

INMUNOCITOQUIMICA EN LA PRACTICA DERMATOLOGICA

*Dra. Rita Pichardo**
*Dra. Margarita Oliver**
*Dr. Oscar Reyes J.**
*Dr. Oscar Reyes F.**
*Dr. Félix J. Tapia***

Pichardo R, Oliver M, Reyes O. J, Reyes O. Tapia F. J. **Inmunocitoquímica en la práctica dermatológica.** Derm Venez 1996; 34: 133-138

RESUMEN:

En dermatología, los procedimientos inmunocitoquímicos han permitido avances en la caracterización de la individualidad biológica, la cual incluye células tumorales de diferentes orígenes, agentes infecciosos, células inmunocompetentes, etc. El desarrollo de mejores sondas inmunocitoquímicas y procedimientos inmunocitoquímicos de alta sensibilidad, permiten la caracterización celular en tejidos procesados en forma convencional como lo son los fijados en formol y embebidos en parafina; lo cual ha dado mayor accesibilidad a estos métodos auxiliares de diagnóstico histopatológico. En este trabajo se describen los marcadores más usados en inmunocitoquímica para la caracterización de desórdenes de difícil diagnóstico.

ABSTRACT

In dermatology, immunocytochemical procedures have allowed great advances in the biological characterization of different tumor cells, infectious agents, immunocompetent cells, etc. The development of improved techniques and procedures have made possible their application in formalin fixed, paraffin embeded specimens. We describe the most used immunocytochemical methods for the characterization of cutaneous disorders of diagnostic difficulties.

INTRODUCCION

Los procedimientos inmunocitoquímicos han sido de gran importancia en la caracterización celular en los últimos años. En dermatología esta metodología ha permitido grandes avances en la caracterización de la individualidad biológica, que incluye células tumorales, agentes infecciosos, células inmunocompetentes, etc.

El desarrollo de mejores sondas inmunocitoquímicas y procedimientos inmunocitoquímicos de alta sensibilidad-

dad, permiten la caracterización celular en tejidos procesados en forma convencional como son los tejidos fijados en formol y embebidos en parafina.⁽¹⁾ La tinción inmunocitoquímica es el mejor apoyo para el diagnóstico histopatológico por su versatilidad, sensibilidad y especificidad.⁽²⁾

En dermatología estas nuevas herramientas permiten la cuantificación de células y factores solubles de la piel, así como, los tumores derivados.

Para determinar el origen celular de un desorden cutáneo, los investigadores cuentan con una serie de anticuerpos que reconocen distintas moléculas presentes tanto en células nor-

males como alteradas. Estos anticuerpos pueden utilizarse como sondas para caracterizar los siguientes orígenes celulares.

- Epitelial: citoqueratinas, antígeno de membrana epitelial (EMA), Lectina Ulex Europeus (UEA).

- Neurona): proteína S-100, Enolasa (neurona) específica (NSE), proteína básica de la mielina, cromogranina A.

- Neuroendocrino: Enolasa (neurona) específica (NSE), cromogranina A, anticuerpos dirigidos a neuropéptidos como: sustancia P, bombesina, met-enkefalina, péptido vasoactivo intestinal-

* Sección de Dermatopatología. Instituto de Biomedicina

** Sección de Biología Molecular, Instituto de Biomedicina

tina) (VIP), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP).

- Glandular: antígeno carcinoembrionario (CEA), proteína del fluido de la enfermedad quística mamaria (GCDFP).

- Linfocitario: antígeno común linfocitario (LCA-CD45), proteína S-100, Vimentina. Y los numerosos antígenos expresados por células hematopoyéticas bajo la denominación CD para grupos de diferenciación, pudiendo mencionar entre los más comunes: CD4, CD8, CD7, CD28, B7.1 (CD80), etc.

- Melanocítico: proteína S-100, Enolasa (neuronas) específica (NSE), HMB-45.

Además de estos subgrupos, se cuenta con el panel de filamentos intermedios: Vimentina, desmina, neurofilamento que permite caracterizar células mesenquimales, musculares y neuronales respectivamente; y panel de oncoproteínas o factores de proliferación como p53, p21 ras, PCNA, bcl2, etc. Igualmente existe un sinnúmero de anticuerpos dirigidos a moléculas de importancia estructural y funcional como hormonas, citocinas y sus receptores, proteínas de choque térmico y moléculas de stress que permitirán la caracterización de ciertas condiciones asociadas a desórdenes patológicos.

MATERIAL Y METODOS:

En el Servicio de Dermatopatología del Instituto de Biomedicina, utilizamos la inmunocitoquímica para la caracterización de desórdenes cutáneos de difícil diagnóstico por los métodos convencionales. En muchos de los casos este procedimiento será determinante para el tipo de terapéutica a utilizar.

Los marcadores usados más frecuentemente son:

1. Citoqueratinas:

Su expresión es común en tumores epiteliales. En la piel tienen un peso molecular que incluye desde 40 a 68 Kd y se subdividen en grupos ácidos y básicos. Los diferentes tipos de queratinas se ubican dentro de las capas de la epidermis según su peso molecular. Ejemplo: queratinas de 50 y 58 Kd se localizan en la capa basal y queratinas de mayor peso molecular se localizan en las capas superiores de la epidermis.⁽⁴⁾ La expresión de las queratinas varía con la injuria tisular, diferentes enfermedades y tumorigénesis. Los marcadores más comúnmente usados para la expresión de la citoqueratina en el diagnóstico dermatopatológico incluyen AE-1 y CAM 5.2; AE-1 es un anticuerpo monoclonal que se prepara de queratina humana y reacciona con queratinas de 40, 48, 50, 54 y 56.5 Kd. CAM 5.2 se prepara usando la línea celular HT 29 del carcinoma colorrectal humano como inmunógeno y reconoce las queratinas de 39,43 y 50 Kd. En la piel normal AE-1 tiñe los queratinocitos de la capa basal y ductos sudoríparos, mientras que CAM 5.2 tiñe solamente ductos sudoríparos. Los anticuerpos de citoqueratinas CAM 5.2 y AE-1 se utilizan para caracterizar lesiones epiteliales pobremente diferenciadas.⁽³⁾

2. Antígeno Carcinoembrionario:

Antígeno carcinoembrionario (CEA) es una proteína glicosilada de un peso molecular de 200 Kd.(s) CEA es producto de las células "globet" del intestino delgado y de células columnares y células globet de colon. CEA fue considerado específico para carcinoma de colon pero posteriormente se encontró dentro de tumores epiteliales derivados del endodermo (pul-

mones, páncreas) y mama. Formas mono y policlonales existen pero el anticuerpo monoclonal se utiliza más frecuentemente en el diagnóstico patológico por lo que se han identificado reacciones cruzadas con el anticuerpo policlonal.⁽⁶⁾ CEA es positivo en muchas neoplasias cutáneas tales como: carcinoma espinocelular, carcinoma anexial microquístico, carcinoma adenoideo quístico, carcinoma ecrico, espiroadenoma maligno, tumor mixto maligno, adenocarcinoma apocrino, tumores apocricos y ecricos benignos y se encuentra presente en glándulas sudoríparas apocricas y ecricas pero ausente en glándulas sebáceas. CEA puede ser útil en el diagnóstico de la enfermedad de Paget extramamaria y en tumores de diferenciación ecrica, así como en algunas lesiones de adenocarcinoma metastásico.

3. Vimentina:

Es miembro de los filamentos intracelulares de clase intermedia; consiste en una subunidad proteica de 57 Kd la cual se aísla de material de citoesqueleto de células 3T3 de ratón.⁽¹⁾ Es un constituyente normal de fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, melanocitos, cartílago, lipocitos, macrófagos y células mioepiteliales de glándulas salivales.⁽²⁾ En piel sana el anticuerpo no reconoce el epitelio escamoso pero reacciona con el endotelio capilar, fibroblastos dérmicos y melanocitos de la unión dermo epidérmica.⁽¹⁾ La Vimentina se usa en dermatopatología para reconocer diferenciación mesenquimal como por ejemplo: melanoma maligno, fibroxantoma atípico, leiomioma y linfomas.

4. Desmina:

Es un filamento intermedio con un peso molecular de 53 Kd que se encuentra en

cuentra presente en células de origen miogénica. Normalmente se encuentra en los discos intercalares y líneas Z de músculo cardíaco y en líneas Z de músculo esquelético,⁽¹⁰⁾ también en algunos tipos de músculo liso vascular. Desmina se utiliza para evidenciar diferenciación muscular y es especialmente útil en diferenciar leiomiomas y leiomiomas de otras neoplasias cutáneas de células fusiformes.

5. Proteína S-100:

Es una proteína ácida, altamente soluble de 21 a 24 Kd que se sintetiza en células gliales (astrocitos y oligodendrocitos). También está presente en células de Schwann y células satélites del sistema nervioso periférico.⁽¹¹⁾ Se ha identificado en melanocitos, células de Langerhans y ductos sudoríparos. Proteína S-100 está presente en schwannomas, condroblastomas, condrosarcomas, osteosarcomas, gliomas, tumores de células de Langerhans, algunos carcinomas y tumores melanocíticos. La proteína S-100 se expresa en proliferaciones melanocíticas benignas (nevus azul, nevus común adquiridos, nevus congénitos, nevus pigmentados de células fusiformes, nevus displásicos).⁽¹²⁾ Lesiones metastásicas se tiñen con baja frecuencia y melanomas desmoplásicos y neutrópicos pueden tener una baja sensibilidad, aunque en dermatopatología se usa para identificar células de origen melanocítico.

6. HMB-45:

Anticuerpo monoclonal dirigido contra una glicoproteína citoplasmática de 10 Kd que se cree que es un componente del complejo premelanosoma.⁽³⁾ Este anticuerpo reacciona con lesiones melanocíticas como nevus celulares fusiformes y epitelioides, nevus azul, nevus de Spitz, nevus con

génitos, nevus displásicos y melanoma maligno.⁽¹⁴⁾ Se ha demostrado que es un marcador sensible en el 98% de los casos de melanoma,⁽⁰⁵⁾ aunque no discrimina lesiones melanocíticas benignas de las malignas y se limita a confirmar la naturaleza melanocítica de las células.

7. Antígeno común leucocitario:

LCA o CD45

CD45 o LCA constituye un grupo de 5 a 8 glicoproteínas con pesos moleculares que varían de 180 a 220 Kd. Esta presente en todas las líneas celulares hematopoyéticas, además existen otros dos anticuerpos monoclonales que reaccionan en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina que son CD45RO (UCHL-1) el cual detecta una subpoblación de células CD4 + y CD8 + y CD45RA (MTR2) marca la mayoría de células T y B normales; también identifica linfomas de células B pero no linfomas de células T. El LCA se utiliza para demostrar diferenciación hematolinfoide con tinción citoplasmática indicando un resultado positivo.

8. CD30 (Ki-1):

El anticuerpo contra el antígeno Ki1 detecta una molécula de superficie celular de 120 Kd y reacciona con una molécula separada con un peso molecular de 57 Kd (Ki-1 /57 que se encuentra en el núcleo y citoplasma pero no en la superficie celular). CD30 se localiza en la enfermedad de Hodgkin, linfoma de células grandes, linfoma anaplásico de células grandes y papulosis linfomatoide. La expresión de Ki-1 /120 parece ser independiente de la expresión de Ki-1 /57, ambas se expresan en células de Reed Sternberg pero solo el Ki1157 se expresa en células de mieloma.⁽¹⁶⁾ El anticuerpo monoclonal con-

tra Ki-1 (CD30) requiere tejido fresco o congelado, pero el anticuerpo BerH2 es equivalente al CD30 y reacciona con tejido fijado en formalina y embebidos en parafinas.⁽⁷⁾

9. Enolasa:

Enolasa neurona) específica (NSE) se encuentra en neuronas normales y ha sido reportada en meduloblastomas, retinoblastomas, glioblastomas, astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, pineocitomas, papilomas de plexus coroides, adenomas pituitarios, meningiomas, neurilemomas, melanomas, tumores neuroendocrinos, algunos carcinomas, fibroadenomas y linfomas. Aunque algunos melanomas contienen NSE inmunorreactiva, unos pocos que aparecen como negativos podrían contener una forma de enolasa antigénicamente alterada.⁽⁰⁸⁾

10. Marcadores de superficie linfocítica:

CD1 a requiere tejido fresco y se encuentra presente en células de Langerhans cutáneas y nodales, así como en timocitos corticales. La reactividad de CD1 a se encuentra en histiocitosis X, leucemias de células T y ocasionalmente en células dérmicas comprometidas en la presentación antigénica.⁰⁹ También se requiere de tejido fresco o congelado para CD4 y CD8 pues los anticuerpos encontrados comercialmente no reaccionan con tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina. En la piel, todas las células linfocíticas reaccionan con CD4 o con CD8. La expresión de ambos CD4 y CD8 es anormal y se asocia a proliferación maligna.⁽²⁰⁾

Los antígenos CD2, CD3, CD5 y CD7 se refieren como marcadores de

grupo de células T pues se encuentran sobre la superficie celular de los linfocitos T. En neoplasias linfoides, estos antígenos pueden no ser expresados ejemplo en micosis fungoi de, papulosis linfomatoide y pitiriasis liquenoide et varioliforme aguda existe ausencia de CD7. Pero CD7 se expresa en un tipo de células T precursoras de linfomas linfoblásticos y ciertas neoplasias de células T maduras. CD5 se presenta normalmente en un subtipo de célula B circulantes y en linfomas tipo LCC-B pero está ausente en tejido linfoide asociado a mucosa y en linfomas de células foliculares. Podemos utilizar secciones teñidas con CD3 y CD5 para comparar la intensidad de tinción y confirmar el diagnóstico de neoplasia de células B. Un anticuerpo policlonal se encuentra comercialmente para CD3 que reacciona con el tejido fijado en formalina y embebido en parafina, sin embargo, debemos recordar que los marcadores de superficie linfocítica requieren tejido fresco o congelado.⁽²¹⁾

11. Epitopo alfa-galactosil:

En humanos, la alta expresión de epitopos alfa-galactosil está asociada con respuesta a situaciones de peligro como infecciones, enfermedades autoinmunes y senescencia. Se denomina epitopo alfa-galactosil a los anticuerpos dirigidos contra el carbohidrato Gal alfa-3 Galbeta-4 G1 cNAcR (Gal: galactosa, Galbeta-4G1 cNAc: N-acetil lactosamina, R: cadena glicoproteica o glicolipídica). Estudios han permitido proponer que el gen alfagalactosil y la subsecuente sobre-expresión del epitopo en la superficie celular, induce la pérdida de la tolerancia inmunológica que conlleva a una respuesta autoinmune por parte del huésped.⁽²²⁾

12. Proteína p53:

El gen TP53 codifica una fosfoproteína de 53 Kd, denominada p53. El gen de p53 denominado TP53, se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 en una región llamada 17p13⁽²⁴⁾ y constituye el blanco más frecuente de las mutaciones en cáncer humano.⁽²⁴⁾ Esta mutación y la pérdida alélica de uno de los genes TP53 son los defectos genéticos más frecuentes en la carcinogénesis humana.⁽²⁵⁾ La importancia de la proteína p53 es tal, que se le ha considerado como un guardián del genoma debido a su papel en el control de la carcinogénesis. Cualquier daño a nivel del gen TP53 o su proteína puede alterar la maquinaria de reparación del ADN y promover el desarrollo tumoral.

13. Antígeno nuclear de proliferación celular: PCNA

El PCNA es una proteína de 36 Kd, que alcanza su máxima síntesis durante la tercera fase del ciclo celular. Anticuerpos dirigidos contra PCNA pueden ser utilizados en la detección de células proliferantes en una gama de tejidos normales y alterados.

Procedimiento inmunocitoquímico:

Los procedimientos inmunocitoquímicos pueden ser de tres tipos, dependiendo del nivel donde se incorpora la molécula marcadora. Se denominan procedimientos directos aquellos que utilizan al anticuerpo primario detector unido a una molécula marcadora, e indirectos cuando la sonda inmunocitoquímica es el anticuerpo secundario. El tercer tipo de procedimientos son los métodos en puente como la avidina biotina inmunoperoxidasa (ABC) y la peroxidasa anti-peroxidasa (PAP), los cuales son los más usados en la actualidad por su alta sensibilidad.

El procedimiento inmunocitoquímico más utilizado en este estudio fue el de la avidina biotina inmunoperoxidasa. El mismo se realiza en cortes histológicos de 5µm de espesor obtenidos de muestra fijadas en formol e incluidas en parafina, colocados en láminas y desparafinados en xilol durante 12 horas. Previo bloqueo de la peroxidasa endógena y del fondo con suero normal de cabra, el procedimiento consistirá en forma breve en los siguientes: 1) Incubación con el anticuerpo primario durante 1 hora; 2) Incubación con el anticuerpo secundario durante 30 minutos; 3) Incubación con el complejo avidina biotina peroxidasa durante 30 minutos; 4) Revelado de la peroxidasa con peróxido de hidrógeno y el cromógeno elegido; 5) contraste con hematoxilina o eosina según el caso. Lavados con PBS de 5 minutos de duración deben ser realizados entre cada una de las incubaciones; los controles consistirán en la omisión del anticuerpo primario. Dependiendo de la localización del anticuerpo y del tipo del mismo, si es soluble o particulado, se pueden usar diferentes tinciones de contraste.

RESULTADOS:

Las citoqueratinas identifican tumores epidérmicos y sus apéndices, benignos y malignos, como carcinoma espinocelular, carcinoma sebáceo, carcinoma anexial microquístico, carcinoma ecrino, espirodenoma maligno.

El antígeno carcinoembrionario (CEA) permite caracterizar glándulas ecrinas y apocrinas y sus tumores, adenocarcinoma metastásico, enfermedad de Paget mamaria y extramamaria de la piel.

El antígeno de membrana epitelial (EMA) se utiliza para identificar glándulas sudoríparas ecrinas y glándulas sebáceas, tumores apocrinos y ecrinos benignos y carcinoma espinocelular.

La proteína S-100 caracteriza melanocitos, células de Langerhans, glándulas eccrinas y apocrinas y sus tumores, células de Schwann, melanomas (Fig. 1) y sarcomas de células claras de partes blandas.

Enolasa neuronal (NSE) permite identificar células de Merkel, carcinoma de células de Merkel (Fig. 2), melanomas.

El HMB-45 identifica melanoma y ciertas células nerviosas.

El antígeno leucocitario común (LCA) nos identifica los linfomas.

Con el p53 se identifican mutaciones en neoplasias cutáneas, como enfermedad de Bowen, carcinoma espinocelular (Fig. 3).

El epítipo alfa-galactosil (GAL) nos detecta situaciones de alarma como infecciones, enfermedades autoinmunes y senescencia y lo utilizamos para identificar células infectadas con el virus papiloma humano en condilo

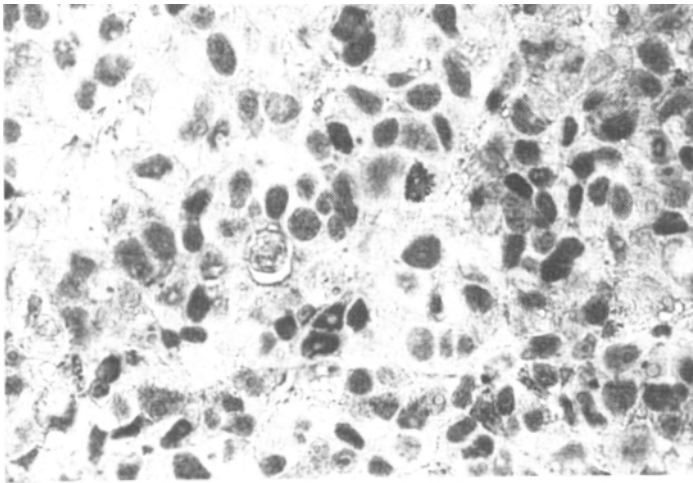
mas acuminados en vulva (Fig. 4).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) permite identificar células proliferantes en tejidos normales y alterados.

DISCUSION:

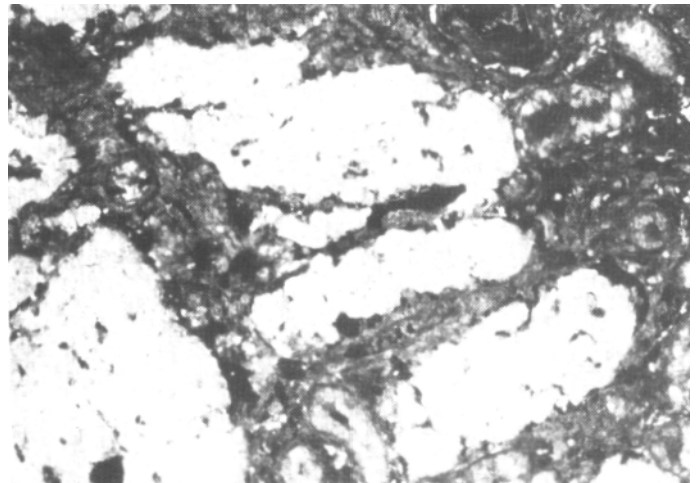
Nuestra experiencia en la utilización de procedimientos inmunocitoquímicos para la caracterización de células cutáneas en piel sana y afectada nos permite demostrar la importancia de

FIGURA 1

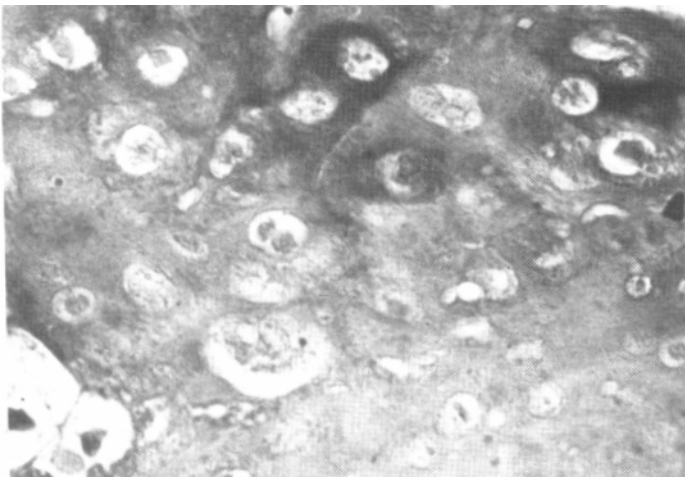


**Melanoma maligno. S-100
FIGURA 3**

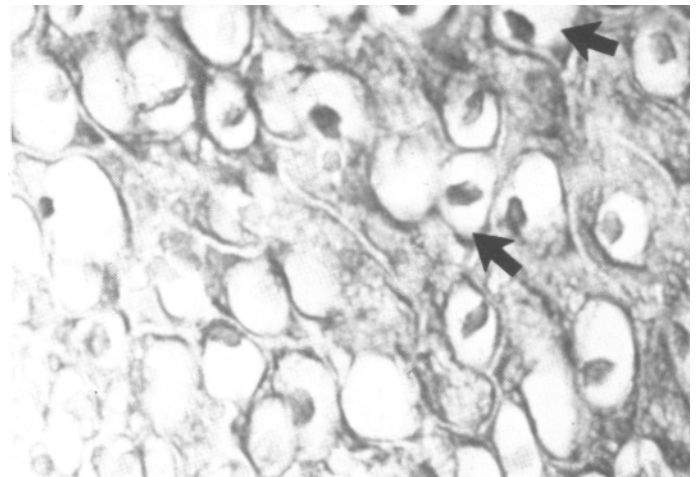
FIGURA 2



**Carcinoma de células de Merkel, enolasa
FIGURA 4**



Carcinoma espinocelular. Proteína p53



Condilomas acuminados en vulva. Epítipo alfa-galactosil

esta metodología en la práctica dermatológica.

Para lograr el diagnóstico definitivo, debemos evaluar una serie de marcadores que orientarán hacia el origen celular de la patología a estudiar, por lo que es fundamental contar con varios grupos de anticuerpos. Estos grupos o páneces pueden ser organizados en base a origen embriológico o funcional como en el caso de los marcadores linfocitarios o proteínas asociados con la proliferación celular.

La utilización de estas sondas inmunocitoquímicas permiten lograr el diagnóstico de patologías que tanto clínica como histológicamente son de difícil diagnóstico, como carcinoma espinocelular vs carcinoma de Merkel, carcinoma espinocelular vs melanoma, leiomiomas vs dermatofibrosarcoma protuberans, neoplasias intraepidérmicas tipo enfermedad de Bowen vs enfermedad de Paget extramamaria, etc.

La investigación continúa en la búsqueda de verdaderos marcadores tumorales y moléculas que permitan evidenciar estados de alerta inmunológica, con la finalidad de ir afinando el diagnóstico y permita predecir la patología antes de su aparición.

Es importante señalar que el uso del procedimiento inmunocitoquímico no sustituye al diagnóstico histopatológico pero es actualmente una herramienta fundamental para la identificación de ciertos desórdenes cutáneos con un alto valor pronóstico y de implicaciones terapéuticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arias-Stella Castillo J., Jáuregui J., Arias-Stella J. La inmunohistoquímica en el diagnóstico de tumores de piel. *Folia Dermatológica peruana*. 1996; 7 (1).

- Essenfeld-Yahr E., Tapia F. J. Limitaciones del diagnóstico histológico. Nuevas herramientas. *Tribuna Médica*. 1987; 2: 29-32.
- Wallace M., Smoller B. Immunohistochemistry in diagnostic dermatopathology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996; 34 (2): 1638-3.
- Cooper D., Schermer A., Sun TT. Biology of disease: classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications and limitations. *Lab. Invest.* 1985; 52: 243-55.
- Athen D. J., Nakane P. K., Brown W. R. Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen in normal intestine and colon cancer: abnormal distribution of CEA on the surfaces of colon cancer cells. *Cancer*. 1982; 49: 2.077-90.
- Bhan A. K. Diagnostic strategies based on differentiation antigens. In: Colvin R. B. Bhan A. K., McCluskey R. T, eds. *Diagnostic immunopathology*. New York: Rayen Press, 1995: 455-78.
- Franke W. W., Schmid E., Osborn M. et al. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 75: 5.034-8.
- Azumi N., Battifora H. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms: a comprehensive immunohistochemical study on formalin and alcohol fixed tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 1987; 88: 286-96.
- Gown A. M., Vogel A. M., Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins: Part. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* 1984; 114: 309-21.
- Lazarides E., Balzer D. R. Specificity of desmin to avian and mammalian muscle cells. *Cell*. 1978; 14: 429-38.
- Stefanson K., Wellman R., Jerkovic M. S-100 protein in soft-tissue tumors derived from schwann cells and melanocytes. *Am. J. Pathol.* 1982; 106: 261-8.
- Gatter K. C., Ralfkiaer E., Skinner J. et al. An immunocytochemical study of malignant melanoma and its differential diagnosis from other malignant tumours. *J. Clin. Pathol.* 1985; 38: 1.353-7.
- Schaumburg-Lever G., Metzler G., Kaiserling E. Ultrastructural localization of HMB 45 binding sites. *J. Cut. Pathol.* 1991; 18: 432-5.
- Skelton H. G. III, Smith K. J., Barrett T. L., et al. HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions: a reflection of cellular activation. *Am. J. Dermatopathol.* 1991; 18: 261-3.
- Wick M. R., Swanson P. E., Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45: an immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J. Cutan. Pathol.* 1988; 15: 201-7.
- Taylor C. R. Lymphoma/hematopathology: the antibodies. In: Taylor C. R., Cote R. J., eds. *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*. Philadelphia: W. B. Saunders. 1986; 71-106.
- Schwartz R., Gerdes J., Durkop H. et al. Ber-H2: a new anti-Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formalin-resistant epitope. *Blood*. 1989; 74: 1.678-89.
- Benington J. Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the Surgical Pathologist. Taylor, C. R. (de). W. B. Saunders Company, Philadelphia. 1986; 19: 339-40.
- Hage C., Willman C. L., Fava B. F., et al. Langerhans' cell histiocytosis (histiocytosis X): immunophenotype and growth fraction. *Hum. Pathol.* 1993; 24: 840-5.
- Smoller B. R. Immunoperoxidase in the evaluation of cutaneous lymphocytic infiltrates. *Semin Dermatol.* (In press).
- Mason D., Cordel J., Brown M., et al. Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *Am. J. Pathol.* 1989; 42: 1.194-200.
- Galili U. Abnormal expression of alpha-galactosyl epitopes in man. A trigger for autoimmune process? *Lancet*. 1989; II: 358-61.
- Csobe M., Emanuel B. S., Givoli D., Oren M., Croce C. M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 1 7p1 3. *Nature*. 1986; 320: 84-5.
- Basset-Séguin N., Mólés J. P., Mils V., De-reure O., Ghilhou J. J. TP53 tumor suppressor gene in human carcinogenesis. *Exp. Dermatol.* 1993; 2: 99-105.
- Harris A. L. Mutant p53: the commonest genetic abnormality in human cancer. *J. Pathol.* 1990; 162: 5-6.