

Preparación y caracterización de un complejo peroxidasa-antiperoxidasa monoclonal

Preparation and characterization of a peroxidase-antiperoxidase monoclonal complex

JUANA VILLEGAS, GISELA ELLER, VICTOR LEYAN,
PATRICIO ESQUIVEL y HUGO FOLCH

Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

En el presente trabajo se describe la obtención de un anticuerpo monoclonal de rata antiperoxidasa y la preparación, con esta inmunoglobulina, de un complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). Este complejo puede ser usado como reactivo en la detección de antígenos celulares en cortes de tejido o de antígenos solubles unidos a soporte sólido. El hibridoma obtenido produce anticuerpo antiperoxidasa de clase IgG, y al ser combinado con su antígeno, mediante la técnica descrita por Landsdorp, se obtiene un complejo PAP, que mayoritariamente presenta pesos moleculares entre 230.000 y 250.000, sugiriendo una composición Ag₂-Ac₁. También se forma una pequeña proporción de complejos mayores, que pueden llegar a pesar más de 7×10^5 . El complejo PAP preparado es estable y da reacciones en histoquímica de extraordinaria limpieza.

INTRODUCCIÓN

El uso de los anticuerpos como elementos de detección y purificación para las más variadas sustancias antigénicas se ha visto aumentado con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales, por las características ventajosas que éstos representan. Entre las diferentes modalidades de reacciones inmunoenzimáticas, el uso de complejos solubles peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (Sternberger y col., 1970) ha sido incorporado en muchos laboratorios como procedimiento rutinario para detectar antígenos en cortes de tejido o evidenciar reacciones inmunológicas unidas a soportes sólidos artificiales.

El uso del complejo PAP se basa en la aplicación sucesiva, a la preparación que contiene el antígeno que se pretende detectar, de un primer anticuerpo específico seguido de un segundo antisuero con especificidad por las inmunoglobulinas de la especie en que se originó el primer anticuerpo. Este segundo anticuerpo se aplica en exceso para que, junto con fijarse al primer anticuerpo, le queden sitios libres para unir el complejo PAP. Para que esto se lleve a efecto, el complejo PAP usado debe ser preparado con anticuerpos antipe-

roxidasa originados en la misma especie en que lo fue el primer anticuerpo. El método PAP es aplicable con éxito en combinación con anticuerpos policlonales (Sternberger y col., 1970) y monoclonales (Landsdorp y col., 1980; Mason y col., 1982) de las más diversas especificidades. Como estos últimos generalmente son de origen murino o producidos en rata, se requiere complejo PAP de ratón y de rata para ponerlos en evidencia. La preparación de complejo PAP con suero antiperoxidasa producido en especies pequeñas se ve dificultada por el bajo volumen de sangrado de estos animales, haciéndose deseable la obtención de anticuerpos monoclonales para disponer de una fuente "ilimitada" de inmunoglobulina antiperoxidasa. En el pasado se han producido anticuerpos monoclonales de ratón antiperoxidasa (Landsdorp y col., 1980; Mason y col., 1982; Landsdorp y col., 1984) y se ha reportado la preparación de complejo PAP con estos anticuerpos (Landsdorp y col., 1980; Mason y col., 1982; Landsdorp y col., 1984). En este trabajo describimos la obtención de un anticuerpo monoclonal de rata antiperoxidasa y su uso en la preparación de complejo PAP.

MATERIAL Y MÉTODO

Inmunización. Ratas Holtzman de 2 a 3 meses de edad recibieron una primera dosis de 100 μg de peroxidasa tipo VI (Sigma), en coadyuvante completo de Freund, por vía intradérmica. Treinta días más tarde recibieron una segunda dosis del antígeno, igual a la anterior, pero esta vez en coadyuvante de Freund incompleto. Tres días antes del sacrificio y extracción del bazo, se les administró una inyección "booster" de 100 μg de peroxidasa por vía intraperitoneal. Con las células esplénicas obtenidas se procedió a realizar la fusión celular, para así obtener hibridomas productores de anticuerpos antiperoxidasa.

Fusión celular. Los linfocitos esplénicos de rata se fusionaron con la línea celular murina NSO/2, según la técnica descrita originalmente por Köhler y Milstein en 1975; para esto, ambos tipos celulares, en una relación de $1,5 \times 10^8$ células esplénicas con 4×10^7 células parentales NSO/2, fueron mezclados y se les agregó, durante 1 minuto, gota a gota, 0,5 ml del agente fusógeno, polietilenglicol (PM 3.000) (Sigma) al 50%. Las células se mantuvieron bajo agitación suave por 90 segundos, procediendo posteriormente a su lavado con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma). En seguida las células fueron resuspendidas en 40 ml de medio de cultivo selectivo HAT, preparado con RPMI-1640 adicionado con 10% de suero bovino fetal, 120 U/ml de penicilina, 0,12 U/ml de estreptomycin, 1×10^{-3} M de piruvato de sodio, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina B y 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol. A este medio completo se le agregó, además, 1×10^{-4} M de hipoxantina, 4×10^{-7} M de aminopterina y $1,6 \times 10^{-5}$ M de timidina (Sigma). Alícuotas de 0,1 ml de la suspensión celular fueron distribuidas en placas de cultivo de 96 pocillos (Nunc Costar), las que fueron incubadas a 37°C, en atmósfera húmeda y con 5% de CO_2 . Los cultivos fueron alimentados periódicamente con medio RPMI completo, observándose crecimiento de clones híbridos después de 14 días de efectuada la fusión.

Identificación de híbridos secretores de anticuerpos antiperoxidasa. Para determi-

nar la actividad antiperoxidasa en los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas emergentes se utilizó una técnica de "dot immunobinding" sobre membranas de nitrocelulosa (Hawkes y col., 1982). Para esto, sobre las membranas previamente activadas, se sembró 1 μl de cada uno de los sobrenadantes sin diluir de los clones desarrollados. El control positivo fue realizado con suero policlonal de rata antiperoxidasa diluido 1/100 y el control negativo con medio de cultivo RPMI completo. Luego las membranas se bloquearon durante 1 h en PBS con 0,3% de Tween 20 (Sigma) y, a continuación, se incubaron durante 1 h en una solución de 0,1 mg/ml de peroxidasa en PBS con 0,03% de Tween 20. Luego de lavar las membranas por tres veces, la presencia de peroxidasa unida a anticuerpos antiperoxidasa fue revelada con 0,05% de 3'3' diaminobencidina (DAB) (Sigma) y 0,02% de H_2O_2 (Merck).

Las células de los pocillos con actividad antiperoxidasa fueron reclonadas por dilución límite en placas de 96 pocillos, usando células de bazo de ratón no inmune como capas alimentadoras (Zola y Brooks, 1985). Los clones seleccionados por su actividad antiperoxidasa se cultivaron en placas de 24 pocillos, y luego en botellas de 50 y 250 ml para recolectar sobrenadante.

Selección y estudio citológico del hibridoma 3C8. De los hibridomas positivos productores de anticuerpos antiperoxidasa se seleccionó el clon 3C8 por sus características de estabilidad y alta producción de anticuerpos. Sus características citológicas fueron estudiadas al microscopio óptico y electrónico. Las preparaciones para microscopía óptica se hicieron a partir de cubreobjetos, sobre los que se cultivaron los híbridos; posteriormente fueron fijados por 1 minuto en etanol con 1% de ácido acético glacial y lavados en agua destilada. Luego fueron incubados en una solución que contenía 0,1 mg/ml de peroxidasa, seguido por 0,2% de 3'3' diaminobencidina y 0,2% de H_2O_2 . Las preparaciones para microscopía electrónica se hicieron a partir de cultivos en fase de crecimiento logarítmico; las células se centrifugaron en tubos Eppendorf, se fijaron

con Karnovsky (Karnovsky, 1965) y se incluyeron en epon-araldita (Richardson y col., 1960). Los cortes del "pellet" fueron observados en un microscopio electrónico Hitachi 700.

El análisis de la clase de anticuerpo secretado por el hibridoma 3C8 se realizó por inmunodifusión doble en agar usando antiseros de conejo anticadena γ , μ , α y ϵ de rata (anti IgG, IgM, IgA e IgE de rata) (ICN Biologicals).

Preparación y caracterización del complejo peroxidasa-antiperoxidasa. El complejo PAP se logró por simple mezcla de una solución de peroxidasa con el sobrenadante del clon 3C8 (Landsdorp y col., 1980). Para determinar la concentración de peroxidasa adecuada a la concentración del anticuerpo, cantidades crecientes de la enzima, en un rango entre 0,15 y 1,5 mg/ml, se incubaron por 24 h, con el sobrenadante concentrado cinco veces. Cada una de las mezclas fue probada en un ensayo de "dot immunobinding" sobre membranas de nitrocelulosa, utilizándose complejo PAP policlonal como control.

El tamaño de los complejos formados entre peroxidasa y anticuerpo monoclonal de rata antiperoxidasa fue estimado por cromatografía de filtración en una columna de Fractogel TSK HW-55 (F) (Merck), de 50 x 3 cm. Para esto se usaron, como marcadores de referencia: tiroglobulina, β -amilasa, seroalbúmina de bovino y citocromo C (Sigma Chemical Co.). El contenido de proteínas de las fracciones fue evaluado por densidad óptica medida a 280 nm; la actividad de peroxidasa fue analizada usando ortofenilendiamina/ H_2O_2 como sustrato, y la actividad de complejo PAP fue estimada mediante "dot immunobinding" en membranas de nitrocelulosa.

Aplicaciones del complejo PAP en la detección de reacciones inmunohistoquímicas. La utilidad del complejo PAP obtenido se evaluó mediante la técnica inmunocitoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa (Sternberger y col., 1970), sobre cortes de diferentes tejidos, portadores de antígenos conocidos, fijados en Bouin e incluidos en parafina. Para tal efecto, fueron utilizados como primeros anticuer-

pos, suero policlonal de rata antikeratina humana (1:500) sobre piel humana, anticuerpos monoclonales de rata antifactor tímico sérico (1:320) sobre timo humano y un anticuerpo monoclonal de rata anti-Lyt-1 (1:10) sobre ganglio de ratón. En todos los casos, el primer anticuerpo fue seguido de un suero policlonal anti-inmunoglobulinas de rata, seguido del complejo PAP (1:50), que luego de un cuidadoso lavado fue revelado con 0,2% de DAB y 0,2% de H_2O_2 (Perhidrol Merck 30%).

RESULTADOS Y DISCUSION

De la fusión inicial de células esplénicas inmunes y células NSO/2, 8 clones eran secretores de anticuerpos antiperoxidasa. De éstos, se estableció el clon 3C8, productor de anticuerpo de isotipo IgG. Este clon se mantuvo estable en cultivo por más de 12 meses seguidos, durante los cuales fue reclonado repetidas veces.

Al observar las características citológicas del híbrido 3C8 y compararlas con las de las células parentales NSO/2, encontramos que el tamaño de las células es irregular, los núcleos son prominentes, de variadas formas y el citoplasma es más abundante. La presencia de anticuerpos intracitoplasmáticos en las células híbridas es evidente, ya que captan gran cantidad de peroxidasa, lo cual es revelado con DAB y H_2O_2 , dando una tinción intensa (Fig. 1). La imagen ultraestructural de las células del clon 3C8 muestra abundante citoplasma con nume-

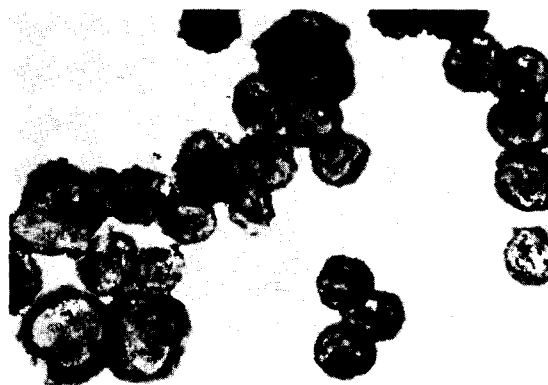


Fig. 1: Células del clon antiperoxidasa 3C8. Nótese el acentuado pleomorfismo celular y los citoplasmas fuertemente inmunoteñidos con peroxidasa (310x).

rosas mitocondrias y un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado; el núcleo es muy irregular, presentando prominentes nucléolos (Fig. 2).

En la preparación de complejo PAP se determinó como concentración adecuada el uso de 0,3 mg de peroxidasa por ml de sobrenadante antiperoxidasa concentrado 5 veces. El peso molecular aproximado del complejo PAP así preparado se estimó por cromatografía de filtración. Como se observa en la Fig. 3, la actividad del complejo PAP eluyó en las fracciones que van de la número 116 a la número 135, existiendo la mayor actividad en las fracciones 132-135. Si se toman en cuenta las fracciones en que eluyen los marcadores de peso molecular empleados, puede estimarse que la mayoría de los complejos en la preparación tienen pesos moleculares que van de 230.000 a 250.000, pero también existe un cierto número de complejos que alcanza pesos moleculares sobre 700.000 (Fig. 4).

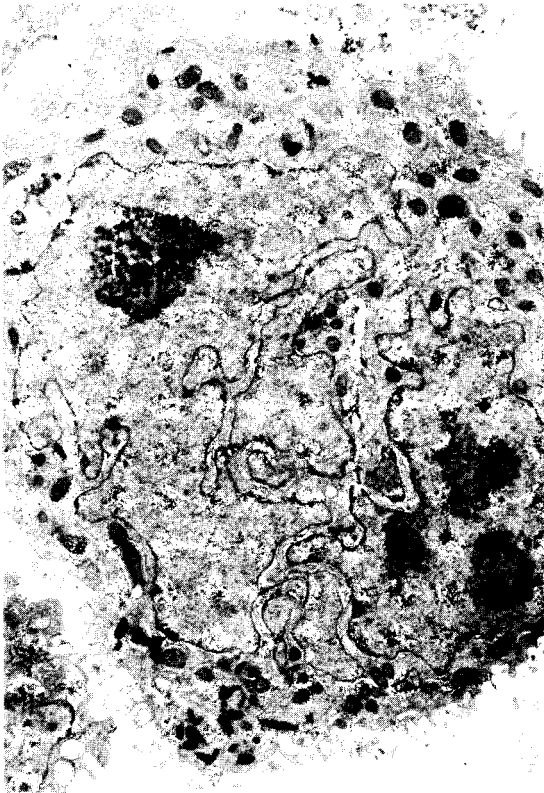


Fig. 2: Micrografía electrónica de una célula del clon 3C8. Obsérvese gran cantidad de mitocondrias, abundante retículo endoplasmático rugoso, irregularidad nuclear y prominentes nucléolos (4800 x).

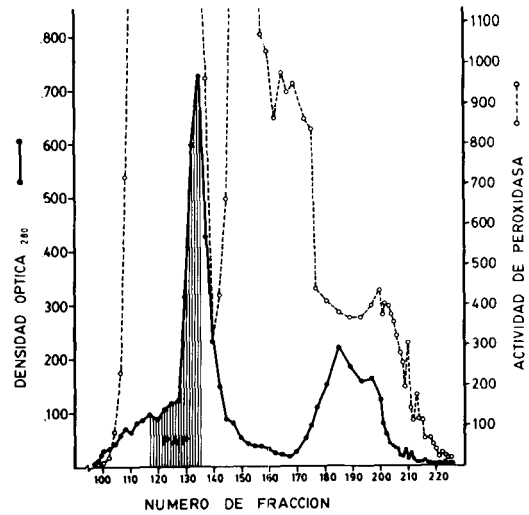


Fig. 3: Diferentes fracciones del complejo PAP separados por cromatografía de filtración de Fractogel TSK HW-55 (F), a las que se estudió su densidad óptica en 280 nm (●—●), su actividad de peroxidasa (○—○) y su contenido de complejos inmunes peroxidasa-antiperoxidasa.

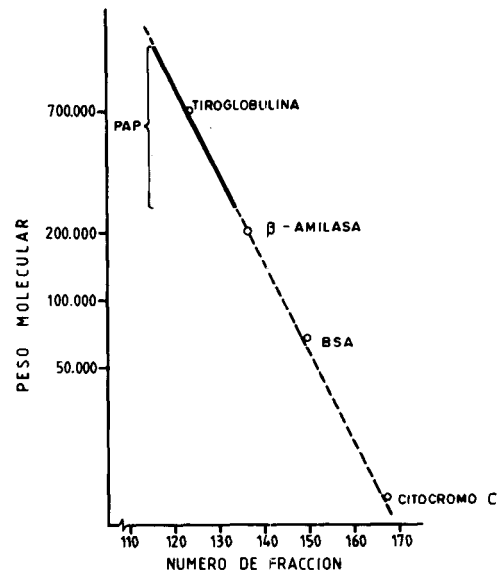


Fig. 4: Curva de calibración para peso molecular construida con marcadores conocidos, filtrados a través de una columna de Fractogel TSK HW-55 (F), junto con una muestra del complejo PAP.

El complejo PAP monoclonal fue usado exitosamente en cortes de tejido para detectar antígenos celulares usando anticuerpos policlonales y monoclonales de rata (Fig. 5).

Estos resultados demuestran la obtención de un hibridoma secretor de anticuer-

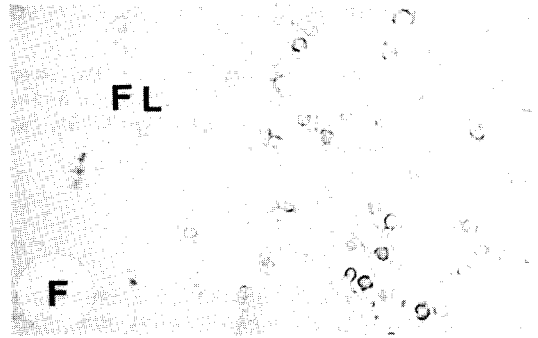
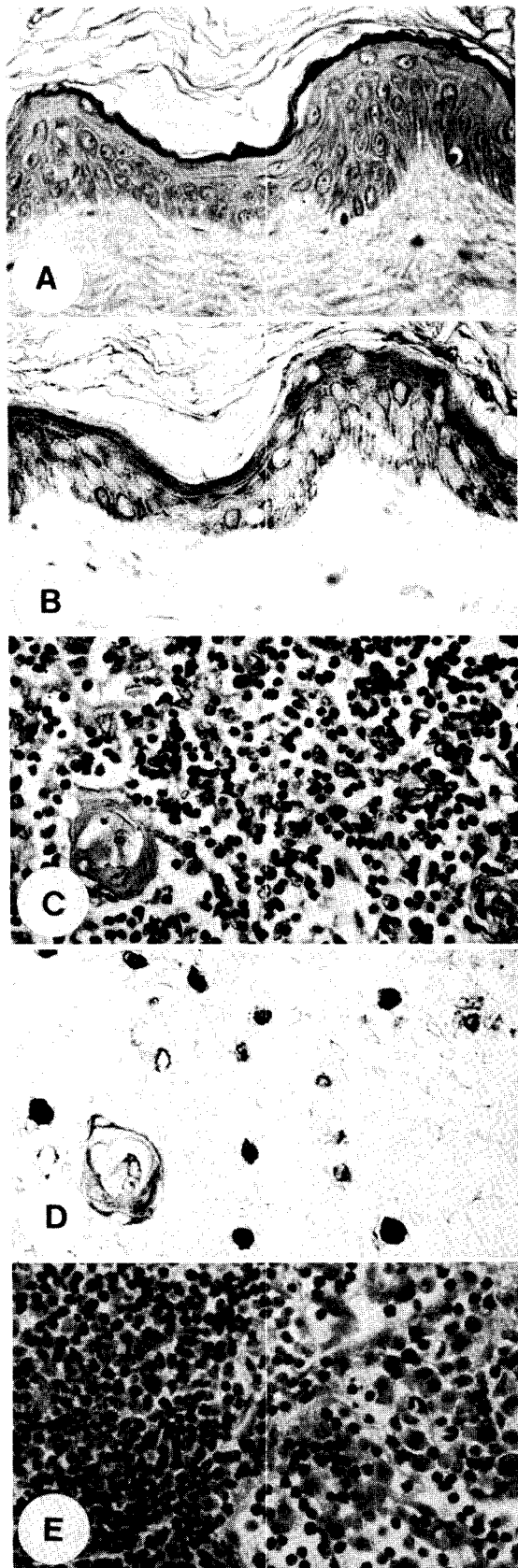


Fig. 5: Aplicaciones del complejo PAP en cortes seriados. Uno de los cortes fue teñido con hematoxilina eosina (HE) y el homólogo con el método PAP (280x).

- A : Piel humana. HE.
 B : Corte homólogo que muestra el estrato epidérmico teñido con antikeratina policlonal.
 C : Timo humano, zona medular. HE.
 D : Corte homólogo que muestra células y un corpúsculo de Hassal teñidos con anti FTS monoclonal.
 E : Ganglio de ratón, folículo linfoide (FL). HE.
 F : Corte homólogo que muestra células T helper, teñidas con anti Lyt-1 monoclonal.

pos antiperoxidasa, los que pueden ser usados con éxito en la preparación de complejos solubles PAP. El complejo PAP obtenido demostró estabilidad a la conservación, sensibilidad y especificidad similares o superiores a los descritos para preparaciones de PAP policlonal. Esto es válido para reacciones clásicas de inmunohistoquímica, donde el complejo PAP monoclonal ha demostrado ser extraordinariamente eficiente y no dar tinción inespecífica, y también en ensayos de antígenos unidos a fases sólidas como en el "dot immunobinding". El análisis del peso molecular del PAP demuestra que es heterogéneo, encontrándose la mayoría de los complejos en un rango que va de 230.000 a 250.000. Esto es compatible con la fórmula $Ac1 Ag2$, a diferencia del PAP policlonal, cuyo peso molecular es de alrededor de 430.000, con una fórmula $Ac2 Ag3$ (Sternberger y col., 1970). El menor tamaño de nuestro PAP monoclonal puede ser una ventaja por su mayor solubilidad; por esta razón es también esperable una mayor penetrabilidad en las diversas estructuras del tejido y de las células, al aplicarlo a técnicas inmunohistoquímicas. Por otra parte, la mayor cantidad de enzima por molécula de anticuerpo permite mayor sensibilidad al ensayo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos FONDECYT 89-0074 y DID-UACH RS-89-21 y el Grant 78.2503.7-01.300/469 de la Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit.

REFERENCIAS

- HAWKES, R.; NIDAY, E. y GORDON, D. (1982) A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119: 142-147.
- KARNOVSKY, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 137A-138A.
- KOHLER, G. y MILSTEIN, C. (1976) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256: 495-497.
- LANDSDORP, P.; ASTALDI, G.; OOSTERHOF, F.; JANSSEN, M. y ZEIJLEMAKER, W. (1980) Immunoperoxidase procedures to detect monoclonal antibodies against cell surface antigens. Quantitation of binding and staining of individual cells. *J. Immunol. Meth.* 39: 393-405.
- LANDSDORP, P.; VAN DER KWAST, TH.; DE BOER, M. y ZEIJLEMAKER, W. (1984) Stepwise amplified immunoperoxidase (PAP) staining. I. Cellular morphology in relation to membrane markers. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 172-178.
- MASON, D.; CORDELL, J.; ABDULAZIZ, Z.; NAIEM, M. y BORDENAVE, G. (1982) Preparation of peroxidase: antiperoxidase (PAP) complexes for immunohistological labeling of monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 1114-1122.
- RICHARDSON, K.; JARETT, L. y FINKE, E.H. (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain. Technol.* 35: 313-323.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.; CUCULIS, J.J. y MEYER, H.G. (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 315-333.
- ZOLA, H. y BROOKS, D. (1985) Techniques for the production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies. En: Hurrel, J.G.R. (ed.), *Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and applications.* CRC Press Inc. pp. 34-35.