de estrógenos en cáncer de mama. Estudio inmunohistoquímico en material congelado e incluido en parafina. *Clin. Invest. Gin. Obs.* 1990; 17: 181-186.
33. Burg G, Kandewitz P, Eckert F. Immunohistochemie. Diagnostik in der dermatologie. *Hantarzt* 1987; (suppl) 38: 69-75.
34. Kovacs JA, Ng VL, Masur H, Leoung G, Hadley WK, Evans G, Lane HC, Ognibene FP, Shelhamer J, Parrillo JE, Gill VJ. Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia. Improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N. Engl. J. Med.* 1988; 318: 589-593.
35. Bishop GA, Hall BM, Duggin GG, Horvath JS, Sheil AG, Tiller DJ. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Int.* 1986; 29: 708-717.