

## LOCALIZACION INMUNOCITOQUIMICA DE LA HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA EN LA PLACENTA HUMANA Y EN CELULAS TUMORALES

GENARINA ESCOVAR V.\*

Mediante el uso de los métodos de peroxidasa anti-peroxidasa e inmunofluorescencia aplicada a tejidos desparafinados y tratados con tripsina, se estudiaron inmunocitoquímicamente un grupo de placentas y tumores malignos. Al utilizar anticuerpos anti-GCH, la hormona gonadotropina coriónica humana (GCH) fue localizada en células del sincitiotrofoblasto de placentas de diferentes estados de desarrollo, se encontró, además, que las células de Langhan's y del citotrofoblasto fueron negativas a la inmuno-reacción. La mayoría de los tumores estudiados fueron encontrados positivos al aplicar los métodos mencionados. Se postula que la inmunosupresión selectiva del huésped por tumores y la inmunosupresión selectiva de tejidos maternos por tejidos fetales, podría estar mediada por la hormona gonadotropina coriónica.

Es conocido que además de las funciones de transporte de nutrientes, productos metabólicos y oxígeno, la placenta elabora un gran número de hormonas. Esta función endocrina es particularmente evidente en la placenta humana, la cual produce grandes cantidades de hormonas de naturaleza esteroide, tales como estriol, estradiol y estrona, las que son elaboradas a partir de substratos químicos provenientes de las adrenales materna y fetal. (1). La placenta humana también sintetiza progesterona utilizando colesterol de la sangre materna como principal substrato. (2). Además, una gran variedad de hormonas polipeptídicas son sintetizadas en los tejidos placentarios, incluyendo la hormona gonadotropina coriónica humana (GCH), (3); la somatomotropina coriónica humana (SCH), (4); la hormona placentaria lactogénica (PLH), (5); y la tirotropina coriónica humana (TCH), (6).

### *Hormona Gomadotropina Coriónica Humana (GCH), en la placenta normal*

Mediante el empleo de métodos inmunocitoquímicos, varios investigadores (7, 8) han demostrado específicamente la producción de gonadotropina coriónica humana localizada en el sincitiotrofoblasto que cubre las vellosidades coriónicas placentarias y en íntimo contacto con la sangre materna acumulada en los espacios intervillosos. (9). La GCH es detectable en la sangre y orina materna muy tempranamente durante la gestación, aproximadamente a los diez días después de la fertilización. (10). Su concentración aumenta hasta llegar a un pico máximo durante las semanas séptima a décima del embarazo. Hacia la mitad del período gestacional se registra una declinación de los niveles de la hormona, manteniéndose bajos hasta el término de la

\* Profesora Asistente, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Apartado Aéreo 12-26, Medellín-Colombia.

Actualmente en entrenamiento: Department of Pathology, Immunocytochemistry Section, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Texas Medical Center, Houston Texas 77030, U.S.A.

misma. En otras especies, ha sido posible la detección de la hormona gonadotropina coriónica en embriones anteriores al período de implantación en el estadio de mórula, notándose un incremento de la positividad de la reacción inmunocitoquímica a medida que el embrión progresa hacia el estadio de blastocisto. (11, 12).

*Hormona Gonadotropina Coriónica (GCH) en células tumorales*

En neoplasmas de origen trofoblástico, como el coriocarcinoma y sus metástasis, (13), en el coriocarcinoma no trofoblástico, en tumores testiculares de células germinativas, como los seminomas, y del ovario, como los disgerminomas y en los carcinomas embrionarios, es posible el hallazgo inmunocitoquímico de la hormona gonadotropina coriónica, localizada en células gigantes con morfología sincitial. (14, 15, 16).

Por lo general, los niveles elevados de la hormona, detectados en el suero y orina de estos pacientes, presentan una correlación directa con la extensión y tamaño proporcional del tumor. (17). Debido a que tanto en la placenta normal, como en los neoplasmas enunciados, se ha encontrado una producción elevada de GCH, esta sustancia ha sido propuesta como un marcador tumoral inmunocitoquímico específico para el estudio de los citados neoplasmas.

*Características bioquímicas de la hormona gonadotropina coriónica*

La GCH es una glucoproteína con peso molecular de 100.000, la cual contiene galactosa y hexosamina. Como otras glucoproteínas está compuesta por 2 subunidades: alfa y beta, unidas entre sí por un enlace no covalente. (18). La estructura primaria de todas las subunidades alfa en las hormonas gonadotrópicas de los humanos es casi similar, pero las subunidades beta varían. (19). La subunidad beta de GCH se caracteriza por presentar un residuo adicional de 30 aminoácidos unido al grupo carboxílico. Subunidades alfa y beta de la hormona han sido encontradas en forma libre en el plasma de mujeres embarazadas. Grandes cantidades de subunidades alfa

libres están presentes en tejido obtenido de placenta normal, en todos los trimestres del período gestacional. A medida que progresa el embarazo se registra un marcado exceso de subunidades alfa libres en relación con la concentración sérica de subunidades beta libres. (20).

En el presente estudio se examina la sensibilidad y especificidad de los métodos inmunocitoquímicos de inmunofluorescencia indirecta aplicada a tejidos en parafina, e inmunoperoxidasa antiperoxidasa, aplicados a la detección de la hormona gonadotropina coriónica humana, tanto en la placenta normal como en tumores productores de la hormona; se discute además su posible papel en los procesos de oncogénesis.

MATERIALES Y METODOS

*Obtención y preparación de los tejidos*

Diez placentas, provenientes de abortos ocurridos durante los dos primeros trimestres del embarazo y una del último trimestre, fueron evaluadas como normales, mediante estudio anatómico macroscópico y de cortes histológicos en hematoxilina-eosina. Además, fueron obtenidos de biopsias testiculares varios neoplasmas clasificados como un seminoma, tres carcinomas embrionarios, un teratoma, y un coriocarcinoma con metástasis a ganglios inguinales vecinos.

Todos los tejidos fueron fijados en formol al 10% y embebidos en parafina, realizándose posteriormente cortes histológicos de 4 micras de espesor. Antes de realizar los métodos inmunocitoquímicos se colocaron los cortes histológicos 2 horas a 60°C, siendo después desparafinados en xilol, 30 minutos, e hidratados en gradiente descendente de etanol, 100% a 50%, dos minutos, respectivamente.

*Detección inmunocitoquímica de la hormona GCH*

Se utilizaron dos métodos inmunocitoquímicos en la detección de GCH en los tejidos estudiados. Uno de ellos fue el de inmunofluorescencia indirecta aplicada a tejidos preparados en cortes en parafina,

según método de Qualman et al. (21), ampliamente descrito por Escovar et al. (22), en el cual los tejidos son pretratados con tripsina (grado puro, Fisher Sci. Co. St. Louis. U.S.A.) para facilitar la penetración de anticuerpos utilizados en la inmunorreacción. En esta prueba se utilizaron los siguientes antisueros: suero de conejo IgG-anti-GCH, el cual se obtuvo comercialmente de Miles Yeda, Lab. Israel; se empleó además como conjugado fluorescente un segundo antisuero consistente en moléculas IgG de cabra anti-conejo, obtenido de Dako, Lab. N.Y., U.S.A. Las láminas montadas en elvanol, fueron examinadas por microscopía de fluorescencia y fotografiadas con película Ektachrome, Asa 400 (E1 135-36) y sometidas a revelado especial de Kodak - ESP1. La Figura 1A, esquematiza la detección de la hormona gonadotropina coriónica mediante el uso de la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

El otro método empleado en la detección de GCH fue el procedimiento inmunocitoquímico de peroxidasa anti-peroxidasa de Sternberger (23), descrito en detalle por Escovar et al. (22). Los cortes histológicos fueron expuestos a los siguientes antisueros, consecutivamente, verificándose lavados con solución tamponada Tris, pH. 7,6. (22). Primer antisuero: IgG de conejo anti GCH, incubado durante 24 horas a 4°C. en cámara húmeda. Este antisuero se obtuvo comercialmente de Miles-Yeda Lab.

Segundo antisuero: IgG de cabra anti conejo, incubado media hora a 37°C. (Cappel Lab. Pa., U.S.A.). Tercer antisuero: Complejo inmune compuesto por moléculas de IgG anti-Peroxidasa, unidas a moléculas de Peroxidasa, (Cappel, Lab.), incubado media hora a 37°C.

Se utilizaron en la prueba dos controles, uno de ellos, consistió en la sustitución del suero anti-GCH por suero pre-inmune. También se realizó adsorción del suero anti-GCH con la hormona GCH (Calbiochem Behring Corp. La Jolla. Ca. U.S.A.), utilizándose el suero así tratado, en la prueba de peroxidasa anti peroxidasa (PAP). (24).

La reacción PAP fue revelada con 3'3 diaminobenzidina al 0,05% y peróxido de

hidrógeno al 30%. (22). Finalmente los tejidos fueron teñidos con Hematoxilina de Harris, sometidos a deshidratación ascendente de etanol, clarificados en xilol y montados con Permount. Se utilizó microscopio de luz para el estudio de tejidos y película Ektachrome, Et 135-36, tungsteno (Eastman, Kodak, N.Y.), para las fotografías. La Figura 1B, ilustra esquemáticamente la reacción de Peroxidasa-anti peroxidasa, sin anticuerpo marcado, según el método de Sternberger. (23).

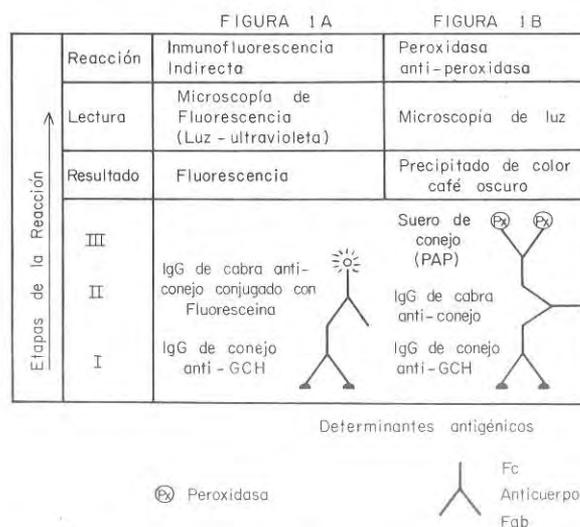


Figura 1A. REACCION DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA. Etapa I, el suero IgG de conejo anti GCH, reacciona con determinantes antigénicos GCH presentes en el tejido. Etapa II, reacción del primer antisuero con un segundo antisuero IgG de cabra anti-conejo conjugado con fluoresceína. El producto de la reacción es visible utilizando microscopio para fluorescencia.

Figura 1B. REACCION DE PEROXIDASA ANTI-PEROXIDASA SIN ANTICUERPO MARCADO. Etapa I, el suero IgG de conejo anti-GCH, reacciona con determinantes antigénicos GCH en el tejido. Etapa II, reacción del primer antisuero con un antisuero ligante IgG de cabra anti conejo. Etapa III, el segundo antisuero reacciona con un tercer antisuero, el cual consiste en el complejo inmune peroxidasa unido a anticuerpos anti-peroxidasa (PAP). El producto de la reacción es un precipitado de color café oscuro, visible con microscopía de luz. Nota: El término: "sin anticuerpo marcado", se refiere a que el primer anticuerpo utilizado en la reacción, no está unido a peroxidasa.

## RESULTADOS

### *Hallazgos inmunocitoquímicos*

El empleo de la prueba de inmunofluorescencia indirecta aplicada a tejidos en parafina, permitió detectar en todas las placentas estudiadas la hormona gonadotropina coriónica (GCH), localizándose la reacción positiva en las células del sincitiotrofoblasto de las vellosidades coriónicas. La Figura 2 ilustra tales hallazgos en una placenta del tercer trimestre gestacional. El empleo de esta prueba también permitió detectar la GCH en 4 de los 6 neoplasmas estudiados. La reacción de inmunofluorescencia positiva para GCH fue localizada a nivel del citoplasma de células gigantes con morfología de sincitiotrofoblasto. La Figura 3, ilustra la reacción de inmunofluorescencia positiva en la detección de GCH en un coriocarcinoma.

Al examinar placentas correspondientes a los tres trimestres gestacionales, mediante aplicación del método PAP, se detectó en todas reacción positiva para GCH localizada en células del sincitiotrofoblasto de las vellosidades coriónicas. La Figura 4 ilustra los citados hallazgos en una placenta del tercer trimestre gestacional. La reacción positiva se caracteriza por precipitado de color café oscuro localizado en el citoplasma y membrana celulares. Las células del citotrofoblasto y las células de Langhans fueron negativas a la inmunoreacción, así como también otros tipos celulares existentes en el tejido.

La Figura 5 ilustra la reacción fuertemente positiva para GCH en una célula gigante sincitial de un teratoma testicular, con focos de coriocarcinoma. Similares hallazgos fueron encontrados en dos de los carcinomas embrionarios estudiados.

La Figura 6 ilustra la reacción de PAP positiva en la detección de GCH localizada en el componente de sincitiotrofoblasto del coriocarcinoma estudiado; los demás tipos celulares existentes en el tejido fueron negativos a la inmunoreacción.

Se obtuvieron resultados negativos al ser expuestos los tejidos con suero anti-GCH

previamente adsorbido con GCH; asimismo al reemplazar el primer antisuero por suero pre-inmune en la reacción PAP.

De los casos estudiados solo un carcinoma embrionario y el seminoma resultaron negativos a la inmunoreacción, tanto para la prueba de inmunofluorescencia como la de inmunoperoxidasa.

## DISCUSION

En el presente estudio la aplicación de los métodos inmunocitoquímicos de inmunofluorescencia en tejidos en parafina y de peroxidasa anti-peroxidasa, permitió satisfactoriamente la detección de la hormona gonadotropina coriónica en células del sincitiotrofoblasto de las placentas estudiadas, en células gigantes con morfología sincitial en los neoplasmas analizados y en el componente de sincitiotrofoblasto del caso de coriocarcinoma. Al compararse el método de inmunofluorescencia aplicada a tejidos en parafina tratados con digestión de tripsina, con el método que utiliza cortes histológicos por congelación, se advierten ventajas en relación a una mayor conservación de la morfología general del tejido, sin alterarse la naturaleza del antígeno celular. Además, la aplicación de este método ofrece la ventaja de poder estudiar por inmunofluorescencia casos retrospectivos preservados en bloques de parafina y acumulados durante años.

El empleo del procedimiento de peroxidasa anti-peroxidasa ha brindado una nueva arma para el análisis bioquímico y fisiológico de una célula en particular, en un tejido que contiene varios tipos celulares. La gran sensibilidad y especificidad del método hacen posible la detección de cantidades mínimas de antígenos tisulares, utilizando diluciones altas del primer antisuero. Lo anterior reduce considerablemente el costo total de la reacción, la que resulta también económica por el uso de microscopía de luz, aún cuando su aplicación también se extiende para microscopía electrónica. (25). El empleo de secciones histológicas en parafina hace posible la revisión retrospectiva de casos. Además, la obtención de preparaciones permanentes, facilita el archivo de la investigación realizada.

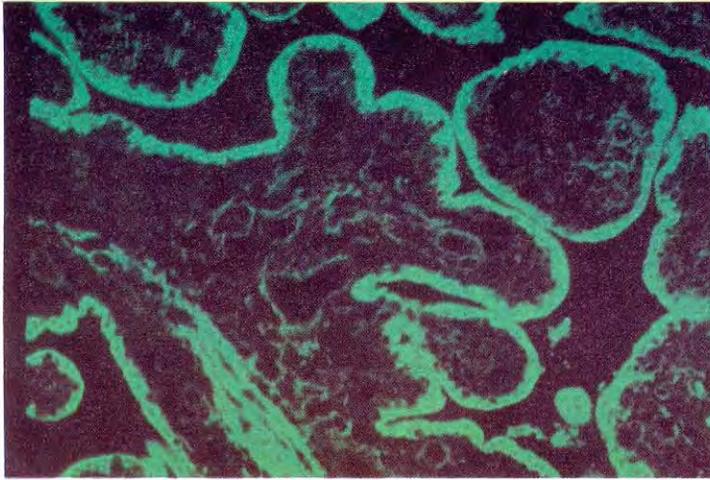


Figura 2. Reacción de inmunofluorescencia positiva para la hormona gonadotropina coriónica humana (GCH) en células del sincitiotrofoblasto de vellosidades coriónicas, en una placenta del tercer trimestre gestacional (100 X).

Figura 3. Nótese la reacción de inmunofluorescencia positiva para la hormona gonadotropina coriónica humana (GCH) localizada en el citoplasma de una célula gigante con morfología sincitial en un coriocarcinoma. Los demás tipos de células del neoplasma son negativos a la inmunoreacción. (400 X).

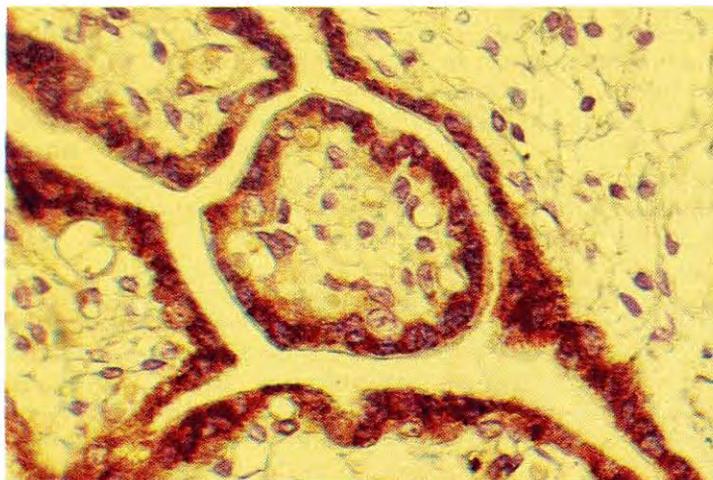
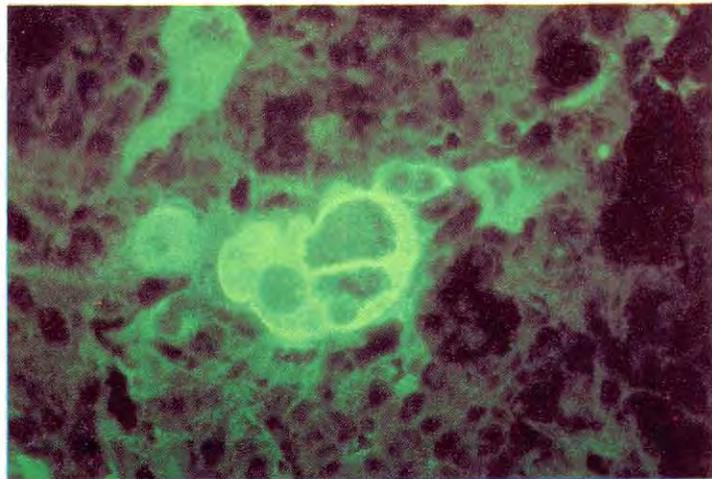


Figura 4. Nótese la fuerte reacción positiva de Peroxidasa anti-Peroxidasa (PAP) en la detección de GCH, localizada en células del sincitiotrofoblasto de vellosidades coriónicas, en una placenta del tercer trimestre gestacional. Nótese los demás tipos celulares en el tejido, negativos a la inmunoreacción. (100 X).

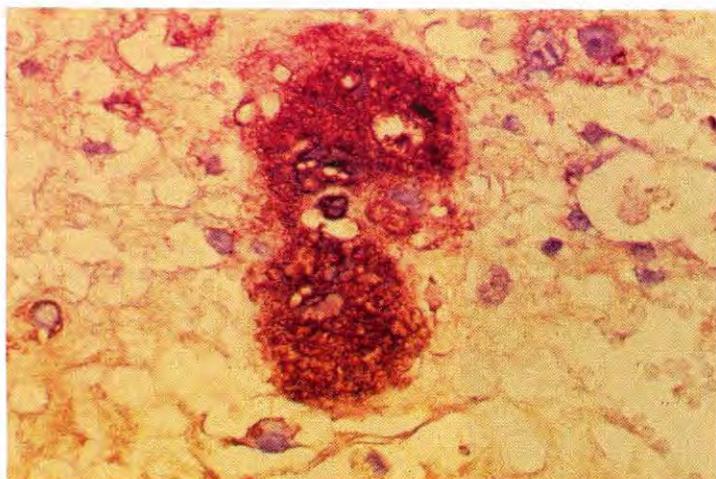
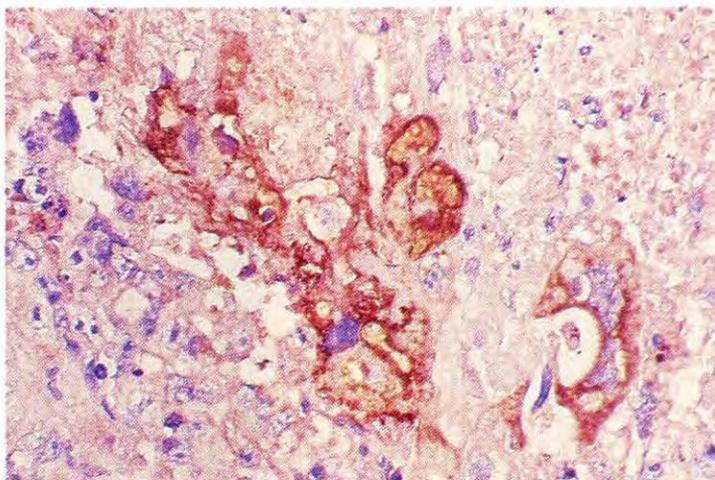


Figura 5. Se ilustra la reacción PAP fuertemente positiva en la detección de GCH localizada a nivel del citoplasma y membrana celular de una célula gigante con morfología sincitial, en un teratoma. (400 X).

Figura 6. Nótese la reacción PAP positiva en la detección de GCH localizada en el componente de sincitiotrofoblasto, en un coriocarcinoma. El componente citotrofoblástico es negativo en la inmunorreacción. (100 X).



La fuerte reacción PAP positiva para GCH localizada en el borde apical de las células del sincitiotrofoblasto que cubren las vellosidades coriónicas placentarias, sugiere una alta concentración de la hormona a nivel de la membrana citoplasmática. Aparentemente este patrón de distribución contribuye a formar una línea continua alrededor de las vellosidades coriónicas y establece una barrera entre éstas y los espacios intervellosos inundados de sangre materna.

Un patrón similar de distribución de la hormona GCH se apreció en los neoplasmas estudiados en los cuales la hormona fue detectada específicamente en el citoplasma

y membrana citoplasmática de células gigantes sincitiotrofoblásticas, al igual que en el componente sincitial del coriocarcinoma estudiado. Estos hallazgos son similares y confirman lo encontrado por otros autores al estudiar la GCH en series con un número significativamente grande de los citados neoplasmas. (26, 27, 28, 29, 30).

Los resultados negativos en dos de los neoplasmas estudiados, revelan poca o nula producción de GCH a nivel de las secciones histológicas examinadas. En el presente estudio no se realizó en forma programada la detección de niveles séricos de la hormona, resultando, de este modo, imposible estable-

cer una correlación entre los hallazgos inmunocitoquímicos y los niveles séricos de la misma. Solo en el caso de coriocarcinoma, mediante revisión de la historia clínica, se comprobó que el paciente presentaba niveles séricos altos de la hormona, detectados por radioinmunoensayo.

Los resultados negativos obtenidos en los métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa al reemplazar el primer antisuero por suero pre-inmune o al utilizar antisuero anti-GCH previamente adsorbido con hormona HCH, expresan la mono-especificidad del antisuero para reaccionar con su propia hormona.

Se desconocen los mecanismos por los cuales la hormona gonadotropina coriónica es retenida en la membrana citoplasmática de las células sincitiales. La acción parece residir en la cadena adicional de 30 aminoácidos unida al grupo carboxílico, que presenta la subunidad beta de la GCH. La cadena incluye varias prolínas y serinas unidas a carbohidratos, las cuales son estructuras no comunmente asociadas a proteínas globulares. Estas características químicas parecen tener importancia en la habilidad de la GCH para permanecer unida a la superficie del sincitiotrofoblasto placentario y en células tumorales (31). El patrón de distribución de la hormona GCH a nivel de la superficie celular ha sido estudiado por inmunoelectromicroscopía (32). La distribución superficial contrasta con lo encontrado en las gonadotropinas hipofisarias, las cuales se encuentran contenidas en gránulos secretorios citoplasmáticos (33). Si la función de la GCH fuera solo de carácter hormonal, el patrón de distribución superficial sería el menos esperado. Sin embargo, la presencia de la hormona en grandes cantidades a nivel de la superficie celular parece asegurar una concentración adecuada y aparentemente importante y necesaria para inhibir la respuesta inmune de células timo dependientes. La razón de la tolerancia inmunológica materna hacia tejidos placentarios no ha sido totalmente explicada y es probable que sea un fenómeno multifactorial. Varias investigaciones han señalado que la GCH es un inhibidor de la respuesta inmunológica de

células T, in vitro. En la placenta y en células tumorales se ha propuesto una acción supresora de la GCH en el rechazo inmunológico, al actuar sobre las células T (linfocitos) y prevenir la maduración de la respuesta inmune. (34, 35).

Con frecuencia durante la oncogénesis son expresados genes fetales. Ejemplo de ello lo constituyen la producción de los antígenos carcinoembrionario (36) y alfa-fetoproteína en varios tipos de tumores (37). Tal expresión de genes fetales podría también resultar en la producción de GCH, el cual es uno de los que más tempranamente se expresa durante la ontogenia. (11, 12). La distribución de la hormona GCH en la superficie de células tumorales parece jugar un papel importante en la oncogénesis, ya que asegura un mecanismo inmunosupresor bastante efectivo mediante el cual la célula cancerosa se enmascara y escapa de la supervigilancia del sistema inmune del huésped. Esta situación podría explicar el poder invasor del coriocarcinoma y sus metástasis. (38).

Además de la acción en la supresión inmunológica sobre células T, la hormona gonadotropina coriónica mantiene el cuerpo lúteo durante el embarazo. Las células de la granulosa del cuerpo lúteo presentan una marcada sensibilidad hacia los niveles circulantes de GCH. La hormona también estimula la producción de estrógenos placentarios (39). Pequeñas cantidades de GCH llegan al embrión durante el desarrollo temprano, induciendo la síntesis de esteroides en las adrenales y testículos embrionarios (40).

El concepto del uso de GCH como marcador específico inmunocitoquímico tumoral está extendido actualmente al hallazgo de sub-unidades alfa o beta de la hormona. Un elevado nivel sérico de GCH o de una de sus sub-unidades, detectado por radioinmunoensayo, puede indicar la presencia de una enfermedad activa; sin embargo, un nivel normal no siempre excluye la enfermedad. Se ha detectado en tejidos normales una sustancia con propiedades parecidas a la GCH (41). En adición a los

niveles elevados de GCH encontrados en los tumores citados en el presente estudio, la hormona ha sido utilizada como marcador tumoral inmunocitoquímico en tumores gástricos, en los cuales se han detectado concentraciones séricas elevadas de sub-unidades alfa en el rango de 20.000 nanogramos por mililitro de suero. Pacientes con tumores pancreáticos y pulmonares presentan niveles altos de sub-unidades beta. (42).

Como conclusión del presente estudio se señala que la detección inmunocitoquímica de GCH contribuye al diagnóstico diferencial de tumores y metástasis asociados con su producción (43 - 46). La aplicación del procedimiento inmunocitoquímico PAP en la detección de GCH permite un acercamiento más al entendimiento de dos grandes interrogantes en el mundo de la biomedicina: el uno, la formación y poder invasor del trofoblasto placentario durante los procesos de implantación del embrión en un endometrio materno, permisivo inmunológicamente a tales acciones; el otro, la formación y desarrollo del coriocarcinoma y tumores de células germinativas asociados con la producción de la hormona. Baghwe (47), ha concluido que el coriocarcinoma en su producción de GCH parece semejar al sincitiotrofoblasto del período temprano gestacional.

#### SUMMARY

With the use of peroxidase unlabeled antibody method and immunofluorescence in deparaffinized-trypsin-treated tissues, a set of human placentas and malignant tumors have been studied immunocytochemically. Factors influencing the sensitivity and specificity of these methods were explored. Using an anti-HCG antibody, human chorionic gonadotropin (HCG) has been successfully localized in the syncytial trophoblast of the placentas in different stages of development, with cytotrophoblast cells islands and Langhan's cells being negative. Sections of human malignant tumors were found to react with this antibody. It is postulated that both selective host immunosuppression by tumors and selective maternal immunosuppression by fetal tissues may be mediated by HCG.

#### AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus agradecimientos al Dr. Gonzalo Uribe Botero, Profesor Asistente Baylor College of Medicine y Patólogo, Sección Microscopía Electrónica, Veterans Administration Hospital, Texas Medical Center, Houston Texas, 77211, U.S.A.; por su valiosa colaboración en la clasificación histo-patológica de los tumores estudiados y la evaluación del presente trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Schubert K, Schade K. Placental steroid Hormones. *J. Steroid Biochem* 1977. 8: 359.
2. Diczfalusy E. Endocrine functions of the human foetoplacental unit. *Fed Proc.* 1964. 23: 791.
3. Ascheheim S, Zondek B. Ei und Hormon. Hypophysenvorder-lappenhormon und Ovarialhormon in Harn von Schwangeren. *Klin Wschr.* 1927. 6: 1321.
4. Genazzani A R. In vitro synthesis of and ACTH-like hormone and human chorionic somatomatotropin by placental and amniotic cells. *Experientia* 1974. 39: 430.
5. Chatterjee M, et al. Synthesis of human placental lactogen and human chorionic gonadotropin by polyribosomes and messenger RNA from early and full term placentas. *J Biol Chem.* 1976. 251: 2945.
6. Hershman J M, Starnes W R. extraction and characterization of a thyrotropic material from the human placenta. *J. Clin Invest.* 1969. 58: 923.
7. Bossaert Y et al. Demonstration of HCG in human placenta during gestation by immunofluorescence. *Revue Fr Etud Clin Biol.* 1965. 10: 919.
8. Ikonikoff L K, Cedard L. Localization of human chorionic gonadotrophin and somatomamotrophic hormone by the peroxidase immunohistoenzymologic method in villi and amniotic epithelium of human placenta from six weeks to term. *Am J Obstet Cyne.* 1973. 116: 1124.
9. Beaconsfield P, Villae G. Placenta A Neglected Experimental Animal. *Endocrine Function.* Oxford, England. Pergamon Press. 1979. pp. 74-86.
10. Catt K L et al. Appearance of HCG in pregnancy plasma following the initiation of implantation of the blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975. 40: 537.
11. Wilwy L D. Presence of a gonadotrophin on the surface of pre-implanted mouse embryos. *Nature* 1974. 252: 715.
12. Haour F, Saxena B B. Detection of a gonadotropin in rabbit blastocyst before implantation. *Science* 1974. 185: 444.

## LOCALIZACION INMUNOCITOQUIMICA DE LA HORMONA....

13. Naughton M.A et al. Localization of the B Chain of human Chorionic Gonadotropin in Human Tumor Cells and Placental Cells. *Cancer Research*. 1975. 35: 1887.
14. Kurman R.J. et al. Cellular localization of alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in germ cell tumors of the testis using an indirect immunoperoxidase technique. A new approach to classification utilizing tumor markers. *Cancer* 1977. 40: 2136.
15. Nochomovitz L E, Rosai J. Current concepts on the histogenesis, pathology, and immunocytochemistry of germ cells tumors of the testis. In *Pathology Annual*. Sheldon Sommers and Paul Rosen, Eds. 1978. Vol. 13, PP 327-361.
16. Nochomovitz L E et al. Testicular seminoma with human chorionic gonadotropin (HCG) production: A Study of 16 cases with special reference to anaplastic seminoma. *Lab Invest*. 1980. 42: 140.
17. Butt W R. *Hormone Chemistry. The Gonadotrophins*. Halsted Press a division of John Wiley and Sons, Inc. N.Y. 2 Ed. 1975. Vol. 1, pp. 140-177.
18. Ashitaka Y. Serum and chorionic tissue concentrations of human chorionic gonadotrophin and its subunits during pregnancy. *Endocrinol. Japon* 1974.21:547.
19. Vaitukaites J L. Changing placental concentrations of human chorionic gonadotropin and its subunits during gestation. *J. Clin Endocrinol Metab* 194. 38: 755.
20. Chatterjee M, Munro H N. Changing ratio of human chorionic gonadotropin subunits synthesized by early and full-term placental polyribosomes. *Biochem Biophys Res Comm*. 1977.77: 426.
21. Qualman S J, Keren D. Immunofluorescence of deparaffinized trypsin-treated renal tissues. *Lab Invest*. 1979. 42: (6); 483.
22. Escovar G et al. Estudio inmunocitoquímico de las hormonas de la adenohipófisis humana. I. Hormona del crecimiento. *Acta Med. Colombiana*. 1981. 6 (3): 257.
23. Sternberger L A et al. The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation of properties of soluble antigen-antibody complex (horse-radish peroxidase anti-horse-radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem Cytochem*. 1970. 18: 315.
24. Baker B I et al. Differentiation of Growth Hormone and Prolactin containing Acidophils with Peroxidase labeled antibody. *Anat Rec* 1969. 164: 163.
25. Moriarty GC et al. Ultrastructural immunocytochemistry with unlabeled antibodies and the peroxidase anti-peroxidase complex. A technique more sensitive than radioimmunoassay. *J Histochem Cytochem* 1973. 21: 825.
26. Hedinger C et al. Seminoma with syncytiotrophoblastic giant cells. *Virchow Arch Pathol Anat Histol* 1979. 383: 59.
27. Friedman E. Multiple tissue markers in human malignant testicular tumors. *Scand J Immunol*. 1978. 8 Suppl. 8: 119.
28. Heyderman E. Multiple tissue markers in human malignant testicular tumors. *Scand J Immunol*. Vol. 8 Suppl. 1978; 8: 119.
29. Kurman R J et al. Malignant germ cell tumors of the ovary and testis. An immunohistologic study of 69 cases. *Ann Clin Lab Sci* 1979. 9: 462.
30. Braunstein G D et al Ectopic production of human chorionic gonadotropin by neoplasm. *Ann Int Med* 1973. 78: 39.
31. Ross GT. Clinical relevance of research on the structure of human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynec*. 1977. 129: 79.
32. Yorde D E et al. Immunocytochemical localization of human choriogonadotropin in human malignant trophoblast. Model for human Choriogonadotropin Secretion. *Laboratory Invest*. 1979. 40 (3); 391.
33. Uribe-Botero G, Escovar G. Ultraestructura de las células de la adenohipófisis humana. Aceptado en la Revista Antioquia Médica para publicación, primer número del 82.
34. Adcock E W et al. Human Chorionic gonadotropin: Its possible role in maternal lymphocyte suppression. *Science*. 1973. 181: 845.
35. Dichman W J, Gauchi M N. Lymphocyte induced stimulation of human chorionic gonadotropin production by trophoblastic cells in vitro. *Nature*. 1978. 271: 377.
36. Wagener C et al. A highly sensitive method for the demonstration of carcinoembryonic antigen in normal and neoplastic colonic tissue. *Histochemistry*. 1978. 58 (1-2): 1.
37. Javadpour N et al. Human chorionic gonadotropin (HCG) and alpha-fetoprotein (AFP) in sera of tumor cells of patients with testicular seminoma. A prospective study. *Cancer*. 1978. 42 (6): 2768.
38. Brewer J I, Mazur M T Gestation Choriocarcinoma. *Surg Path* 1981. 5 (3): 267.
39. Cedard L et al. Studies on the mode of action of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin on estrogenic biosynthesis and glycogenolysis by human placenta perfused in vitro. *Steroids*. 1970. 16: 361.
40. Villet D B. Development of endocrine function in the human placenta and fetus. *New Engl J Med* 1967. 281: 533.
41. Yoshimoto Y et al. Human chorionic gonadotropin-like material. Presence in normal tissues. *Am J Obst Gynecol*. 1979. 134: 729.
42. Segal S J. *Chorionic Gonadotropin*. First Ed. Plenum Press. N.Y. 1980. pp. 465-489.
43. Scardino P T et al. The value of serum tumor markers in the staging and prognosis of germ cell tumors of the testis. *J Urol* 1977. 118: 994.

GENARINA ESCOVAR V.

44. Skinner D G, Scardino P T. Relevance of biochemical tumor markers and lymphadenectomy in management of non-seminomatous testis tumors. Current perspective. J Urol 1980. 123: 378.
45. Mauch P et al. The significance of positive chorionic gonadotropin in apparently pure seminoma of the testis. Int J Rad Oncol Biol 1979. 5: 887.
46. Delellis R A. Alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in ovarian and testicular germ cell tumors. Diagnostic Immunohistochemistry. Masson Monographs, publishing U.S.A., Inc. N.Y. First Ed. 1981. 277: 298.
47. Baghawe, D.D. Endocrinology and treatment of trophoblastic tumors. J Clin Pathol. 29, Supplement (Royal College of Pathologists) 1976. 10: 140.