

Estudo do efeito de distintos períodos de fixação em formalina e métodos de recuperação antigênica na técnica de imuno-histoquímica

Primeira submissão em 04/03/04
Última submissão em 14/07/04
Aceito para publicação em 19/10/04
Publicado em 20/02/05

Study of the effect of different fixation times in formalin and methods of antigen retrieval in immunohistochemistry

Maria Teresa de Seixas Alves¹; Leonor Cristina Manoja Roman²

unitermos	resumo
Imuno-histoquímica	<p>Avaliou-se a influência do tempo de fixação em formalina neutra tamponada a 10% e dos diferentes métodos de resgate de sítio antigênico induzido pelo calor [<i>heat induced epitope retrieval</i> (HIER)] para a imunoposição dos anticorpos anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e anti-AE1/AE3 (citoqueratinas), empregados por apresentarem imunocoloração nuclear e citoplasmática ou submembranosa. Foram estudadas cinco tonsilas provenientes de amigdalectomias realizadas no Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina da Universidade de São Paulo (UNIFESP/EPM), as quais foram seccionadas em 0,5cm² cada, fixadas em formalina, por períodos de tempo de seis, 12, 18, 24 e 48 horas e embebidas em parafina. Foram feitos cortes com 4µm em lâminas silanizadas. Para o estudo imuno-histoquímico utilizamos os anticorpos anti-PCNA e AE1/AE3, empregando os três métodos de resgate de sítio antigênico: banho-maria, microondas e panela de pressão. A positividade na imunoposição do PCNA foi avaliada através da relação núcleos corados/total de núcleos x 100. A intensidade da coloração resultante foi avaliada através da utilização dos programas Corel Photo Paint 9 e UT Morph 2.0. Com relação à recuperação antigênica, concluímos que, para o anticorpo anti-PCNA no material fixado nos períodos de nosso estudo, os melhores resultados foram obtidos com o uso do microondas. O aumento do tempo de fixação interferiu na queda da imunopositividade do PCNA, em especial após o período de 24 horas. Em relação ao parâmetro intensidade de coloração para AE1/AE3 nenhum dos métodos foi superior. A metodologia estudada para a análise semiquantitativa na intensidade da reação coincidiu com os resultados obtidos na avaliação criteriosa de cada uma das lâminas.</p>
Recuperação antigênica	
Métodos de fixação	

abstract

The effects of fixation time in buffered formaline at 10% on different methods of antigenic site retrieval induced by heat (HIER) for the detection of the expression of antibodies anti-PCNA (nuclear proliferation antigen) and anti-AE1 and AE3 (cytokeratins) were studied. Specimens with cross section of 0,5 cm² from five Tonsils from elective tonsillectomies done at Hospital São Paulo UNIFESP/EPM were fixed for six, 12, 18, 24 and 48 hours and embedded in paraffin for the production of 4µm sections. For HIER was used a steamer, microwave oven and pressure cooker. The level of PCNA expression was assessed by the ratio stained nuclei: total number of nuclei. The staining intensity was assessed by using Corel Photo Paint 9 and UT Morph 2.0 softwares. The present study has shown that: 1) for the detection of anti-PCNA, the use of a microwave oven provided the best results; 2) for the detection of anti-PCNA, longer fixation periods, specially after 24 hours, causes the staining intensity to decrease; 3) for the detection of AE1 and AE3, all procedures used provided equivalent levels of staining.

key words
Imunohistochemistry
Antigen retrieval
Fixation methods

1. Médica patologista; docente do Departamento de Patologia e doutora em Patologia/Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP), Brasil.

2. Bióloga do Departamento de Patologia; mestre em Patologia pela EPM/UNIFESP, Brasil.

Tese apresentada à EPM/UNIFESP em 30 de junho de 2003 para obtenção do título de Mestre.

Introdução

A primeira reação de imuno-histoquímica foi realizada há cerca de meio século⁽²⁾, quando foi introduzida a técnica de marcação de anticorpos com produtos fluorescentes, tais como o isocianato de fluoresceína, para a detecção de antígenos teciduais.

A seguir, Nakane e Pierce⁽¹⁶⁾ substituem o isocianato de fluoresceína pela enzima peroxidase. Com o desenvolvimento da técnica peroxidase antiperoxidase⁽²³⁾, associada ao método de hibridoma de anticorpo monoclonal⁽¹¹⁾, houve um grande avanço na área.

Na década de 1980, há um importante incremento no uso da imuno-histoquímica para diagnóstico, em função principalmente do desenvolvimento dos métodos avidina-biotina-peroxidase (ABC) e resgate do sítio antigênico por indução de calor (conhecido como HIER). Esta técnica foi pioneiramente desenvolvida por Shi *et al.*⁽²⁰⁾, envolvendo o aquecimento de seções de tecidos em solução tampão de resgate de sítio antigênico⁽²¹⁾, em que, através de irradiação de lâminas em forno de microondas imersas em solução de tiocianato de chumbo, foram obtidos excelentes resultados no resgate de sítio de antígenos, para tecidos fixados e embebidos em parafina.

Por causa da toxicidade da última solução, inúmeros outros tampões foram pesquisados, obtendo-se excelentes resultados e sendo hoje amplamente utilizados em imuno-histoquímica.

O mecanismo de ação de HIER não é completamente conhecido, seguramente promove uma quebra do *cross-link*, revertendo a conformação das trocas moleculares na molécula de proteína estabelecidas pelo formol.

Mais recentemente, Shi *et al.*^(15, 22) investigaram muitos aspectos de HIER e concluíram que o resgate do sítio antigênico está associado à temperatura e ao tempo de aquecimento na solução tampão. O pH da solução é também um importante fator de referência no resgate do sítio antigênico. Sabe-se que alguns anticorpos respondem melhor quando recuperados em pH mais básico.

Atualmente, as diferentes metodologias de aplicação do calor (HIER) utilizadas variam desde o uso de microondas até painéis de pressão, autoclaves, banho-maria e outros.

A Imuno-histoquímica é uma técnica essencialmente qualitativa, embora aplicações quantitativas possam ser realizadas para determinar a intensidade em que o antígeno se encontra presente na amostra. Seu objetivo básico é a localização topográfica deste na célula ou no tecido.

Análises quantitativas de imunocoloração em seções de tecidos podem ser representadas por produto ou soma da intensidade de coloração e porcentagem da positividade em células e estruturas. Esses dois valores podem ser empregados em variadas fórmulas matemáticas como método de análise quantitativa⁽¹⁴⁾.

A análise da imagem permite a mensuração da intensidade de coloração do método imuno-histoquímico, como o reflexo da concentração do antígeno no tecido.

O grande problema encontrado na tentativa de quantificar a imunoexpressão é representado pelas imprevisíveis alterações na preservação dos espécimes.

Metodologia

O estudo constou da análise de cinco tonsilas inteiras, provenientes de amigdalectomias realizadas no Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP), no período de janeiro a julho de 2002. Após o exame macroscópico, os espécimes foram seccionados em 0,5cm² cada e fixados aos pares em formalina neutra tamponada a 10%, por períodos de tempo de seis, 12, 18, 24 e 48 horas. Em seguida, foram embebidos em parafina, dando origem a um total de 25 blocos. Destes, foram confeccionados cortes histológicos com espessura de 4µm em lâminas silanizadas.

As lâminas foram coradas pelo método imuno-histoquímico para os anticorpos monoclonais anti-PCNA (clone PC10, M0879, DAKO Corporation, USA, 1/6000) e anti-AE1AE3 (M3515, DAKO Corporation, USA, 1/200). O método de revelação utilizado foi o LSAB/HRP (K0490, DAKO Corporation, USA, pré-diluído), marcado com a enzima peroxidase.

As lâminas foram lidas com o auxílio de sistema digital de imagem, que consistiu de um microscópio Olympus BX51 com objetivas plan-acromáticas, acoplado a uma câmara da marca Oly 200 e um microcomputador Pentium com 128mB de memória RAM, com placa digitalizadora de imagens, contendo os *softwares* Corel Photo Paint 9 e UT Morph versão 2.0 da Universidade do Texas, ambos trabalhando em ambiente Windows.

Para a análise do PCNA foram avaliados dois centros germinativos por lâmina e considerados positivos os núcleos que exibissem algum grau de colorido castanho. A avaliação porcentual da positividade foi feita através da relação núcleos corados/total de núcleos x100.

Para os dois antígenos pesquisados, a intensidade de coloração foi avaliada, importando-se as imagens digitalizadas para o programa Corel Photo Paint 9, em que foram selecionados e protegidos os tons em castanho através de máscaras. O restante da imagem foi apagada com o uso da ferramenta *borracha*. As ilustrações estão nas **Figuras 1 e 2**.

As imagens resultantes desse processo foram importadas para o programa UT Morph 2.0, sendo realizada a leitura da intensidade da densidade óptica em pixels, que variaram de 0 a 255. Para as lâminas que apresentaram menores intensidades de coloração foram obtidos resultados mais próximos de 255.

O método estatístico empregado foi o de análise de variância ANOVA e, para se determinar os pares do grupo onde havia diferenças significativas, aplicamos o método de Bonferroni.

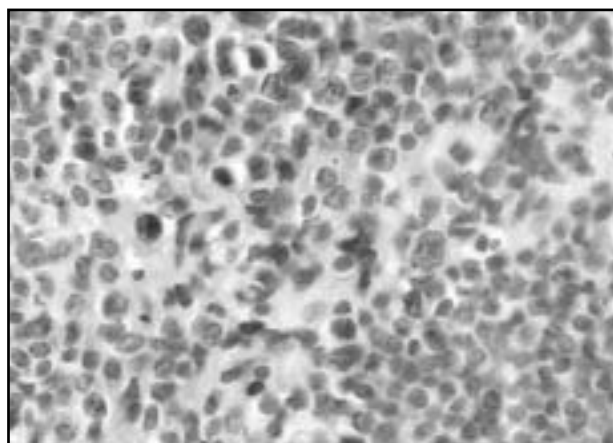


Figura 1 – Fotomicrografia de amígdala humana normal (400X), digitalizada em computador, com 24 horas de fixação em formalina e resgate em microondas. A coloração em castanho é resultante de imunocoloração para o anticorpo anti-PCNA

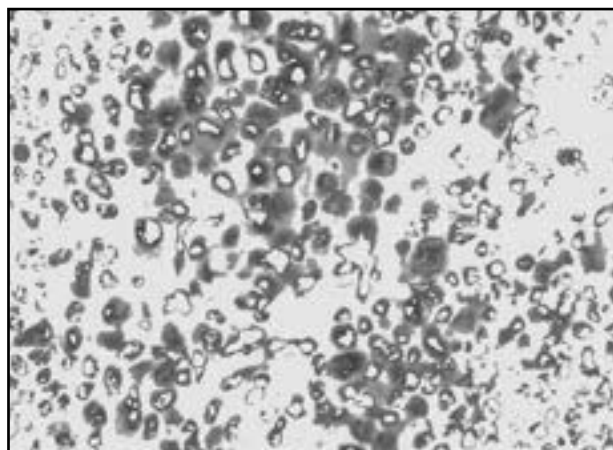


Figura 2 – A mesma amígdala anterior, após ter sido trabalhada pelo programa Corel, onde o colorido que não apresentava qualquer tom em castanho foi eliminado através da ferramenta *borracha*

Resultados

Podemos concluir que, pela análise conjunta dos cinco grupos para o PCNA, em relação à intensidade de coloração, os melhores resultados foram obtidos com uso de microondas.

Podemos concluir que o método de resgate é indiferente, quando analisamos a intensidade de coloração do AE1AE3 em relação ao tempo de fixação. Isso confirma os resultados obtidos na análise por grupos, realizada anteriormente.

Ao observarmos tais resultados, concluímos que o tempo de fixação é altamente significativo na positividade para o PCNA, havendo queda na imunopositividade em períodos superiores a 24h de fixação. Além disso, observamos que o método de recuperação para reverter esses efeitos sobre a positividade é indiferente.

Discussão

O objetivo principal de nosso estudo consistiu na avaliação das diferentes respostas obtidas na intensidade da imunocoloração, em função das variáveis tempo de fixação e método de recuperação antigênica. Para tanto, empregamos dois antígenos largamente utilizados em nosso laboratório, sendo um de expressão nuclear (anti-PCNA) e outro citoplasmático ou submembranoso (anti-AE1AE3).

Alguns estudos apontam melhores resultados no resgate do sítio antigênico através do uso de tampão citrato de sódio pH 6 para antígenos de expressão citoplasmática^(6,25,27), e tampão glicina EDTA pH 3,6 para os de expressão nuclear⁽¹⁰⁾.

Em nosso trabalho, optamos pelo emprego do tampão citrato de sódio pH 6 para ambos os anticorpos, por ser eficaz no resgate de um grande painel de antígenos.

Distintas metodologias de resgate de sítio antigênico em espécimes fixados em formalina e embebidos em parafina têm sido avaliadas ao longo do tempo, seja através do emprego de pré-digestão enzimática (uso de enzimas proteolíticas), microondas^(12, 28), panela de pressão⁽¹⁸⁾, banho-maria e outros.

Assim como nos diversos estudos que apontaram melhora significativa na imunocoloração com o uso do microondas em material fixado em formalina e embebido em parafina para grande número de anticorpos^(1, 4, 19), obtivemos de igual modo resultados bastante satisfatórios com a utilização do mesmo em ambos os anticorpos estudados.

Avaliamos em nosso trabalho o anticorpo anti-PCNA (clone PC10) em material fixado em formalina e embebido

Tabela 1 Intensidade de coloração para o PCNA segundo tempo de fixação e método de resgate

Método de resgate		Tempo de fixação					Total
		6 horas	12 horas	18 horas	24 horas	48 horas	
Microondas	N	10	10	10	10	10	50
	Média	146,93	134,39	149,6	142,69	137,58	142,24
	Desvio-padrão	36,04	10,96	8,89	11,28	18,11	19,78
	Mínimo	82,84	122,41	135,92	122,91	107,13	82,84
	Máximo	199,98	159,54	161,6	155,79	159,93	199,98
Panela de pressão	N	10	10	10	10	10	50
	Média	153,1	163,91	174,15	156,53	160,6	161,55
	Desvio-padrão	22,79	21,74	19,51	15,27	22,5	21,01
	Mínimo	124,05	144,76	132,83	140,81	133,34	124,05
	Máximo	182,87	200,66	205,61	181,4	190,88	205,61
Banho-maria	N	10	10	10	10	10	50
	Média	148,75	152,59	146,6	155,88	166,3	154,02
	Desvio-padrão	16,33	11,7	10,63	15,38	24,32	17,2
	Mínimo	124,72	140,34	132,22	128,67	139,16	124,72
	Máximo	163,94	175,93	163,49	175,11	197,51	197,51
Total	N	40	40	40	40	40	200
	Média	145,94	143,39	153,46	148,15	149,94	148,18
	Desvio-padrão	23,52	20,84	17,94	17,88	23,88	21,04
	Mínimo	82,84	114,89	132,22	100,51	107,13	82,84
	Máximo	199,98	200,66	205,61	181,4	197,51	205,61

Tabela 2 Resultado das comparações múltiplas para o método de resgate

Comparação	Método de Bonferroni p (valor)
Microondas x p. pressão	< 0,001*
Microondas x banho-maria	0,007*
P. pressão x banho-maria	0,224

*Estatisticamente significante.

em parafina, com resultados bastante satisfatórios, conforme observado por alguns autores^(7, 9).

De maneira análoga aos achados da literatura, em que alguns trabalhos relatam queda de imunopositividade para o anticorpo anti-PCNA com aumento do tempo de

fixação^(8, 13), observamos em nosso material a queda no percentual de núcleos corados no período de tempo de 24 horas de fixação.

Sistemas de análise de imagem para avaliação quantitativa vêm sendo pesquisados ao longo do tempo^(17, 27), na tentativa de eliminar a subjetividade do sistema semiquantitativo através de *cruzes* na avaliação da intensidade de imunoe expressão, utilizada hoje por patologistas^(3, 8, 26).

Optamos pela utilização de sistema de análise de imagem para quantificar a imunoe expressão, com base no sistema de quantificação aplicado por Engelman⁽⁵⁾ na avaliação do glicogênio hepático.

Assim, concluímos que o método de quantificação empregado mostrou-se de fácil aplicabilidade e reprodutibilidade, com resultados coincidentes com a impressão subjetiva das lâminas pelos pesquisadores.

Tabela 3 Intensidade de coloração para o AE1/AE3 segundo tempo de fixação e método de resgate

Método de resgate		Tempo de fixação					Total
		6 horas	12 horas	18 horas	24 horas	48 horas	
Microondas	N	10	10	10	10	10	50
	Média	148,74	135,58	140,16	152,96	158,66	147,22
	Desvio-padrão	17,33	21,93	22,16	16,30	19,96	20,67
	Mínimo	119,19	91,76	104,27	137,21	132,91	91,76
	Máximo	160,49	169,76	190,42	185,41	190,42	199,98
Panela de pressão	N	10	10	10	10	10	50
	Média	158	166,22	155,19	141,91	159,38	156,14
	Desvio-padrão	29,91	12,6	17,41	25,55	17,9	22,2
	Mínimo	126,34	146,91	124,76	92,79	129,37	92,79
	Máximo	197,54	194,25	176,72	165,64	186,26	197,54
Banho-maria	N	10	10	10	10	10	50
	Média	142,79	152,11	157,4	153,28	152,44	151,6
	Desvio-padrão	27,49	12,34	21,85	21,47	24,77	21,8
	Mínimo	90,38	133,18	118,56	133,09	109	90,38
	Máximo	166,47	173,03	191,06	202,48	198,94	202,48
Total	N	40	40	40	40	40	200
	Média	148,4	153,55	152,14	148,91	155,05	151,61
	Desvio-padrão	23,91	18,96	20,38	21,62	24,09	21,82
	Mínimo	90,38	91,76	104,27	92,79	84,64	84,64
	Máximo	197,54	194,25	191,06	202,48	198,94	202,48

Tabela 4 Resultado das comparações múltiplas para o tempo de fixação

Comparação (horas)	Método de Bonferroni p (valor)
6 x 12	> 0,999
6 x 18	> 0,999
6 x 24	< 0,001*
6 x 48	0,403
12 x 18	> 0,999
12 x 24	< 0,001*
12 x 48	0,709
18 x 24	< 0,001*
18 x 48	> 0,999
24 x 48	0,032*

*Estatisticamente significante.

Tabela 5 Positividade segundo tempo de fixação e método de resgate

Método de resgate		Tempo de fixação					Total
		6 horas	12 horas	18 horas	24 horas	48 horas	
Microondas	N	10	10	10	10	10	50
	Média	64,53	63,93	58	53,82	64,48	60,95
	Desvio-padrão	14,9	5,82	15,45	18,62	16,7	15
	Mínimo	38	52,17	35,06	28,25	28,57	28,25
	Máximo	90,2	72,25	82,61	78,33	86,27	90,2
Panela de pressão	N	10	10	10	10	10	50
	Média	66,76	65,71	61,96	49,7	66,94	62,21
	Desvio-padrão	5,9	12,32	9,85	14,31	11,95	12,62
	Mínimo	61,09	44,22	45,54	31,67	45,71	31,67
	Máximo	79,62	82,58	74,55	71,71	82,61	82,61
Banho-maria	N	10	10	10	10	10	50
	Média	59,84	58,01	55,15	46,76	40,42	52,04
	Desvio-padrão	17,46	12,31	20,12	14,75	18,18	17,71
	Mínimo	22,53	31,84	25,87	23,73	19,62	19,62
	Máximo	78,19	75,38	88,83	67,92	68,25	88,83
Total	N	40	40	40	40	40	200
	Média	66,08	65,24	63,64	49	59,1	60,61
	Desvio-padrão	13,86	11,17	16,41	19,72	18,84	17,33
	Mínimo	22,53	31,84	25,87	0,53	19,62	0,53
	Máximo	90,2	85,1	88,83	87,14	86,77	90,2

Tabela 6 Resultado das comparações múltiplas para o método de resgate

Comparação	Método de Bonferroni p (valor)
Microondas x p. pressão	0,999
Microondas x banho-maria	0,022*
P. pressão x banho-maria	0,006*

*Estatisticamente significativa.

Referências

- CHEW et al. Microwave enhanced immunohistochemical staining of a formalin sensitive antigen laminin receptor. *Anticancer Res*, v. 16, n. 1, p. 353-7, 1996.
- COONS, A. H. et al. Immunological properties of antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the Society of Experimental Biology*, v. 47, p. 200, 1941.
- COSTA, M. Z. O. *Histogênese da doença renal cística adquirida. Estudo imuno-histoquímico*. 2003. Tese (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- CUEVAS et al. Microwave antigen retrieval in immunohistochemistry: a study of 80 antibodies. *Journal Clin Pathol*, v. 47, n. 5, p. 448-52, 1994.

5. ENGELMAN, M. F. B. et al. Estudo morfológico do fígado de ratos submetidos a doses supra fisiológicas de tiroxina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 4, n. 2, 2001.
6. FROST, A. R. et al. Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry. *Applied Immunohistochem Mol Morphol*, v. 8, n. 3, p. 336-43, 2000.
7. GELB, A. et al. Estimation of tumor growth fractions in archival formalin fixed paraffin embedded tissues using two anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies. *Am J Pathol*, v. 141, p. 1453-8, 1992.
8. HAERSLEV, T. et al. Microwave processing for immunohistochemical demonstration of proliferating nuclear antigen (PCNA) in formalin fixed and paraffin embedded tissue. *APMIS*, v. 25, n. 10, p. 1107-9, 1988.
9. HALL et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *Journal of Pathology*, n. 162, p. 285-94, 1990.
10. IMAN, A. S. et al. Comparison of two microwave based antigen retrieval solutions unmasking epitopes in formalin fixed tissue for immunostaining. *Anticancer Res*, v. 15, n. 4, p. 1153-8, 1995.
11. KOHLER, G. et al. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined origin. *Nature*, v. 25, p. 495-7, 1975.
12. KWASPEN et al. Periodic acidic as nonenzymatic enhancement technique for the detection of cytokeratin immunoreactivity in routinely processed carcinomas. *Applied Immunohistochemistry*, v. 3, n. 1, p. 54-63, 1995.
13. LEONG; ANTHONY, S. Y. *Applied immunohistochemistry for the surgical pathologist*. Boston: Edward Arnold, 1993. p. 18.
14. MC CARTY, K. S. Jr. et al. O estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 109, p. 716-21, 1985.
15. MILLER, R. T. et al. Fixation and epitope retrieval in diagnostic immunohistochemistry: a concise review with practical considerations. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v. 8, n. 3, p. 228-35, 2000.
16. NAKANE, P. K. et al. Enzyme labelled antibodies: a preparation for the localization of antigen. *Journal of Immunohistochemistry and Cytochemistry*, v. 14, p. 929-31, 1966.
17. Papolla, M. R. Computadorized image analyses microspectroscopy of tissue sections. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 112, p. 787-90, 1988.
18. PORTIANSKLY, E. L. et al. Kinetics of epitope retrieval techniques for unmasking citokeratins in bovine prostatic tissues after different formaldehyde fixation times. *Applied Immunohistochemistry*, v. 5, n. 3, p. 194-201, 1997.
19. SARNAT, H. B. et al. Synaptophysin immunocytochemistry with thermal intensification: A marker of terminal axonal maturation in the human fetal nervous system. *Brain Dev*, v. 21, n. 1, p. 41-50, 1999.
20. SHI, S. R. et al. Antigen retrieval in formalin fixed, paraffin embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, v. 39, p. 741-8, 1991.
21. SHI, S. R. et al. Antigen retrieval technique: a novel approach to immunohistochemistry on routinely processed tissue sections. *Cell Vision*, v. 2, p. 7-22, 1995.
22. SHI, S. R. et al. Standardization of immunohistochemistry based on antigen retrieval technique for routine formalin fixed tissue sections. *Appl Immunohistochem*, v. 6, p. 89-96, 1998.
23. STERBERG, L. A. et al. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen complex (horse radish peroxidase-anti-peroxidase) and its use in the identification of spirochets. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 30, p. 315, 1970.
24. SUURMAJER, A. J. H. et al. Pretreatment in high pressure microwave processor for MIB 1 immunohistaining of cytological smear and paraffin tissue sections to visualize the various phases of the mitotic cycle. *The Journal of Histochemistry*, v. 47, n. 8, p. 1015-20, 1999.
25. Taylor, C. R. et al. 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 Ki67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Coment in Human Pathol*, v. 25, n. 10, p. 1107-91, 1994.
26. THEREZO, A. L. S. et al. Histogenesis of the cysts in the autosomal dominant. Polycystic kidney disease: an immunohistochemical study. *Applied Immunohistochem*, v. 6, p. 219-33, 1998.
27. TOGNINI, F. J. R. *Estudo biomecânico da cicatrização da parede abdominal de ratos sob a ação de Meloxicam*. 1999. Tese (doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
28. VON WASIELEWISKI, R. et al. Effects of antigen retrieval by microwave heating in formalin fixed tissue sections on a broad panel antibodies. *Histochemistry*, v. 2, n. 3, p. 165-72, 1994.

Endereço para correspondência

Leonor Cristina Manója Roman
Rua Cardoso de Almeida 1.257/53 - Perdizes
CEP 05013-001 - São Paulo-SP
e-mail: avmmartinez@aol.com