

INMUNOELECTROMICROSCOPIA

UN NUEVO CONCEPTO EN LA LOCALIZACION DE LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO A NIVEL ULTRAESTRUCTURAL

G. HANSSSEN, J. URIBE, H. HANSSSEN

Dos marcadores electrodensos: La enzima Peroxidasa y el Oro en forma coloidal son utilizados en la detección de productos intracelulares a nivel ultraestructural. Se describe la metodología y ventajas en relación a la conservación de estructuras antigénicas y preservación de la morfología celular.

INTRODUCCION

A pesar de disponerse actualmente de un número apreciable de técnicas inmunocitoquímicas, aplicables a microscopía de luz, para la detección de antígenos tisulares e intracelulares (1-5); a nivel de microscopía electrónica estos procedimientos, aunque de gran utilidad, presentan varios problemas que deben de ser considerados.

Uno de los mayores obstáculos es el de lograr la fácil penetración de anticuerpos al interior de la célula sin alterar o destruir su ultraestructura. Enfatizándose que para la localización de antígenos superficiales a nivel de membranas o intracelulares la preservación de los determinantes antigénicos es de primordial consideración, ya que sin ello otros parámetros importantes, tales como especificidad inmunológica, carecen de valor.

Dra. Genarina Hanssen: Profesora Asistente, Departamento de Morfología Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia Medellín-Colombia. Actualmente en entrenamiento: Department of Pathology MD Anderson Hospital and Tumor Research Institute, Texas Medical Center, Houston Texas 77030, U.S.A.; Dr. Gonzalo Uribe Botero: Profesor Asistente, Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center and Staff Pathologist Veterans Administration Hospital, Medical Center, Houston Texas 77211, U.S.A.; Dr. Henry Hanssen V.: Profesor Asociado, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia Medellín-Colombia, Actualmente en entrenamiento: Department of Virology Graduate School, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center. Houston Texas 77030, U.S.A.

Solicitud de Separatas al Dr. H. Hanssen.

Acta Médica Colombiana. Vol.8 N° 3 (Mayo-Junio) 1983.

METODOS DE

INMUNOELECTROMICROSCOPIA

Los anticuerpos utilizados en las pruebas inmunocitoquímicas no son capaces de penetrar el tejido intacto, aún cuando éste haya sido fijado. Para tratar de resolver esta dificultad, esencialmente han sido planteadas dos clases de soluciones:

1. Método de pre-inclusión: se refiere a la aplicación de los procedimientos inmunocitoquímicos antes de ser embebidos los tejidos en las resinas plásticas usadas como medio de inclusión en microscopía electrónica. Este método se ha denominado de difusión o pre-inclusión y consiste en la "destrucción parcial" de la membrana celular, para facilitar la penetración y difusión de las moléculas de anticuerpos al interior celular. (6). A pesar de que se obtienen resultados satisfactorios, su aplicación tiende a destruir en grado considerable la ultra-estructura de las membranas citoplasmáticas.

2. Método de post-inclusión: consiste en la aplicación de los procedimientos inmunocitoquímicos después de la inclusión de los tejidos en las resinas plásticas. Este método, denominado de "superficie", o post-inclusión, intenta la demostración de antígenos presentes en la superficie de secciones ultrafinas; sin alterar la estructura fina de las membranas celulares. Los resultados obtenidos no son siempre satisfactorios ya que varios factores pueden alterar su calidad y exactitud (7). Uno de ellos, es la desnaturalización de los determinantes antigénicos en los tejidos, los cuales tienden a ser alterados a través de los procesos de deshidratación e inclusión en las resinas plásticas. Otra limitación en este tipo de prueba es la precipi-

tación no específica de los anticuerpos sobre las resinas plásticas a base de Epón. Sumado a lo anterior, otro punto de criticismo se relaciona con el uso de secciones histológicas ultrafinas las cuales exhiben diámetros muy pequeños limitándose así el área de exposición de los anticuerpos a los probables determinantes antigénicos, cuando se verifica la inmunorreacción.

USO DE MARCADORES INMUNOCITOQUIMICOS EN MICROSCOPIA ELECTRONICA

Otra gran limitación al realizar pruebas para inmunoelectromicroscopía es la aplicación de marcadores inmunocitoquímicos adecuados que permitan la demostración de la reacción antígeno-anticuerpo. Después de los procesos de inclusión en las resinas plásticas, las moléculas de proteínas no marcadas en los tejidos, tales como antígenos y anticuerpos, no pueden ser identificadas debido a que su electrodensidad es igual a la del medio circundante. Por lo tanto en inmunoelectromicroscopía tales tipos de reacciones sólo pueden ser visualizadas cuando se confiere electrodensidad u opacidad al antígeno o al anticuerpo. El uso de moléculas IgG conjugadas a marcadores inmunocitoquímicos ha solucionado en gran parte este problema. Un buen marcador para inmunoelectromicroscopía debe cumplir las siguientes condiciones: 1. Ser electro-opaco o electrodenso. 2. El tamaño de su molécula debe de estar en un rango que permita su fácil penetración a través de las membranas celulares y 3. Su conjugación a moléculas IgG debe ser sumamente estable.

Muy pocas sustancias cumplen completamente los anteriores requisitos, sin embargo se ha descrito esencialmente el uso de las siguientes:

Ferritina: Fue introducida por Singer y Schick (8) como marcador inmunocitoquímico para microscopía electrónica. La molécula presenta forma esférica con un diámetro de 11 nanómetros y un peso molecular de 650,000 daltons, siendo el contenido en hierro (23% del peso molecular total), el responsable de su gran electroopacidad. Cuando se

conjugan covalentemente a moléculas IgG, el punto de electroopacidad puede ser visto a una distancia de 8 nanómetros. A pesar de que se la considera un buen marcador inmunocitoquímico, con un diámetro del complejo inmune (Ferritina/IgG) de 26 nanómetros; se ha comprobado la tendencia a la formación de agregados moleculares alrededor del inmuno-complejo, lo cual incrementa varias veces el diámetro mencionado y dificulta su penetración al interior celular.

Peroxidasa: esta enzima con peso molecular de 400,000 daltons y diámetro de 21 nanómetros, es un excelente marcador inmunocitoquímico en microscopía electrónica; ya sea conjugada covalentemente a moléculas IgG o unida al inmunocomplejo de peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP), en la reacción de Stenberger (9).

La electroopacidad, no es el único criterio para identificar la reacción inmune; ya que la visualización de las características estructurales del complejo PAP (2 moléculas IgG más 3 moléculas de peroxidasa), en su forma cíclica pentagonal, son indicación directa de la proximidad del sitio de reacción antígeno-anticuerpo. El hallazgo de tales estructuras ayuda a distinguir los sitios de reacción específica de aquéllos en los cuales se aprecia solamente electroopacidad debido a la polimerización de diamino-benzidina sobre complejos no específicos (10).

Oro coloidal: es posible conferir electroopacidad a una molécula IgG, uniéndola covalentemente con un metal pesado, como el oro. Sin embargo el pequeño tamaño de los átomos del metal o los radios máximos limitan el número de grupos electrodensos en la molécula IgG, cuando se practica el mareaje directo. La electroopacidad por molécula de anticuerpo puede ser altamente incrementada por el uso de partículas coloidales del metal, las cuales consisten en agregados densos unidos iónicamente a la molécula IgG. Uno de los métodos más comunes en la preparación de estos agregados, está basado en el tratamiento del cloruro de oro con varios agentes reductores, en asociación con calor. Dependiendo del tipo de agente reductor

utilizado, se producen coloides del metal de distintos diámetros (desde 10 nanómetros hasta 250); siendo el primero de ellos el más indicado para el estudio de ultra-estructuras (11).

El uso de partículas coloidales de diferentes diámetros permite la detección de distintas estructuras en un mismo tejido (12). Además de la conjugación a moléculas de anticuerpos, el oro coloidal puede ser unido a macromoléculas, tales como proteínas (13), polisacáridos (14), glicoproteínas (15) y enzimas (16). Este trabajo describe nuestra experiencia en el uso de la enzima peroxidasa y el oro coloidal como marcadores inmunocitoquímicos en la detección de productos intracelulares a nivel ultraestructural.

MATERIAL Y METODOS

Uso de la enzima peroxidasa como marcador inmunocitoquímico. Tejidos provenientes de dos carcinomas mamarios fueron tratados mediante modificación de la técnica de Bohn (17), utilizando el sistema de inmunoperoxidasa en la demostración lactoalbúmina a nivel citoplasmático ultraestructural.

Los tejidos fueron cortados en pequeños fragmentos aproximadamente de 1 milímetro de espesor y lavados en solución tamponada de fosfatos (pH 7.3), la cual contenía una mezcla de saponina al 0.05 % (No. 1252, Sigma Co., St. Louis, Mo., E.U.A) y glutaraldehído al 0.05% (grado E.M. No. 216, Polysciences, NC, Penn, E.U.A). Posteriormente fueron postfijados durante 45 minutos a 4°C en solución tamponada de fosfatos (pH 7.3) conteniendo una mezcla de glutaraldehído al 0.05% y paraformaldehído al 1% (18). Después de la fijación y con el objeto de obtener cortes más finos del tejido, los fragmentos fueron colocados en el compuesto OCT (Tissue-Tek II, Lab. Tek Products, Illinois, E.U.A) siendo cortados en un crióstato para cortes por congelación. Se realizaron cortes de 4 micras de espesor. Las secciones fueron recogidas en solución tamponada de fosfatos, en frascos de 2 ml de capacidad dejando flotar libremente el tejido en el líquido durante 5 minutos.

Inmediatamente se realizó el método PAP utilizando tres antisueros secuencialmente: suero de conejo inmunoglobulinas IgG anti-lactoalbúmina humana (Nordic Immunological Lab., Tilberg, Holland), diluido 1:1,500 e incubado durante 24 horas a 4°C.; Inmunoglobulinas IgG de cabra anti-conejo, diluido 1:10 e incubado por media hora a 37°C. (Miles Lab., Elkhart, Ind. E.U.A.); Complejo inmune de peroxidasa anti-peroxidasa preparado en conejo (Dako Immunoglobulins, Ltd. Copenhagen, Denmark), diluido 1:50 e incubado por media hora a 37°C. La reacción cromógena fue desarrollada con 3'3 diaminobenzidina al 0.05% preparada en solución tamponada Tris pH. 7.6 (100ml) más 30 microlitros de H₂O₂ al 30%, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante el desarrollo del método PAP, se dejaron flotar los tejidos en las soluciones utilizadas, realizándose el cambio de sustancias con pipetas Pasteur. Después de la incubación con cada antisuero los tejidos fueron lavados en solución tamponada Tris (Schwarz/Mann Inc., Spring Valley N.Y. E.U.A), pH 7.6, durante 10 minutos. Se realizó un control negativo de la reacción PAP, mediante la sustitución del antisuero primario, por suero de conejo no-inmune.

Posterior a la realización del método PAP, los tejidos fueron post-fijados en tetróxido de osmio al 2% durante 90 minutos, deshidratados y embebidos en Epón araldita según el método descrito por Escovar et al (19, 20). Para los propósitos del presente estudio (demostración inmunocitoquímica de material intracitoplasmático) no se realizó coloración con acetato de uranilo ni con citrato de plomo.

Uso del oro coloidal como marcador inmunocitoquímico. Una adenohipófisis humana obtenida por autopsia, fue tratada por los métodos de Faulk et al (21) y Horisberger (11, 12) utilizando oro coloidal en la demostración de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) humana a nivel ultraestructural.

Los tejidos fueron deshidratados, embebidos en Epón y cortados en secciones ultrafinas, aplicando la metodología de rutina para microscopía electrónica (20). Las sec-

ciones ultrafinas fueron recojidas en rejillas de níquel. Posteriormente éstas fueron puestas en contacto con una gota de peróxido de hidrógeno al 10% para facilitar con este tratamiento la penetración de anticuerpos a los tejidos (22), siendo luego lavadas durante 5 minutos sumergiendo las rejillas en tres cambios de solución tamponada de fosfatos (pH. 7.4).

Para efectuar la inmunorreacción las rejillas (tejidos) fueron puestas en contacto con una gota de suero de conejo-moléculas IgG antihormona adrenocorticotrópica humana, (Wellcome Research Lab., Beckenham, Inglaterra), diluido 1:500 e incubado a 4°C. durante 24 horas, sobre un papel de cera y en caja de Petri con ambiente húmedo para evitar evaporación del líquido, siendo posteriormente lavadas en tres cambios de solución de fosfatos durante 5 minutos.

Inmediatamente los tejidos fueron incubados con suero de cabra, inmunoglobulinas IgG anti-conejo, conjugado a partículas de oro coloidal. (E-Y Laboratories Inc., San Mateo, Ca. EUA), utilizándose varias diluciones (1:20, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1,000); después de incubación durante una hora a temperatura ambiente, los tejidos fueron lavados durante 10 minutos en solución tamponada de fosfatos. Se utilizó un control negativo de la reacción, sustituyendo el antisuero primario por suero de conejo no inmune. Se evitó el contrastar los tejidos por tinción con acetato de uranilo o citrato de plomo en orden a asegurar que solamente las estructuras inmunorreactivas resultasen electrodensas.

RESULTADOS

Inmunoperoxidasa: La fijación de tejidos con la mezcla: saponina al 0.05%, glutaraldehído al 0.05% y paraformaldehído al 1%, además de facilitar la penetración de anticuerpos al interior celular, conservó en forma excelente la ultraestructura celular.

La reacción positiva para lactoalbúmina fue localizada a nivel de gránulos secretorios citoplasmáticos en uno de los carcinomas mamarios. La reacción se caracterizó por un

precipitado electrodensso contenido dentro de las membranas de dichos gránulos. Todas las demás estructuras celulares fueron electrolúcidas con este tipo de técnica. La figura 1, ilustra tales hallazgos.

Los tejidos en los cuales se substituyó el antisuero primario por suero no inmune, fueron negativos al realizar la inmunorreacción, lo cual comprueba la monoespecificidad del suero anti-lactoalbúmina.

Oro coloidal: El uso de partículas de oro en forma coloidal conjugadas a moléculas IgG, permitió la detección de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) contenida en gránulos citoplasmáticos secretorios de este tipo de células adenohipofisarias.

Los mejores resultados fueron obtenidos con la dilución 1:500 del antisuero primario y 1:500 del oro coloidal, notándose un incremento en la precipitación no específica de las partículas en concentraciones bajas tales como 1:20, 1:50, 1:100. La reacción positiva se caracterizó por la formación de un precipitado fino de las partículas de oro sobre los gránulos secretorios citoplasmáticos. La figura 2 ilustra los resultados obtenidos.

DISCUSION

Inmunoperoxidasa: La producción de lactoalbúmina en carcinomas mamarios ha sido

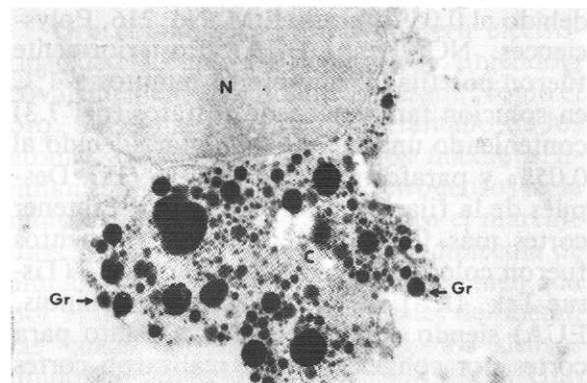


Figura 1. Reacción positiva PAP en la detección de lactoalbúmina localizada en gránulos secretorios citoplasmáticos (Gr) con diámetros variables de 150 a 500 nanómetros, detectados en células de un carcinoma mamario. Nótese el contraste de las estructuras positivas electrodensas (Gr) con otras ultraestructuras no inmunorreactivas tales como el Núcleo (N) Citoplasma (C) (13,000 X).

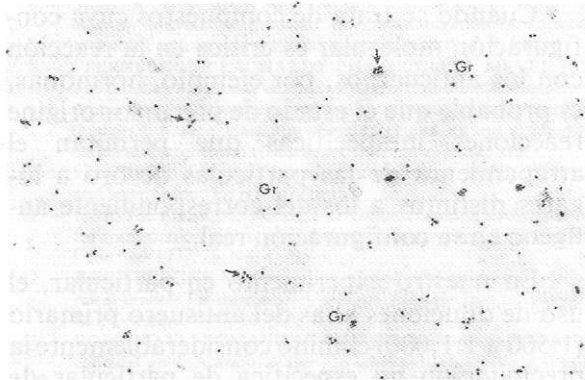


Figura 2. Reacción positiva en la detección de hormona adrenocorticotrófica (ACTH) en gránulos secretorios citoplasmáticos (Gr) de células de adenohipófisis normal humana. Se utilizó en la detección inmunocitoquímica moléculas IgG conjugadas a partículas de oro en forma coloidal (10 nanómetros de diámetro), las cuales aparecen como precipitados finos sobre los gránulos secretorios. Las flechas indican la inmunorreacción. (37,500 X).

reportada en la literatura científica, tanto en estudios inmunocitoquímicos para microscopía de luz (23-25) como electrónica (23, 26). Los resultados positivos obtenidos en nuestra experiencia confirman tales hallazgos y demuestran que el tratamiento de los tejidos con la mezcla saponina-glutaraldehido-paraformaldehido, en las concentraciones y secuencias señaladas, favorecen altamente la penetración de anticuerpos a través de las membranas celulares. Además de proporcionar una alta preservación de los tejidos sin alterar grandemente la ultraestructura celular, esta metodología asegura la especificidad de la inmunorreacción ya que conserva la estructura de los determinantes antigénicos.

No está bien entendida la acción de la saponina sobre las membranas celulares (27). Experimentalmente, se ha comprobado que después del tratamiento con esta sustancia, los eritrocitos presentan pequeños agujeros con diámetros de 4 a 5 nanómetros, visualizados por microscopía electrónica y con aplicación de la técnica de grabado o réplica por congelación (28). Es probable que su presencia facilite la penetración de anticuerpos cuando se emplean técnicas inmunocitoquímicas. Tampoco es posible explicar el efecto sinérgico de las tres sustancias sobre los tejidos. Los excelentes resultados obte-

nidos, permiten suponer que el glutaraldehido y en menor grado el para-formaldehido además de su efecto fijador sobre estructuras proteicas ejercen un efecto estabilizador sobre la saponina balanceando su acción sobre los tejidos.

Se puede indicar que la aplicación de esta metodología para la fijación de tejidos, sirve como modelo experimental en la detección de productos intracelulares a nivel ultraestructural, siempre que las características bio y fisicoquímicas de los mismos sean similares a nuestro experimento en particular. Sin embargo para otro tipo de sistemas, quizás sea necesario realizar ligeras modificaciones en las concentraciones y tiempo de aplicación de las citadas sustancias.

Oro Coloidal: Existen pocos trabajos utilizando oro coloidal como marcador en la detección de antígenos intracelulares a nivel ultraestructural (29, 30). Las hormonas de la adenohipófisis han sido estudiadas ampliamente por inmunoelectromicroscopía utilizando métodos de peroxidasa (31, 32) además de la tradicional caracterización por microscopía electrónica (33).

Los resultados positivos obtenidos en la detección de la hormona ACTH en secciones ultrafinas de adenohipófisis humana, indican la utilidad del empleo del oro coloidal como marcador electrodenso en microscopía electrónica. Su aplicación también se extiende al estudio de superficies por electromicroscopía de rastreo o Scanning (11, 14). Comparado con los métodos de ferritina e inmunoperoxidasa, el método de oro coloidal ofrece la ventaja del reconocimiento simultáneo de varios antígenos en un mismo tejido por el empleo de moléculas IgG marcadas con partículas de oro de diferente diámetro. Además el diámetro pequeño de las partículas y la propiedad electrodenso de las mismas, las hace fácilmente reconocibles para estudios de receptores antigénicos en microscopía electrónica (35).

La interpretación de resultados en la localización de antígenos y compuestos celulares mediante la utilización de anticuerpos conjugados a partículas de oro coloidal debe ser cautelosa, puesto que no se puede descar-

tar cierto grado de adsorción inespecífica de estas partículas a algunos lugares o estructuras celulares. El uso de controles adecuados permite valorar el grado de adsorción inespecífica. Tales controles incluyen la sustitución del antisuero primario por suero preinmune o no inmune y además la utilización de anticuerpos conjugados a otras sustancias electrodenasas como la peroxidasa, que permitan hacer una evaluación comparativa paralela.

Las posibles causas de adsorción inespecífica pueden ser divididas en dos categorías: las inherentes al procedimiento y las inherentes al estado y composición de los determinantes antigénicos a detectar. En cuanto al primero se debe tener en cuenta que la reacción se realiza sobre material embebido en plástico (Epón-Araldita), sustancias que podrían influir en el atrapamiento de partículas en sitios no específicos. Los procedimientos de fijación que conllevan tetróxido de osmio compuesto, cuya función primaria es la fijación de lípidos, pueden impedir la buena penetración de los anticuerpos permitiendo que se adsorban inespecíficamente a algunos sitios celulares y no puedan ser removidos con los lavados.

El pH de las soluciones amortiguadoras en las cuales se lleva a cabo la reacción y la conjugación del oro deben ser estrictamente controlados ya que a pesar de que el enlace del oro se describe como estable, las alteraciones en el pH permiten la liberación de partículas alterando el estado y constitución coloidal. Algunas de las partículas liberadas pueden quedar luego adsorbidas inespecíficamente en otros sitios celulares distintos del lugar del antígeno a detectar.

En relación al estado de los antígenos o determinantes antigénicos a detectar se debe tener en cuenta que los procedimientos de fijación pueden contribuir a lisis celular y a la destrucción de estructuras celulares por ejemplo ruptura de vesículas que permitan la liberación de antígenos a otros compartimentos celulares haciendo que los anticuerpos reaccionen con ellos dando lugar a falsas interpretaciones en cuanto a los sitios de reacción.

Cuando se trata de compuestos cuya configuración molecular es crítica en la reacción con los anticuerpos, por ejemplo, hormonas, es probable que el estado de precursor origine reacciones inespecíficas que permitan el atrapamiento de las partículas de oro a lugares distintos a los del correspondiente antígeno en su configuración real.

En nuestro experimento en particular, el uso de diluciones altas del antisuero primario (1:500 a 1:1,000) eliminó considerablemente la precipitación no específica de partículas de oro coloidal ligadas al antisuero secundario, otros autores han informado que el tratamiento de los tejidos con albúmina bovina diluida en la solución tamponada de fosfatos utilizada en la prueba, disminuye considerablemente el grado de reacción inespecífica (34).

En síntesis se concluye que la inmunoelectromicroscopía abre una era de mayor precisión en el reconocimiento de la ultraestructura celular.

SUMMARY

Two electron dense markers: The Enzyme Peroxidase and Gold Colloidal particles are used to detect intracellular antigens at the ultrastructural level. The methodology used for both markers and the advantages in relation to antigenic structures and cell morphology preservation is described.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— DELELLIS RA, STERNBERGER LA, MANN RB, BANKS PM, NAKANE PK. Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Report of a workshop sponsored by the National Cancer Institute. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 483.
- 2.— QUALMAN SJ, KEREN DF. Immunofluorescence of deparaffinized trypsin-treated renal tissues. Preservation of Antigens as a Adjunct to Diagnosis Disease. *Lab Invest.* 1979;41: 483.
- 3.— ROBB JA. A new enzyme Immunoelectin tissue stain. *Diagnostic Medicine. Special Issue* 1981; p87-95.
- 4.— LEE SIN H. Cellular estrogen and progesterone receptors in mammary carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1980; 73: No. 3.
- 5.— COON JS, WEINSTEN RS. Detection of ABH tissue isoantigens by immunoperoxidase methods in normal and neoplastic urothelium. Comparison with the erythrocyte Adherence Method. *Am J Clin Pathol* 1981; 76: No. 2.
- 6.— KULLMANN WD, AVRAMEAS S, IERNYNCK T. A comparative study for the ultrastructural localization of intracellular immunoglobulins using peroxidase conjugates. *Immunol Meth* 1974;5:33.
- 7.— HARDY PH, MEYER HG, CUCULIS JJ, PETRALI JP, STERNBERGER LA. Post-embedding staining for electron microscopy by the unlabeled antibody peroxidase method. *J Histochem Cytochem* 1970; 18: 684.

- 8.— SINGER SJ, SCHICK AF. The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin. *J biophysbiochem cytol* 1961; 9:519.
- 9.— STERNBERGER LA, HARDY PH, CUCULIS J, MEYER HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18:315.
- 10.— STERNBERGER LA. *Immunocytochemistry*. JOHN WILEY and Sons. Second Ed NY 1979; p 153.
- 11.— HORISBERGER M, ROSSET J. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1977; 25: No. 4. 295.
- 12.— HORISBERGER M. Evaluation of Colloidal gold as a cytochemical marker for transmission and scanning electron microscopy. *Biol Cellulare* 1979; 36: 353.
- 13.— ROMANO EL, ROMANO M. Staphylococcal protein A bound to colloidal gold: A useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. *Immunocytochemistry* 1977; 14: 711.
- 14.— HORISBERGER M, ROSSET J, VONLATHEN M. Location of glycoproteins on milk fat globule membrane by scanning and transmission electron microscopy, using lectin-labelled gold granules. *Exp. Cell. Res* 1977; 109: 361.
- 15.— GEOGHEGAN WD, ACKERMAN GA. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat antihuman immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a New method, Theory and applications. *J Histochem Cytochem* 1977; 25: 1187.
- 16.— HORISBERGER M, VONLATHEN M. Simultaneous localization of a hepatic binding protein specific for galactose and of galactose-containing receptors on rat hepatocytes. *J Histochem Cytochem* 1978; 26: 960.
- 17.— BOHN W. A fixation method for improved antibody penetration in electron microscopic immunoperoxidase studies. *J Cytochem Histochem* 1978; 26: No. 4, 293.
- 18.— ROBERTSON JD, BODENHEIMER TS, STAGE DE. The ultrastructure of Mauthner cell synapses and nodes in gold fish brains. *J Cell Biol* 1963; 19: 159.
- 19.— ESCOVAR G, URIBE G, CORREDOR D. Localización inmunocitoquímica del polipéptido pancreático humano por microscopía de luz y electrónica. *Acta Médica Colombiana* 1982; 7: No. 2,61.
- 20.— URIBE G, ESCOVAR G. Ultraestructura de las células de la adenohipófisis humana. Aceptado para publicación *Antioquia Médica* (en imprenta).
- 21.— FAULK WP, TAYLOR GM. An immunocolloidal method for the electron microscope. *Immunocytochemistry* 1971; 8:1081.
- 22.— STERNBERGER LA. *Immunocytochemistry*. JOHN WILEY and Sons Second Ed NY 1979; p 136.
- 23.— CLAYTON F, SIBLEY RK, ORDOÑEZ NG, HANSSSEN G. Argrophilic breast carcinomas. Evidence of lactational differentiation. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 323.
- 24.— CLAYTON F, ORDOÑEZ NG, HANSSSEN G, HANSSSEN H. Immunoperoxidase localization of lactalbumin in Malignant Breast Neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 1982; 106: 268.
- 25.— LEINBERG DL, TODD J, GROVES ML. Studies on human alpha-lactalbumin: Measurements in normal human breast and breast carcinoma. *J Clin Endocrinol* 1977; 45: 1238.
- 26.— ROSE HN, McGRAT CM. Alpha-lactalbumin in human mammary carcinoma. *Science* 1975; 190: 673.
- 27.— ASSA Y, SHANY S, GESTETNER B, TENCER Y, BERK Y, BONDI A. Interaction of alfalfa saponins with components of the erythrocyte membrane in hemolysis. *Biochem Biophys Acta* 1973; 307: 83.
- 28.— SEEMAN P. Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and by solecithin. *J Cell Biol* 1967; 32: 55.
- 29.— HORISBERGER M, VONLATHEN M. Location of mannan and chitin on thin sections of budding yeasts with gold markers. *Arch. Microbiol* 1977; 115,1-7.
- 30.— ROTH J, BENDAYEN M, ORCI L. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of Protein A-Gold Complex. *J Histochem Cytochem* 1978; 26, 1074-1081.
- 31.— PARSONS JA, ERLANDSEN SL. Ultrastructural Immunocytochemical localization of prolactin in rat anterior pituitary by use of the unlabeled antibody enzyme method. *J Histochem Cytochem* 1974; 5: 340.
- 32.— DUELLO TM, HALMI NS. Ultrastructural Immunocytochemical localization of Growth Hormone and Prolactin in Human Pituitaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 2: 189.
- 33.— ESCOVAR G, HANSSSEN H, URIBE G. Estudio Inmunocitoquímico de las hormonas de la Adenohipófisis humana. *Acta Med Col* 1979; Vol. 6 No. 3: 257.
- 34.— HORISBERGER M, FARR DR, VONLATHEN M. Ultrastructural localization of B-D-Galactan in the nuclei of the myxomycete *Physarum polycephalum*. *Biochem BiophysActa* 1978;542:308.
- 35.— HORISBERGER M, VONLATHEN M. Multiple marking of cell surface receptors by gold granules: simultaneous localization of three lectin receptors on human erythrocytes. *J Microscopy* 1979; 115:97.